

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук
(УФИЦ РАН)

Институт биохимии и генетики - обособленное структурное подразделение
Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского
федерального исследовательского центра Российской академии наук
(ИБГ УФИЦ РАН)

На правах рукописи

ФИЛЯЕВА КСЕНИЯ ЮРЬЕВНА

**ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ И МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ
НОВЫХ АНТИМИКРОБНЫХ ХИМИЧЕСКИХ
СОЕДИНЕНИЙ**

03.01.03 – Молекулярная биология

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Уфа – 2025

Работа выполнена в Институте биохимии и генетики - обособленном структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Научный руководитель: – **Баймиев Алексей Ханифович**
доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией биоинженерии растений и микроорганизмов Института биохимии и генетики - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук.

Рецензенты: – **Гарафутдинов Равиль Ринатович**
доктор химических наук, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией структуры и функций биополимеров Института биохимии и генетики - обособленного структурного подразделения Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук;

– **Борцова Юлия Львовна**
кандидат биологических наук, доцент кафедры фундаментальной и прикладной микробиологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. На сегодняшний день проблема антибиотикорезистентности приобретает особую значимость во всём мире и расценивается экспертами Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в качестве глобальной угрозы человечеству (Dadgostar P., 2019). И это неудивительно, поскольку тот уровень прямых гуманитарных потерь, к которым ведёт антибиотикорезистентность, действительно позволяет говорить об угрозе национальной безопасности. Именно поэтому борьба с антимикробной резистентностью (АМР) относится к одному из приоритетных направлений в здравоохранении и, соответственно, требует повышенного внимания со стороны медицинского сообщества.

Главным толчком в распространении устойчивых микроорганизмов стало нерациональное использование в медицинской практике антимикробных препаратов (АМП) (Safaei H.G. et al., 2017; Yin W., 2020), в том числе при лечении группы инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) (Healthcare – associated infection (HAI)). Согласно нормативным документам ВОЗ, данный вид заболеваний развивается, как правило, у пациентов в связи с оказанием им любых видов медицинской помощи, а также у медицинских работников в результате их профессиональной деятельности (Torrens G., 2019). В число таких заболеваний также включены внутрибольничные инфекции (ВБИ) (син. госпитальные, ятрогенные, нозокомиальные).

Практика свободного использования АМП привела к колоссальным темпам роста устойчивости микроорганизмов. Теперь, когда уже известные АМП закономерно утрачивают свою активность, а новые высокоэффективные препараты не появляются, логичным выходом из ситуации является эволюция имеющихся или разработка новых антибиотиков, обладающих более широким спектром активности

и/или способностью преодолевать некоторые механизмы резистентности возбудителей.

Степень разработанности темы. На сегодняшний день степень устойчивости отдельного патогена к конкретному АМП определяется в основном фенотипическими методами, которые базируются на способности бактерий к росту в присутствии конкретного антибиотика. Также используются молекулярные методы диагностики, которые направлены на обнаружение генов, кодирующих формирование резистентности (Zurfluh K., 2021). Результаты такой проверки могут быть полезны при подтверждении результатов фенотипического тестирования, а также в наблюдательных программах, например, для определения механизмов, ответственных за отдельный тип резистентности.

В последнее время набирают популярность репортерные системы, позволяющие в высокопроизводительном режиме осуществлять направленный поиск разнородных по химическому строению антибиотиков. Подобная система была разработана на химическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова Остерманом И.А. и его коллегами, и верифицирована на большом наборе антибиотиков с известным механизмом действия (Ivanenkov Ya.A. et al., 2019). Репортерная конструкция pDualrep2 в штамме $\Delta tolC$ *Escherichia coli* позволяет определить антибактериальное действие соединения по механизму ингибирования процесса трансляции, биосинтеза белка, либо по механизму индукции SOS-ответа в ответ на многочисленные повреждения ДНК. К примеру, разработанная репортерная система может быть использована при поиске новых ингибиторов синтеза белка, чтобы уже на этапе первичного анализа эффективности получать данные о механизме действия.

С помощью данной системы уже было протестировано более 500 тысяч образцов и обнаружено большое количество новых веществ, обладающих антибактериальной активностью с характерным механизмом действия, который определяется по индукции одного из двух репортерных генов.

Цель работы: изучение механизмов действия новых молекул антибиотиков с использованием репортёрной конструкции, а также анализ их активности в отношении штаммов возбудителей ИСМП.

Задачи исследования:

1. Кластеризовать возбудителей ИСМП из сформированных коллекций клинических штаммов по чувствительности к АМП с составлением микробиологических карт - заключений (антибиотикограмм) по каждому отдельному виду.

2. Оценить антимикробную активность 566 молекул, обладающих низким сходством по структуре, и являющихся аналогами алкалоида носкапина, амидов аминотиофенкарбоновой кислоты и производных ряда соединений – хиназолина, бензимидазола, бензотриазола, карбазола, сульфонамидов, карбоксамидов, бензофурана, бензамидов, сульфаниламидов и карбоксамидов.

3. Определить МПК исследуемых молекул-антибиотиков с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени с применением калибровочных образцов для определения количества копий ДНК бактерий *Pseudomonas aeruginosa*.

4. Оптимизировать условия проведения количественной оценки МПК исследуемых химических соединений количественным референтным методом микроразведений в бульоне с использованием музейных штаммов бактерий.

Научная новизна. Для химических соединений, являющихся аналогами алкалоида носкапина, амидов аминотиофенкарбоновой кислоты и производных ряда соединений – хиназолина, бензимидазола, бензотриазола, карбазола, сульфонамидов, карбоксамидов, бензофурана, бензамидов, сульфаниламидов и карбоксамидов, а также прошедших первичный скрининг на репортёрной конструкции pDualrep2 в штамме Δ tolC *Escherichia coli*, проведён скрининг на собранных коллекциях штаммов-изолятов

уропатогенных бактерий и возбудителей ИСМП, и определены МИК с использованием калибровочного образца pAL-TAPseudAer16S.

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Выполненная работа имеет как фундаментальное, так и практическое применение. Полученные новые экспериментальные данные расширяют и углубляют представления о новых химических соединениях, обладающих антимикробным действием. Результаты данного исследования могут быть включены в специализированные курсы, читаемые на биологических факультетах, в медицинских образовательных учреждениях, а также в рамках программ повышения квалификации медицинского персонала.

Методология и методы исследования. Методологическая основа исследования была спланирована на основании поставленной цели и включает применение методов научного познания с целью решения поставленных задач. Применялись следующие методы исследования: классические бактериологические, молекулярно-генетические, фенотипические методы определения устойчивости к антибиотикам согласно МУК 4.12.1890-04, Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (2021), рекомендациям EUCAST (версия 13.0). Статистическая обработка данных проводилась с использованием релевантных статистических критериев и методов анализа.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Производные хиназолина являются перспективным классом биологически активных азотсодержащих гетероциклических соединений и обладают механизмом действия, аналогичным группе антибиотиков аминогликозидного ряда (ингибирование синтеза белка) и пенициллинового ряда (ингибирование синтеза клеточной стенки).

2. Результаты исследования антибактериального действия молекул – прямых аналогов носкапина, обладающих выраженным противомикробным действием в отношении клинических штаммов, могут быть использованы

при программируемом синтезе антибактериальных соединений, а сами препараты могут быть использованы для дальнейших доклинических испытаний.

3. Разработанный дизайн исследования перспективных молекул антибиотиков может быть использован для оценки других разрабатываемых групп соединений антибактериального назначения.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность полученных результатов в ходе изучения свойств и механизмов действия новых антимикробных химических соединений подтверждается проведением исследования на выборке молекул антибиотиков, полученных в ходе высокопроизводительного скрининга и протестированных на коллекциях клинических штаммов возбудителей ИСМП и пробиотических штаммов с использованием микробиологических, молекулярно-биологических и статистических методов. Результаты научной работы были доложены на научных конференциях: Международный молодежный форум «Ломоносов-2019» 8-12 апреля 2019 года, Москва; Всероссийская научная конференция с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания» 4-7 июня 2019 года, Иркутск; III Международная научная конференция PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего» 3-8 октября 2022 года, Санкт-Петербург; X Съезд общества физиологов растений России Всероссийской научной конференции с международным участием «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата» 18-23 сентября 2023 года, Уфа; II Всероссийская школа-конференция «Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов» 26–27 июня 2023 года, Санкт-Петербург; IX Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXVIII Кашкинские чтения) 5-6 июня 2025 года, Санкт-Петербург.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 5 в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования являлись 566 соединений разнородных по химическому строению и объединенных в 4 группы по механизму действия (действующие по механизму ингибирования биосинтеза белка, по механизму индукции SOS-ответа, сочетающие действие указанных механизмов и с неизвестным механизмом действия). Определение механизма действия антибактериальной активности образцов проводили с использованием газона клеток *E. coli* JW5503 ($\Delta tolC$) с плазмидой pDualRep2. Вектор pDualrep2 содержит гены двух флуоресцентных белков: RFP (максимум испускания 584 нм) и Katushka2S (максимум испускания 635 нм) (рис.1).

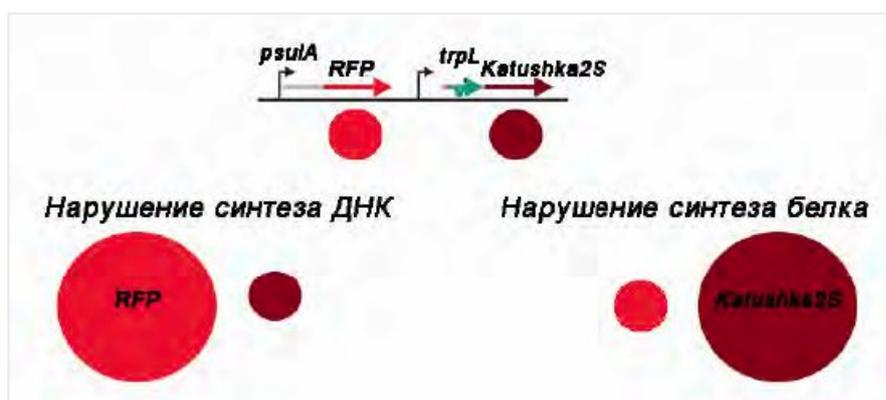


Рис.1. Схема работы репортерной системы pDualrep2 (Остерман, 2018).

В случае если антибиотик действует на процесс синтеза белка – задержка работы рибосом, экспрессия дальне-красного белка Katushka2S возрастает. Экспрессия красного флуоресцентного белка RFP увеличивается в случае включения в клетке SOS-ответа на массовое повреждение ДНК. Антибактериальную активность веществ оценивали по размеру пятна подавления роста и, при наличии, по цвету ореола вокруг него на газоне клеток *E. coli* с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc MP («Bio-Rad», США).

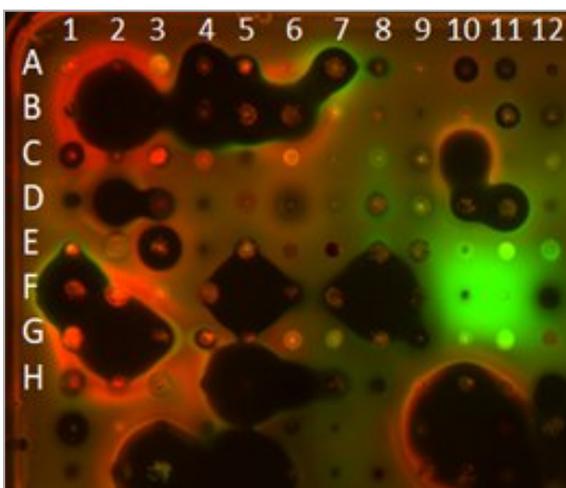


Рис.2. Верификация полученной репортерной конструкции pDualrep2 при помощи антибиотиков с известным механизмом действия (Остерман, 2018).

В качестве тест-штаммов для определения антимикробной активности молекул антибиотиков использовали микроорганизмы из коллекции музейных штаммов (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 181210171-2, *Staphylococcus aureus* ATCC USA 206, *Candida albicans* ATCC 181210169-1), коллекции из 29 клинических штаммов бактерий - возбудителей нозокомиальных инфекций (г.Оренбург), коллекции из 64 клинических штаммов уропатогенных бактерий (г.Ростов-на-Дону), коллекции из 35 пробиотических штаммов (г.Уфа).

Чувствительность микроорганизмов к тестируемым антибиотикам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтона («HiMedia», Индия). Исследуемые химические соединения растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (конечная концентрация 100 мМ) и закапывали по 1 мкл на поверхность питательной среды с нанесенной культурой микроорганизма. Чашки Петри инкубировали при 37°C в течение 18-24 часов, затем фотографировали на фотодокументационной системе Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System (Bio-Rad). Об уровне антимикробной активности судили по диаметрам зон задержки роста тест-культур вокруг лунок в агаровой среде диаметром 9 мм, в которые закапывали испытуемый раствор.

Для составления микробиологических заключений (антибиотикограмм) и получения раскладки по фенотипу для 128 тест-штаммов по отношению к АМП различных групп, имеющих разные механизмы действия, использовали диско-диффузионный метод на агаре Мюллера-Хинтона и индикаторные диски с антибиотиками, которые представляли собой диски из картона диаметром около 6 мм, пропитанные определенными противомикробными лекарственными средствами - ампициллин (10 мкг/диск), амоксициллин (10 мкг/диск), цефотаксим (30 мкг/диск), левофлоксацин (5 мкг/диск), амикацин (30 мкг/диск), гентамицин (10 мкг/диск), цефтриаксон (30 мкг/диск), доксициклин (30 мкг/диск), имипенем (10 мкг/диск), фосфомицин (200 мкг/диск), меропенем (10 мкг/диск), нитроксилин (30 мкг/диск), азтреонам (30 мкг/диск), тетрациклин (30 мкг/диск), ципрофлоксацин (5 мкг/диск) («HiMedia», Индия). Интерпретация результатов определения чувствительности микроорганизмов к АМП, а также верификация и валидация полученных антибиотикограмм проводилась с использованием цифровой системы AMRexpert.

Для проведения молекулярно-генетической оценки антимикробной активности в отношении грамотрицательной бактерии *P. aeruginosa* (штамм SS14 КС 866140) использовали положительный контрольный образец, который получали встраиванием участка генов 16S рРНК *P. aeruginosa* в вектор рAL-TA («Евроген», Россия) с последующей трансформацией и наработкой плазмиды в клетках *E. coli* XL1-Blue. Для выделения тотальной ДНК микроорганизмов использовали ионообменную смолу Chelex100. Для получения данных о количестве ДНК *P. aeruginosa* (ГЭ/образец) проводили ПЦР в режиме реального времени использовали пары видоспецифичных праймеров к фрагментам ДНК исследуемых микроорганизмов Ps.aer F_Pr1 (agaaaagtgggggatcttcggacctca), Ps.aer R_Pr2 (tggtgtaacgtcaaaacagcaaggat taactt) и 2,5-ную реакционную смесь в присутствии SYBR Green I (ООО «СИНТОЛ»), согласно инструкции производителя.

Определение антимикробной активности и количественное определение МПК химических соединений проводили с использованием референтного метода микроразведений в бульоне МюллераХинтона (Mueller-Hinton Broth, HiMedia, Индия). Основные растворы химических соединений готовили для анализа из имевшихся навесок тестируемых веществ в стерильных флаконах, которые растворяли в 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО) с вычислением процентной концентрации (С%, %). Затем готовили рабочие растворы путем двукратных последовательных разведений основных растворов в бульоне Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия). Для каждого соединения было приготовлено 7 последовательных разведений (мг/л), которые использовали в день их приготовления. Инокулюм готовили путем суспендирования в физиологическом растворе 4–5 морфологически однородных колоний, выросших на чистой неселективной твердой питательной среде, инкубированной при 37°C в течение 18–24 ч, и доводили суспензию до мутности, эквивалентной 0,5 стандарта МакФарланд ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Далее приготовленный инокулюм разводили в бульоне Мюллера-Хинтона (разведение 1:100), чтобы получить необходимую плотность микробной культуры 5×10^6 КОЕ/мл.

Для контроля роста всех проверяемых штаммов микроорганизмов обязательно ставили положительный контрольный образец (ПКО) в лунке, содержащей 50 мкл бульона и инокулюма соответствующего микроорганизма без химического соединения или растительного экстракта. Аналогично, лунка, содержащая 50 мкл питательного бульона без химического соединения или растительного экстракта, была использована как неинокулированная лунка отрицательного контрольного образца (ОКО). Планшеты для микроразведений перед инкубацией заклеивали прозрачной пленкой и запечатывали в полиэтиленовые пакеты для предотвращения высушивания. Термостатировали в течение 16–20 ч при 37°C. Результаты учитывали только при наличии достаточного роста испытуемого микроорганизма в положительном контроле, а также при отсутствии

бактериального роста в отрицательном контроле. Бактериальный рост контролировали путем измерения оптической плотности клеток на приборе EnSpire Model 2300 Multilabel Microplate Reader (Perkin Elmer, США) при длине волны 655 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках настоящего исследования была сформирована база данных с профилями клинических штаммов микроорганизмов с информацией о чувствительности/резистентности к тестируемым химическим соединениям и к определенным классам антибиотиков: пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, фторхинолоны, аминогликозиды, тетрациклины и другие антимикробные препараты.

Таким образом были составлены антибиотикограммы для 128 тестируемых штаммов по отношению к АМП различных групп, которые, в свою очередь, имеют разные механизмы действия (рис.3). Полученные данные были необходимы для анализа мультирезистентности штаммов, поскольку в дальнейшем именно они были использованы для скринговых исследований.

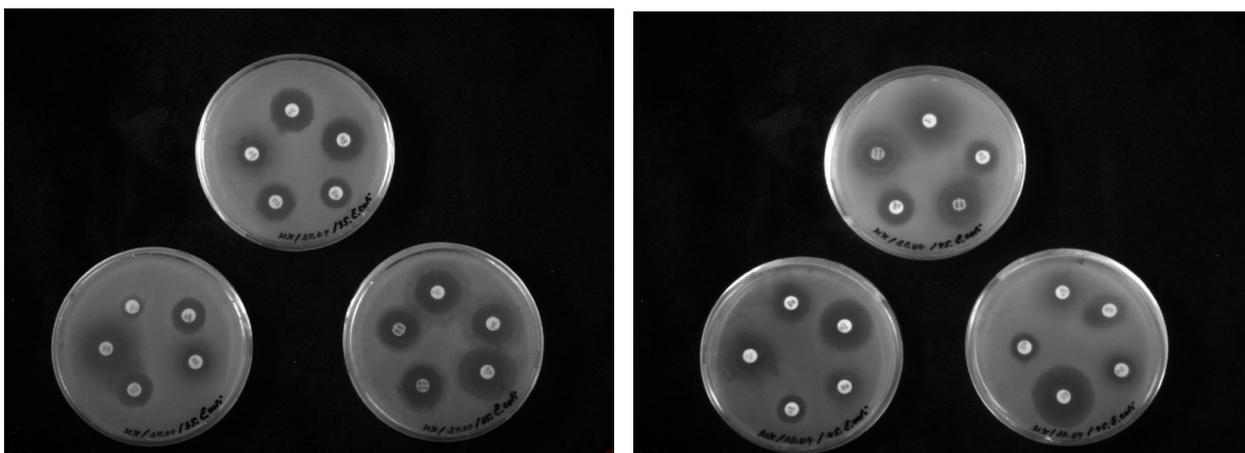


Рис.4,5. Результаты проверки клинических штаммов *38K/M Citrobacter koseri*, *36K/P Morganella morganii* на 15 антибиотиках различных групп. Изображение получено с помощью Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System (Bio-Rad).

Для комплексной оценки был разработан способ определения антимикробной активности с использованием штаммов бактерий *ΔtolC Escherichia coli*, трансформированных плазмидными векторами, несущими гены антибиотикорезистентности.

Для изучения механизмов действия новых химических соединений с антимикробными свойствами выполняли поиск генов устойчивости к различным группам известных антибиотиков, а также плазмидных векторов, содержащих эти гены. Для работы было отобрано 8 генов резистентности к ампициллину (гены *D2I9G2*, *D2I9G2*), гентамицину (*aac2i*), канамицину (*aph3viii*, *aph*), спектиномицину (*ant3ia*, *aad9*) и стрептомицину (*aadA1*). Была сформирована коллекция из 8 штаммов бактерий *ΔtolC E. coli*, трансформированных плазмидными векторами, несущими исследуемые гены антибиотикорезистентности. Изучение антимикробной активности проводили с применением диско-диффузионного метода на агаре Мюллера-Хинтона («HiMedia», Индия) и соответствующих тестовых штаммов *ΔtolC E. coli*.

Табл.1. Список плазмидных векторов, содержащих исследуемые гены антибиотикорезистентности

Антибиотик	Механизм действия	Ген устойчивости	Воздействие на антибиотик	Плаزمида
Ampicillin	penicillin binding protein (PBP), cell wall synthesis inhibitor	<i>D2I9G2</i>	Class A beta-lactamase	pJKR-L-mphR (Plasmid #62560)
Kanamycin	16S rRNA of 30S ribosomal subunit, protein synthesis inhibitor	<i>aph3viii</i>	Aminoglycoside O-phosphotransferase, which modifies aminoglycosides by phosphorylation	pRC319 (Plasmid #61272)

Антибиотик	Механизм действия	Ген устойчивости	Воздействие на антибиотик	Плазмида
Streptomycin	16S rRNA of 30S ribosomal subunit, protein synthesis inhibitor	<i>aadA1</i>	Aminoglycoside O-phosphotransferas, which modifies aminoglycosides by phosphorylation	pCas1+2 (Plasmid #72676)
Gentamicin	They act to inhibit protein synthesis	<i>aac2i</i>	Aminoglycoside N-acetyltransferase, which modifies aminoglycosides by acetylation.	pRU1097 (Plasmid #14462)
Kanamycin	16S rRNA of 30S ribosomal subunit, protein synthesis inhibitor	<i>aph</i>	Aminoglycoside 3'-phosphotransferase	pTC223 (Plasmid #70019)
Ampicillin	penicillin binding protein (PBP), cell wall synthesis inhibitor	<i>D2I9G2</i>	Class A beta-lactamase	pEAHISMRSA0482 (Plasmid #96968)
Spectinomycin	16S rRNA of 30S ribosomal subunit, protein synthesis inhibitor	<i>ant3ia</i>	Aminoglycoside O-nucleotidyltransferase, which modifies aminoglycosides by adenylation	pSkunk3-BLA (Plasmid #61531)
Spectinomycin	16S rRNA of 30S ribosomal subunit, protein synthesis inhibitor	<i>aad9</i>	Aminoglycoside O-nucleotidyltransferase, which modifies aminoglycosides by adenylation	pMAL_dstβL (Plasmid #73805)
Ampicillin	penicillin binding protein (PBP), cell wall synthesis inhibitor	<i>D2I9G2</i>	Class A beta-lactamase	pSIM24 KanR (Plasmid # 67583)

При тестировании 27 соединений – производных хиназолина с использованием сформированной коллекции по росту на питательной среде, засеянной тем или иным штаммом, удавалось определять механизм действия конкретного соединения. Для 15,2% соединений, обладающих лабораторно подтвержденной низкой цитотоксичностью, был характерен механизм, аналогичный группе антибиотиков аминогликозидного ряда – ингибирование синтеза белка (ген *aac2i*, *pRU1097*), для 36,2% соединений – механизм действия антибиотиков пенициллинового ряда – ингибирование синтеза клеточной стенки (ген *D2I9G2*, *pJKR-L-mphR*), для остальных веществ механизм действия определить не удалось. Хиназолины являются перспективным классом биологически активных азотсодержащих гетероциклических соединений с разнообразными терапевтическими и фармакологическими свойствами, поэтому изучение таких молекул является перспективной задачей в рамках поиска новых антимикробных соединений.

Проведённый мониторинг чувствительности тест-штаммов к АМП позволил констатировать общие тенденции нарастания антибиотикорезистентности изученных патогенов. Все изученные нами виды обладали разными антибиотикограммами к традиционным препаратам и значительной вариабельностью по чувствительности к антибиотикам с выраженной полирезистентностью. Однако удалось выделить молекулы-хиты. При отборе молекул – прямых аналогов носкапина с использованием репортерной системы *pDualrep2* повышенную активность в отношении клинических штаммов проявляли сразу несколько соединений (площадь ингибирования >20 мм) (механизм - low signal SOS +T). Соединения показали относительно высокую активность - МИК=23,3 мкМ), а также существенно ингибировали рост многих патогенных микроорганизмов (табл.2).

Табл.2. Антимикробная активность прямых аналогов носкапина

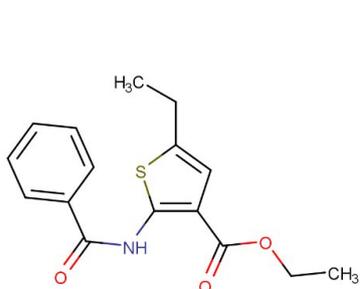
Штамм	Вещество 21782	Штамм	Вещество 21782
<i>E. coli</i> mx7	++	<i>C. koseri</i> R38	+
<i>E. cloacae</i> O3	+	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	++	<i>H. alvei</i> O31	++
<i>Aeromonas sp.</i> O9	++	<i>P. vulgaris</i> O41	+
<i>M. morgani</i> R36	++	<i>C. albicans</i> 181210169-1	++
<i>P. aeruginosa</i> R42	++	<i>E. aerogenes</i> R41	+
<i>K. pneumoniae</i> 181210171-2	+	<i>K. oxytoca</i> R48	+
<i>Enterobacter sp.</i> O54	+	<i>S. aureus</i> ATCC USA 206	++
<i>Proteus sp.</i> O14	++	<i>B. subtilis</i> 3HM	++

Носкапин представляет собой фталид изохинолина, ненаркотический алкалоид, получаемый из опийного мака *Papaver somniferum*, обладающий слабым обезболивающим, противокашлевым и потенциальным противоопухолевым действием. Алкалоид оказывает свое противокашлевое действие за счет активации сигма-опиоидных рецепторов, антимитотическое действие - путем связывания с тубулином, что приводит к нарушению динамики сборки микротрубочек и, как следствие, к ингибированию митоза и гибели опухолевых клеток.

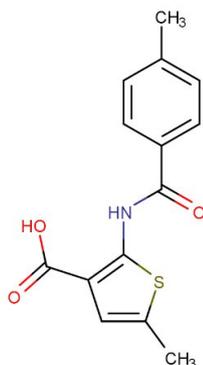
Хиназолины – перспективный класс биологически активных азотсодержащих гетероциклических соединений с разнообразными терапевтическими и фармакологическими свойствами. При отборе активных молекул – производных хиназолина и амидов аминотиофенкарбоновой кислоты, были получены интересные данные сразу для трех соединений.

Известно, что производные хиназолина могут обладать противоопухолевой активностью, действуя в качестве ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназы и ингибитора рецепторных тирозинкиназ, которые играют ключевую роль в распознавании, передаче и амплификации

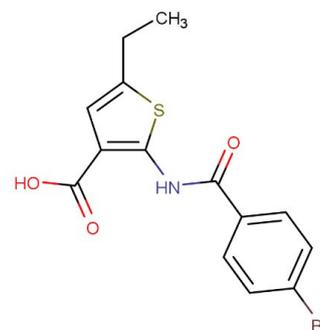
клеточных сигналов, например, к пролиферации, дифференцировке и миграции клеток. Амиды аминотиофенкарбоновой кислоты, в свою очередь, обладают ингибирующим действием по отношению к фосфодиэстеразе V и могут применяться для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы.



2-хлор-6-метокси-3,5-
дифенилпиазин



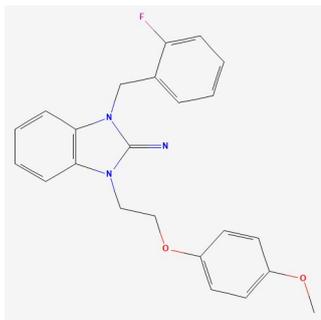
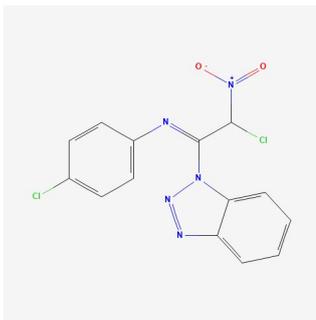
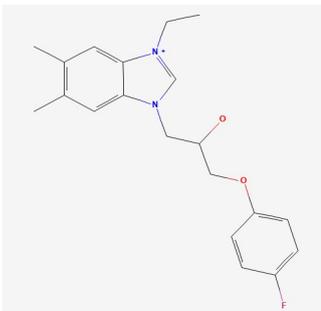
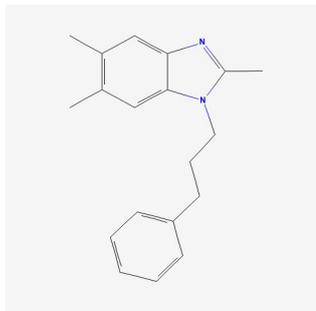
5-метил-2-[(4-
метилбензоил)амино]т
иофеновая-3-
карбоновая кислота



2-[(4-
бромбензоил)амино]-5-
этилтиофен-3-
карбоновая кислота

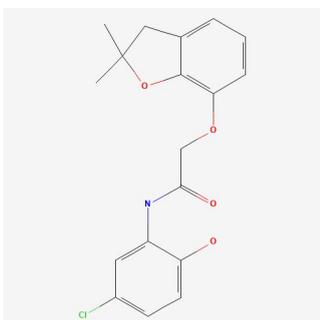
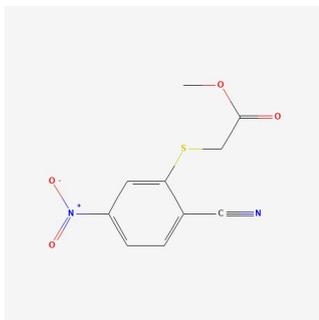
Тестируемое соединение STOCK1S-77499 (2-[(4-бромбензоил)амино]-5-этилтиофен-3-карбоновая кислота) обладало сильной ингибирующей способностью (площадь ингибирования >20 мм, МИК=35,3 мкМ) при тестировании на Δ tolC-pDualrep2 (механизм – неизвестен).

Тестирование производных бензимидазола и бензотриазола с использованием репортерной конструкции и коллекции тестовых штаммов показало, что тестируемые соединения 4745-0035, 4872-0739, 5103-0525, D277-1686 (ChemRar) обладали сильной ингибирующей способностью (площадь ингибирования > 16 мм) при тестировании на Δ tolC-pDualrep2 (механизм – неизвестен). Согласно литературным данным, производные бензимидазола и бензотриазола обладают противогрибковой, противовирусной и противопаразитарной активностями, а также предотвращают образование биопленки бактериальных патогенов (особенно *Ps. aeruginosa* и *S. aureus*).

1**3****2****4**

- 1:** 1-[(2-фторфенил)метил]-3-[2-(4-метоксифенокси)этил]-2,3-дигидро-1H-1,3-бензодиазол-2-имид
2: (1z)-1-(1h-1,2,3-бензотриазол-1-ил)-2-хлоро-п-(4-хлорфенил)-2-нитроэтан-1-имин
3: 3-этил-1-[3-(4-фторфенокси)-2-гидроксипропил]-5,6-диметил-1H-1,3-бензодиазол-3
4: 2,5,6-триметил-1-(3-фенилпропил)-1H-1,3-бензодиазол

Тестируемые соединения F217-0169, 8010-7785 (ChemRar) как производные сульфонамидов, карбоксамидов и бензофурана обладали сильной ингибирующей способностью: F217-0169 - площадь ингибирования > 16 мм, при тестировании на ΔtolC-pDualrep2 механизм – неизвестен, 8010-7785 - площадь ингибирования > 20 мм, при тестировании на репортерном штамме механизм – high signal SOS.

1**2**

- 1:** п-(5-хлор-2-гидроксифенил)-2-[(2,2-диметил-2,3-дигидро-1-бензофуран-7-ил)окси]ацетамид
2: метил 2-[(2-циано-5-нитрофенил)сульфанил]ацетат

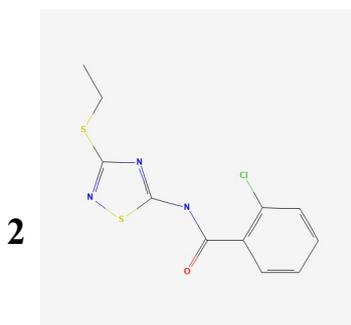
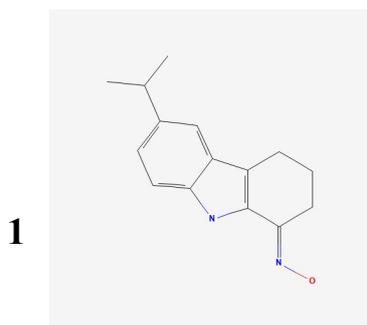
Биологические свойства соединений:

– производные сульфонамидов - антимикробная активность (задерживают рост и развитие бактерий, нарушая синтез фолиевой кислоты и ингибируя карбоангидразу), противовоспалительные и жаропонижающие свойства;

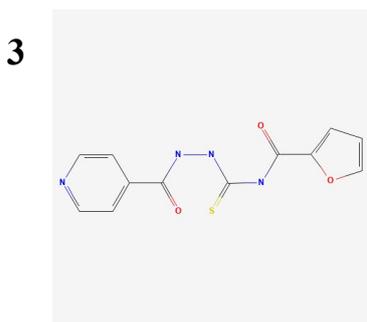
– производные карбоксамидов - подавление жизнедеятельности фитопатогенных грибов (за счёт ингибирования фермента сукцинатдегидрогеназы в митохондриях), противовирусная и противоопухолевая активность;

– бензофурановые соединения - противоопухолевая, антибактериальная, антиоксидантная и противовирусная активность.

Тестируемые соединения 5813-0354, F333-0094, 8019-9854 (ChemRar) как производные карбазола, бензамидов и карбоксамидов обладали сильной ингибирующей способностью: 5813-0354, F333-0094 - площадь ингибирования > 16 мм, при тестировании на $\Delta tolC$ -pDualrep2 механизм – неизвестен, 8019-9854 - площадь ингибирования > 20 мм, при тестировании на репортерном штамме механизм – average signal T.



1: n-[(1e)-6-(пропан-2-ил)-2,3,4,9-тетрагидро-1h-карбазол-1-ил]денгидроксиламин
2: 2-хлоро-n-[3-(этилсульфанил)-1,2,4-тиадиазол-5-ил]бензамид
3: n-({[(фуран-2-ил)формамидо]метантиоил}амино)пиридин-4-карбоксамид



Биологические свойства соединений:

– производные карбазола – противоопухолевая (прим., карбазол содержится в препаратах - эллиптицин, N-метилкарбазол-3-карбоксамид, карбазомицин А, карбазомицин В и карбазостатин А), нейропротекторная, противомикробная, антигистаминная, антиоксидантная, противовоспалительная и антикоагулянтная активность;

– производные бензамидов – антипсихотическая активность, нормализация моторики желудочно-кишечного тракта, противорвотное действие;

– производные карбоксамидов – противогрибковая (используются в качестве фунгицидов) и противовирусная активность (некоторые производные проявляют активность против вирусов гриппа и простого герпеса).

ВЫВОДЫ

1. Сформирована коллекция из 9 штаммов бактерий $\Delta tolC$ *Escherichia coli*, трансформированных плазмидными векторами, несущими исследуемые гены антибиотикорезистентности, которые могут быть использованы для определения механизма действия антибиотика.

2. Проведена кластеризация молекул-хитов, отобранных из большого пула химических соединений, характеризующихся низким сходством по структуре и являющихся производными ряда соединений - бензимидазола, бензотриазола, карбазола, сульфонамидов, карбоксамидов, бензофурана, бензамидов, сульфаниламидов и карбоксамидов.

3. Получена раскладка по фенотипу для каждого клинического штамма коллекции в ходе верификации и валидации полученных антибиотикограмм с использованием цифровой системы AMRexpert.

4. Проанализированы профили резистентности изолятов уропатогенных бактерий и возбудителей ИСМП в отношении тестируемой выборки молекул с разными механизмами действия.

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. **Швец (Филяева) К.Ю.**, Ахметова Г.Р., Баймиев Ал.Х., Кулуев Б.Р., Мавзютов А.Р., Баймиев А.Х., Хабирова А.Д., Закирова Г.Н., Хасанова Г.Ф. Метод микроразведений – универсальный способ определения минимальных ингибирующих концентраций веществ различной природы // Бактериология. 2019. 4(3). 7–13.

2. Ivanenkov Y.A., Yamidanov R.S., Osterman I.A., Sergiev P.V., Aladinskiy V.A., Aladinskaya A.V., Terentiev V.A., Veselov M.S., Ayginin A.A., Skvortsov D.A., Komarova K.S., Zagribelnyy B.A., Baimiev Al.Kh., **Shvetc (Filyaeva) K.Y.**, Baimiev An.Kh., Sofronova A.A., Machulkin A.E., Petrov R.A., Zainullina L.F., Maximova M.A., Zileeva Z.R., Vakhitova Y.V., Bezrukov D.S., Puchinina M.M., Dontsova O.A. Large-scale high-throughput screening revealed 5'-(carbonylamino)-2,3'-bithiophene-4'-carboxylate as a novel template for antibacterial agents // Current Drug Discovery Technologies. 2020. 17(5). 716-724.

3. Ivanenkov Ya. A., **Filyaeva K. Yu.**, Matniyazov R.T., Baymiev A.Kh., Baymiev Al.Kh., Vladimirova A.A., Yamidanov R.S., Mavzyutov A.R., Zileeva Z.R., Zainullina L.F., Vakhitova J.V., Marina V.I., Terentiev V.A., Osterman I.A., Kartsev V.G., Bezrukov D.S., Dontsova O.A. Antibacterial activity of nospapine analogs // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2021. 43(4). 128055.

4. Баймиев А.Х., Владимирова А.А., Матниязов Р.Т., Лавина А.М., **Филяева К.Ю.**, Акимова Е.С., Баймиев Ал.Х. Распространенность способности подавления роста родственных штаммов у ризобий // Микробиология. 2023. 92(6). 625-630.

Патенты и программы:

5. Мавзютов А.Р., **Филяева К.Ю.**, Баймиев Ал.Х., Баймиев А.Х., Хасанова Г.Ф., Хабирова А.Д. Прецизионный способ сравнительной экспресс-оценки эффективности антимикробных веществ в отношении условно патогенного вида *Pseudomonas aeruginosa* // Патент на изобретение RU 2760788 С1, 30.11.2021. Заявка № 2021113954 от 17.05.2021.

Другие публикации:

6. **Швец (Филяева) К.Ю.**, Ахметова Г.Р., Кулуев Б.Р. Антибактериальная активность гексановых экстрактов растений-продуцентов латекса // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. 2019. 1142-1146.

7. **Швец (Филяева) К.Ю.**, Баймиев Ал.Х., Мавзютов А.Р., Баймиев А.Х., Матниязов Р.Т., Хабирова А.Д., Гарипова З.Р., Хасанова Г.Ф. Изучение антимикробной активности новых антибактериальных соединений в отношении условно-патогенных микроорганизмов // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2019. 3. 28-35.

8. Кулуев Б.Р., Ахметова Г.Р., **Швец (Филяева) К.Ю.**, Мулдашев А.А., Мавзютов А.Р., Чемерис А.В. Выявление антимикробной активности у потенциальных каучуконосов флоры Южного Урала // Биомика. 2019. Т.11(1). С. 71 - 85.

9. Хабирова А.Д., **Швец (Филяева) К.Ю.**, Хакимова Л.Р., Баймиев Ал.Х., Мавзютов А.Р. Экспериментальная оценка панели генно-инженерных калибраторов для количественной оценки антимикробной активности химических соединений на платформе ПЦР в режиме реального времени в отношении *Pseudomonas aeruginosa* // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2019. 3. 23-31.

10. **Швец (Филяева) К.Ю.**, Хабирова А.Д. Изучение антимикробной активности новых антибактериальных соединений в отношении условно-

патогенных микроорганизмов // Сборник материалов Международного молодежного форума «Ломоносов-2019». 8-12 апреля 2019 г., Москва. С. 1-2.

11. Хабилова А.Д., **Швец (Филяева) К.Ю.** Разработка панели генно-инженерных калибраторов для количественной оценки антимикробной активности химических соединений на платформе ПЦР в режиме реального времени в отношении *Pseudomonas aeruginosa* // Сборник материалов Международного молодежного форума «Ломоносов-2019». 8-12 апреля 2019 г., Москва. С. 1-2.

12. **Швец (Филяева) К.Ю.**, Баймиев Ал.Х. Изучение антимикробной активности новых молекул-антибиотиков в отношении возбудителей внебольничных и нозокомиальных инфекций. // Сборник материалов Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы адаптации микроорганизмов к различным условиям среды обитания». 4-7 июня 2019 г., Иркутск. С. 133-136.

13. Владимирова А.А., Акимова Е.С., Матниязов Р.Т., Лавина А.М., **Филяева К.Ю.**, Баймиев Ал.Х. Антимикробные соединения в регуляции численности клубеньковых бактерий // Сборник тезисов II Всероссийской школы-конференции «Сохранение и преумножение генетических ресурсов микроорганизмов». 26–27 июня 2023 г., Санкт-Петербург. С. 28-29.

14. Баймиев Ал.Х., Владимирова А.А., Матниязов Р.Т., **Филяева К.Ю.** Антибактериальные соединения в регуляции микробных сообществ ризобий // Материалы 3-ей Международной научной конференции PLAMIC2022 «Растения и микроорганизмы: биотехнология будущего». 3-8 октября 2022 г., Санкт-Петербург. С. 219.

15. Баймиев Ал.Х., Владимирова А.А., Матниязов Р.Т., Лавина А.М., **Филяева К.Ю.** Растение регулирует синтез антибактериальных соединений ризобиями // Сборник материалов X Съезда общества физиологов растений России Всероссийской научной конференции с международным участием «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата». 18-23 сентября 2023 г., Уфа. С. 59.

16. **Филяева К.Ю.,** Матниязов Р.Т, Тамарова Э.Р., Баймиев Ал.Х. Новые методы исследования антимикробной активности перспективных молекул антибиотиков // Материалы IX Всероссийского конгресса по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXVIII Кашкинские чтения). 5-6 июня 2025 г., Санкт-Петербург, с. 273.