

О. Г. Сечко¹, В. М. Царенков¹, Е. Н. Калиниченко², Т. С. Божок²

СКРИНИНГОВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ КОНЪЮГАТОВ БЕНЗАМИДА В ОТНОШЕНИИ *Mycobacterium terrae* И НЕКОТОРЫХ ДРУГИХ ПАТОГЕНОВ

¹Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, Республика Беларусь

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

Цель – провести скрининговые исследования антимикробной активности новых синтетических конъюгатов бензамида, полученных из изо-/терефталевой кислот и содержащих фрагменты 3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)анилина, 3-(трифторметил)анилина и 2(3)-фторбензоилпиперазина в отношении *Mycobacterium terrae* 15755, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 и *Candida albicans* ATCC 10231. Исследование противотуберкулезной активности соединений проводили на штамме *Mycobacterium terrae* 15755 с использованием метода разведений в плотной питательной среде в чашках Петри. Исследование антимикробной активности проводили с использованием метода диффузии в агар на 5 чистых культурах микроорганизмов, которые входят в перечень приоритетных патогенных микроорганизмов для исследования и разработки новых антибиотиков в борьбе с лекарственно-устойчивыми бактериальными инфекциями: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, – и на 1 чистой культуре для исследования противогрибковой активности – дрожжах *Candida albicans* ATCC 10231. По результатам исследования противотуберкулезной активности *in vitro* установлено, что 5 из 8 исследуемых соединений подавляют рост *Mycobacterium terrae* в такой же концентрации, как и противотуберкулезный препарат I ряда рифампицин в условиях эксперимента. По результатам исследования антимикробной активности установлено, что изученные соединения не проявляют антимикробную активность *in vitro* в отношении всех исследуемых штаммов и не проявляют противогрибковую активность в отношении *Candida albicans*.

Ключевые слова: синтетические конъюгаты бензамида, противотуберкулезная активность, антимикробная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно статистическим данным ВОЗ, инфекционные заболевания входят в десятку основных причин смерти во всем мире, поэтому для их лечения и профилактики необходимы эффективные антимикробные средства. Противомикробные препараты используются для борьбы с инфекционными заболеваниями, при хирургических вмешательствах, являются частью химиотерапии и включают антибиотики, противовирусные, противогрибковые и противопаразитарные препараты. Острая необходимость в новых противомикробных препаратах обусловлена способностью микроорганизмов эволюционировать, изменять гены, адаптироваться,

утрачивать восприимчивость к лечению и продолжать размножаться в присутствии противомикробного средства. Причем эволюционные изменения на уровне микроорганизмов происходят очень стремительно и значительно быстрее, чем на уровне человеческого организма. Это явление называется резистентностью микроорганизмов к противомикробным препаратам, именно оно затрудняет лечение инфекций и повышает риск распространения и тяжелого течения инфекционных болезней [1, 2]. Особенно опасным является быстрое распространение среди людей и животных бактерий с множественной и широкой лекарственной устойчивостью, которые вызывают инфекции, сложно поддающиеся или вообще не поддающиеся лечению

существующими противомикробными препаратами. Резистентность к противомикробным препаратам увеличивается из-за их неправильного и чрезмерного использования. Следствиями лекарственной устойчивости микроорганизмов являются увеличение расходов на лечение, более продолжительные сроки госпитализации и увеличение смертности. Среди ныне используемых антибактериальных препаратов встречаются группы препаратов, к которым у микроорганизмов быстро развивается устойчивость – это тетрациклины, пенициллины, сульфаниламиды, макролиды, фторхинолоны и цефалоспорины первых поколений [3, 4].

В 2017 году ВОЗ опубликовала перечень приоритетных патогенных микроорганизмов для исследования и разработки новых антибиотиков в борьбе с лекарственно-устойчивыми бактериальными инфекциями, включая туберкулез. Этот перечень был составлен группой независимых экспертов под руководством ВОЗ для привлечения внимания медицинского научного сообщества к необходимости разработки инновационных препаратов для борьбы с этими лекарственно-устойчивыми бактериями. Перечень приоритетных патогенных микроорганизмов включает 12 родов бактерий, разделенных на 3 группы в соответствии с приоритетом в необходимости разработки: микроорганизмы в критическом приоритете, в высоком приоритете и в среднем приоритете.

К микроорганизмам в критическом приоритете относятся: устойчивый к рифампицину, устойчивый только к одному противотуберкулезному препарату первого ряда, полирезистентный, с множественной (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) *Mycobacterium tuberculosis*, устойчивый к карбапенемам *Acinetobacter baumannii*, устойчивый к карбапенемам *Pseudomonas aeruginosa* и устойчивые к карбапенемам и к третьему поколению цефалоспоринов бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*).

К микроорганизмам в высоком приоритете относятся: устойчивый к ванкомицину *Enterococcus faecium*, устойчивый к кларитромицину *Helicobacter pylori*, устойчивые к фторхинолонам бактерии рода *Salmonella*, устойчивый к ванкомицину и к метициллину *Staphylococcus*

aureus, устойчивые к фторхинолонам бактерии рода *Campylobacter* и устойчивый к третьему поколению цефалоспоринов и к фторхинолонам *Neisseria gonorrhoeae*.

К микроорганизмам в среднем приоритете относятся: устойчивый к пенициллину *Streptococcus pneumoniae*, устойчивый к ампициллину *Haemophilus influenzae* и устойчивые к фторхинолонам бактерии рода *Shigella*.

Кроме того, актуальной является разработка препаратов, эффективных против бактерий, несущих ген, кодирующий фермент NDM-1 (металло-бета-лактамаза из Нью-Дели-1). Фермент NDM-1 обеспечивает устойчивость бактерий к широкому спектру антибиотиков, которые сегодня являются препаратами последней надежды при лечении лекарственно-устойчивых бактериальных инфекций [1].

Устойчивые штаммы *Mycobacterium tuberculosis* серьезно затрудняют лечение туберкулеза. По сравнению с нерезистентным туберкулезом для лечения туберкулеза с МЛУ и ШЛУ требуются более продолжительные и гораздо более дорогостоящие схемы лечения. Успешность лечения туберкулеза с МЛУ в Республике Беларусь составляет 56%. Несмотря на огромные усилия по совершенствованию химиотерапии туберкулеза в нашей стране и во всем мире, проблема лечения пациентов с туберкулезом на сегодняшний день окончательно не решена [5, 6].

По данным ВОЗ, в 2021 году на этапе клинических исследований находилось 43 антибиотика для борьбы с патогенными микроорганизмами, включенными ВОЗ в список приоритетных патогенов. Во всем мире наблюдаются высокие показатели устойчивости к антибиотикам, используемым для лечения таких распространенных бактериальных инфекций, как инфекции мочевыводящих путей, сепсис, инфекции, передаваемые половым путем и некоторые формы диареи. Так, в странах, представляющих данные в «Глобальную систему эпиднадзора за устойчивостью к противомикробным препаратам» («GLASS»), частота случаев устойчивости к антибиотикам ципрофлоксацину, обычно применяемому для лечения инфекций мочевыводящих путей, находится в диапазоне от 8,4% до 92,9% для *Escherichia coli* и от 4,1% до 79,4% для *Klebsiella pneumoniae*. Во всех регионах мира распространилась устойчи-

вость *Klebsiella pneumoniae* к препаратам последнего резерва – антибиотикам класса карбапенемов. *Klebsiella pneumoniae* является одной из ведущих причин внутрибольничных инфекций, таких как пневмония и инфекции кровотока, и поражает новорожденных и пациентов отделений интенсивной терапии. На сегодняшний день более половины пациентов, инфицированных *Klebsiella pneumoniae*, не могут использовать для лечения карбапенемы. Широко распространена устойчивость *Escherichia coli* к фторхинолонам, используемых для лечения инфекций мочевыводящих путей. Колистин является единственным препаратом, подходящим для лечения опасных для жизни инфекций, вызываемых карбапенем-устойчивыми *Escherichia coli* и бактериями рода *Klebsiella*. В ряде стран и регионов уже выявлены колистин-резистентные бактерии, вызывающие инфекции, против которых не имеется эффективных антибиотиков. Бактерии *Staphylococcus aureus*, входящие в состав микрофлоры кожи человека, вызывают распространение инфекций в медицинских учреждениях и в быту. Вероятность смерти больного, инфицированного метициллин-резистентной *Staphylococcus aureus*, по сравнению с пациентом, инфицированным чувствительной к метициллину *Staphylococcus aureus*, выше на 64% [7]. С 2019 года в системе мониторинга ЦУР (цели устойчивого развития) отслеживается новый показатель, связанный с устойчивостью к противомикробным препаратам. Этот показатель используется для мониторинга частоты возникновения инфекций кровотока, вызванных двумя лекарственно-устойчивыми возбудителями: метициллин-резистентной *Staphylococcus aureus* (MRSA) и *Escherichia coli*, устойчивой к цефалоспорином третьего поколения [8].

Распространенность лекарственно-устойчивых грибковых инфекций растет, усугубляя и без того сложную ситуацию с их лечением. Наиболее распространенным механизмом грибковой резистентности является активация мембранных эффлюксных насосов, которые распознают различные химические вещества и способствуют множественной лекарственной устойчивости. У грибов есть несколько различных систем вывода лекарственных средств, которые кодируются более чем десятью различными генами. Мутации в

каждом из этих генов влияют на степень резистентности возбудителя к препарату [9]. Возбудителем одной из наиболее распространенных инвазивных грибковых инфекций является *Candida auris*, многие штаммы которого представляют собой лекарственно-устойчивые формы. У *Candida auris* сформирована резистентность к флуконазолу, амфотерицину В и вориконазолу и зарегистрирована растущая резистентность к каспофунгину. Это приводит к появлению новых случаев заражения трудноизлечимыми грибковыми инфекциями, увеличению сроков госпитализаций и необходимости использования более дорогостоящих схем лечения [10].

Устойчивость к антибиотикам ставит под угрозу достижения современной медицины. В мае 2015 года Всемирная ассамблея здравоохранения утвердила Глобальный план действий по устойчивости к противомикробным препаратам, включающий и устойчивость к антибиотикам. Одна из стратегических задач глобального плана действий по устойчивости к противомикробным препаратам – усилить научные исследования. По прогнозам ВОЗ, к 2050 году мировая смертность от инфекционных заболеваний, не поддающихся антибактериальной терапии, составит 10 млн. человек в год и выйдет на одно из первых мест наряду с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями [4]. Поэтому поиск новых антимикробных соединений является важной и актуальной задачей.

Цель настоящего исследования – провести скрининговые исследования антимикробной активности новых синтетических конъюгатов бензамида, полученных из изо-/терефталевой кислот и содержащих фрагменты 3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)анилина, 3-(трифторметил)анилина и 2(3)-фторбензоилпиперазина в отношении *Mycobacterium terrae* 15755, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 и *Candida albicans* ATCC 10231.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования – восемь конъюгатов бензамида, полученных из изо-

мерных фталевых кислот и содержащих остатки гетероциклических соединений, в частности 3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)анилина и 3-(трифторметил)анилина, а также 2(3)-фторбензоилпиперазин, которые были синтезированы в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», и препарат I ряда для лечения туберкулеза – рифампицин [11] – в качестве препарата сравнения.

В предыдущих работах нами установлено, что одно из производных бензамида, которое в данной работе обозначено как соединение № 1 – 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид – в концентрации 200 мкг/мл, также как и рифампицин, полностью подавляет рост штамма *Mycobacterium terrae* 15755 [12]. Поэтому было принято решение исследовать близкие по структуре соединения.

Соединения № 1–№ 4 являются структурными изомерами состава $C_{26}H_{21}O_3N_3F_4$ (таблица 1). Соединения № 1 и № 2 получают из изофталевой кислоты и содержат остатки 3-(трифторметил)анилина и 2(3)-фторбензоилпиперазина. Между собой соединения № 1 и № 2 различаются только положением атома фтора в остатке фторбензоилпиперазина. В соединении № 1 атом фтора находится в орто-положении, а в соединении № 2 – в мета-положении. Соединения № 3 и № 4 получают из терефталевой кислоты и содержат остатки 3-(трифторметил)анилина и 2(3)-фторбензоилпиперазина. Между собой соединения № 3 и № 4 различаются только положением атома фтора в остатке фторбензоилпиперазина. В соединении № 3 атом фтора находится в орто-положении, а в соединении № 4 – в мета-положении.

Соединения № 5–№ 8 являются структурными изомерами состава $C_{30}H_{25}O_3N_5F_4$ (таблица 1). Принципиальное отличие этой группы соединений от предыдущей – наличие в их структуре гетероциклического остатка 4-метил-1H-имидазола, который присоединен к 5-ому атому углерода трифторметилфенильного остатка. Соединения № 5 и № 6 получают из изофталевой кислоты и содержат остатки 3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)анилин и 2(3)-фторбензоилпиперазина. Между собой соединения № 5 и № 6 различаются

только положением атома фтора в остатке фторбензоилпиперазина. В соединении № 5 атом фтора находится в орто-положении, а в соединении № 6 – в мета-положении. Соединения № 7 и № 8 получают из терефталевой кислоты и содержат остатки 3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)анилин и 2(3)-фторбензоилпиперазина. Между собой соединения № 7 и № 8 различаются только положением атома фтора в остатке фторбензоилпиперазина. В соединении № 7 атом фтора находится в орто-положении, а в соединении № 8 – в мета-положении.

Исследование противотуберкулезной активности производных бензамида проводили на штамме *Mycobacterium terrae* 15755 с использованием метода разведений в плотной питательной среде в чашках Петри. Данный штамм является непатогенным и рекомендован для использования в качестве модельного для определения противотуберкулезной активности [13]. Для оценки противотуберкулезной активности использовали визуальную оценку роста *Mycobacterium terrae* в плотной питательной среде в чашках Петри. Метод серийных разведений основан на создании последовательных разведений изучаемого вещества в питательной среде в порядке геометрической или арифметической прогрессий. В нашем эксперименте концентрация изучаемых соединений в ряду серийных разведений убывала в геометрической прогрессии с коэффициентом 2. Для этого готовили исходный раствор исследуемого соединения в диметилсульфоксиде (ДМСО) с концентрацией 2000 мкг/мл, который затем добавляли в питательную среду Миддлбука 7Н9 с глицерином (Middlebrook 7Н9 Broth with Glycerol) для получения требуемых концентраций (200 и 100 мкг/мл). Для получения концентрации изучаемого соединения 200 мкг/мл исходный раствор изучаемого соединения в ДМСО объемом 2 мл с концентрацией 2000 мкг/мл смешивали с питательной средой Миддлбука 7Н9 с глицерином объемом 18 мл, то есть в объемном соотношении 1:9. Для получения концентрации изучаемого соединения 100 мкг/мл исходный раствор изучаемого соединения в ДМСО объемом 1 мл с концентрацией 2000 мкг/мл смешивали с питательной средой Миддлбука 7Н9 с глицерином

объемом 19 мл, то есть в объемном соотношении 1:19. Раствор рифампицина в ДМСО готовили в таких же концентрациях, как растворы исследуемых веществ – 200 мкг/мл и 100 мкг/мл. Затем культуру *Mycobacterium terrae* высевали во все анализируемые растворы. Для того чтобы установить, оказывает ли влияние растворитель на рост культуры *Mycobacterium terrae*, выполняли контрольный опыт. Для контрольного опыта использовали ДМСО объемом 2 мл, который добавляли в питательную среду Миддлбрука 7Н9 с глицерином объемом 18 мл. Затем культуру *Mycobacterium terrae* высевали в анализируемый раствор. Еще один контрольный опыт выполнялся для контроля роста культуры – для этого в питательную среду Миддлбрука 7Н9 с глицерином объемом 20 мл высевали культуру *Mycobacterium terrae*. Все образцы выдерживали в термостате при 37 °С в течение трех недель. Для каждого соединения эксперимент был выполнен в трех повторах.

Для изучения антимикробной активности соединений были отобраны 5 чистых культур микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, предварительно выращенные на скошенном мясо-пептонном агаре (МПА). Для изучения противогрибковой активности был отобран чистый штамм *Candida albicans* ATCC 10231, предварительно выращенный на скошенном МПА. Антимикробную активность определяли с использованием метода диффузии в агар. Стандартную бактериальную суспензию микроорганизмов готовили на основе стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Для этого в пробирки с выращенной культурой вносили стерильный физиологический раствор, перемешивали и отбирали суспензию культуры в отдельные пробирки. Концентрацию контролировали, измеряя оптическую плотность по денситометру. Доводили концентрацию микроорганизмов до значения 10^8 , сравнивая значение оптической плотности со стандартом по McFarland. Затем разбавляли полученную суспензию микроорганизмов дважды до концентрации 10^6 . На застывший триптон-соевый агар в стерильных условиях в чашки Петри вно-

сили по 1,0 мл соответствующей взвеси микроорганизмов. После равномерного распределения микроорганизмов по всей поверхности агара чашки инкубировали при комнатной температуре в течение 15–20 мин. Затем на чашках с микроорганизмами делали по шесть лунок диаметром 5,0 мм. Далее в пять лунок вносили по 50 мкл раствора исследуемого соединения (концентрация 1000 мкг/мл) и в шестую лунку вносили 50 мкл ДМСО. Чашки Петри инкубировали в течение 24 часов при 37 °С. После чего измеряли диаметр зоны ингибирования роста микроорганизмов. Для каждого соединения эксперимент был выполнен в трех повторах.

Расчет среднего, стандартного отклонения и стандартной ошибки среднего проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2016. Для описания количественного признака «диаметр зоны ингибирования» в совокупности указаны среднее и стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты скринингового исследования противотуберкулезной активности производных бензамида и рифампицина представлены в таблице 1, где показан наблюдаемый рост *Mycobacterium terrae* 15755 в присутствии исследуемых соединений в концентрациях 200 мкг/мл и 100 мкг/мл, в присутствии рифампицина в таких же концентрациях, как исследуемые соединения, и в присутствии только растворителя (ДМСО).

Контроль роста культуры *Mycobacterium terrae* 15755 и контроль роста микобактерий в присутствии только растворителя ДМСО, без добавления исследуемого соединения, представлены на рисунке 1. Растворитель ДМСО не подавляет рост микобактерий.

Соединение №1–3-[4-(2-фторбензоил)-пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид в концентрации 200 мкг/мл подавляет рост микобактерий (рисунок 2). В концентрации 100 мкг/мл соединение №1 обладает бактериостатической активностью, так как наблюдается рост единичных колоний *Mycobacterium terrae* 15755. Полученные результаты совпадают с результатами нашего предыдущего исследования [6].

Таблица 1. – Влияние структуры и концентрации синтезированных производных бензамида на рост *Mycobacterium terrae* 15755 *in vitro* (среда Миддлбука 7Н9 с глицерином)

№	Химическое название соединения	Структурная формула	Концентрация, мкг/мл	
			200	100
1	3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид		-	±
			-	±
			-	±
2	3-[4-(3-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид		-	-
			-	-
			-	-
3	4-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид		-	++
			-	++
			-	++
4	4-[4-(3-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид		+	+++
			+	+++
			+	+++
5	3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)фенил]бензамид		-	-
			-	-
			-	-
6	3-[4-(3-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)фенил]бензамид		-	-
			-	-
			-	-
7	4-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)фенил]бензамид		++	+++
			++	++
			++	+++
8	4-[4-(3-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)фенил]бензамид		-	-
			-	-
			-	-
9	рифампицин		-	-
			-	-
			-	-
10	ДМСО (растворитель)		++++	
11	Контроль роста культуры <i>Mycobacterium terrae</i> 15755		++++	

Примечание: «++++» – обильный рост, «+++» – сильный рост, «++» – слабый рост, «+» – незначительный рост, «±» – единичные колонии, «-» – отсутствие роста



А – рост культуры (контроль), Б – рост в присутствии растворителя ДМСО
 Рисунок 1. – Влияние растворителя ДМСО на рост *Mycobacterium terrae* 15755



Рисунок 2. – Отсутствие роста *Mycobacterium terrae* в присутствии соединения 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид (соединение № 1) в концентрации 200 мкг/мл

Соединение №2 – 3-[4-(3-фторбензоил)-пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)-фенил]бензамид – в концентрации 100 мкг/мл подавляет рост микобактерий (рисунок 3).

Соединение №3 – 4-[4-(2-фторбензоил)-пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)-фенил]бензамид – в концентрации 200 мкг/мл подавляет рост микобактерий (рисунок 4). В концентрации 100 мкг/мл сое-



Рисунок 3. – Отсутствие роста *Mycobacterium terrae* в присутствии соединения 3-[4-(3-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид (соединение № 2) в концентрации 100 мкг/мл

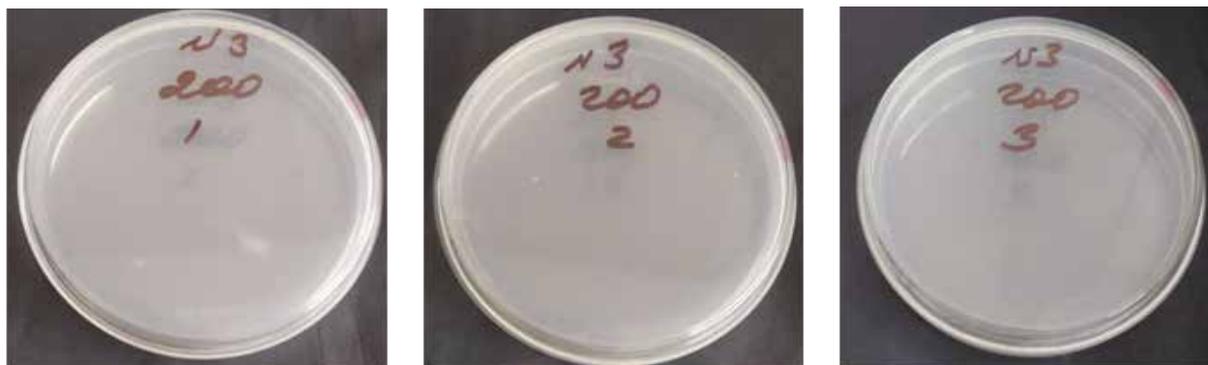


Рисунок 4. – Отсутствие роста *Mycobacterium terrae* в присутствии соединения 4-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)-фенил]бензамид (соединение № 3) в концентрации 200 мкг/мл

динение № 3 обладает бактериостатической активностью, так как наблюдается слабый рост *Mycobacterium terrae* 15755.

Соединение № 4 – 4-[4-(3-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)фенил]бензамид – в концентрации 200 мкг/мл обладает бактериостатической активностью, так как наблюдается незначительный рост *Mycobacterium terrae* 15755.

Соединение № 5 – 3-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)фенил]бензамид – в концентрации 100 мкг/мл подавляет рост микобактерий (рисунок 5).

Соединение № 6 – 3-[4-(3-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)фенил]бензамид – в концентрации 100 мкг/мл подавляет рост микобактерий (рисунок 6).

Соединение № 7 – 4-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)фенил]бензамид – в концентрации 200 мкг/мл

обладает бактериостатической активностью, так как наблюдается слабый рост *Mycobacterium terrae* 15755.

Соединение № 8 – 4-[4-(3-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)фенил]бензамид – в концентрации 100 мкг/мл подавляет рост микобактерий (рисунок 7).

Рифампицин в концентрации 100 мкг/мл подавляет рост микобактерий (рисунок 8).

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что в первой группе изомерных соединений № 1–№ 4 изофталевые производные – соединения № 1 и № 2 – показали значительную противотуберкулезную активность, сравнимую с активностью рифампицина, в отличие от изомерных терефталевых аналогов (соединения № 3 и № 4). Изменение положения атома фтора в остатке фторбензоилпиперазина в этой группе соединений не влияет на противотуберкулезную активность.

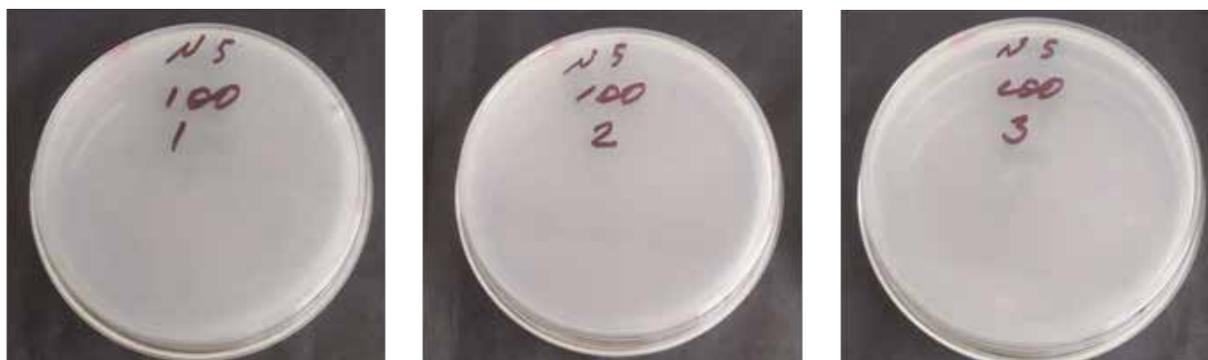


Рисунок 5. – Отсутствие роста *Mycobacterium terrae* в присутствии соединения 4-[4-(2-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(трифторметил)-фенил]бензамид (соединение № 5) в концентрации 100 мкг/мл



Рисунок 6. – Отсутствие роста *Mycobacterium terrae* в присутствии соединения 3-[4-(3-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)-фенил]бензамид (соединение № 6) в концентрации 100 мкг/мл

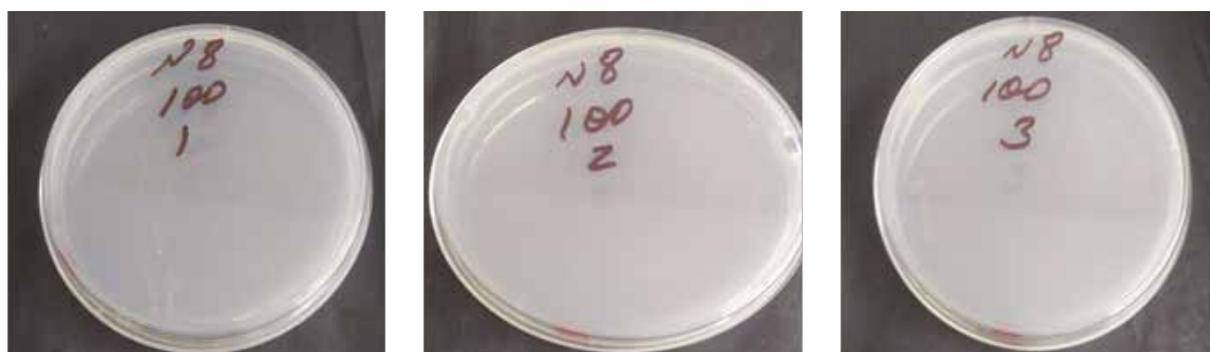


Рисунок 7. – Отсутствие роста *Mycobacterium terrae* в присутствии соединения 4-[4-(3-фторбензоил)пиперазин-1-карбонил]-N-[3-(4-метил-1H-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)фенил]бензамид (соединение № 8) в концентрации 100 мкг/мл



Рисунок 8. – Отсутствие роста *Mycobacterium terrae* в присутствии рифампицина в концентрации 100 мкг/мл

Во второй группе изомерных соединений № 5–№ 8, изофталевые производные – соединения № 5 и № 6 – показали значительную противотуберкулезную активность, сравнимую с активностью рифампицина, а из изомерных терефталевых аналогов значительную противотуберкулезную активность показало только соединение № 8. Соединение № 7 показало лишь бак-

териостатическое действие в отношении *Mycobacterium terrae*. Возможно, изменение мета-положения атома фтора в остатке фторбензоилпиперазина в соединении № 8 на орто-положение в соединении № 7 снижает противотуберкулезную активность. Учитывая, что во второй группе изомерных соединений № 5–№ 8 три соединения показали бактерицидное действие, можно пред-

положить, что наличие в структуре 4-метил-1Н-имидазола вносит положительный вклад в противотуберкулезную активность.

Чтобы сделать окончательный вывод о влиянии структуры молекулы на противотуберкулезную активность изучаемых соединений, необходимо провести исследования на патогенных штаммах *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*.

Результаты скринингового исследо-

вания антимикробной активности производных бензамида в растворе с концентрацией 1000 мкг/мл в ДМСО в отношении *Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442*, *Klebsiella pneumoniae ATCC 700603*, *Escherichia coli ATCC 11229*, *Staphylococcus aureus ATCC 6538*, *Salmonella typhimurium ATCC 14028*, *Candida albicans ATCC 10231* представлены в таблице 2. Во всех чашках Петри наблюдали рост культуры.

Таблица 2. – Антимикробная активность производных бензамида в отношении *Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442*, *Klebsiella pneumoniae ATCC 700603*, *Escherichia coli ATCC 11229*, *Staphylococcus aureus ATCC 6538*, *Salmonella typhimurium ATCC 14028* и *Candida albicans ATCC 10231*

Культура микроорганизмов	№ соединения								ДМСО
	1	2	3	4	5	6	7	8	
	Диаметр зоны ингибирования, мм (среднее ± стандартная ошибка среднего)								
<i>Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442</i>	5,3±0,3	5,7±0,3	5,3±0,3	5,7±0,3	5,3±0,3	5,7±0,3	5,7±0,3	5,3±0,3	5,0±0,0
<i>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</i>	5,0±0,0	6,0±0,0	6,3±0,3	6,7±0,3	7,0±0,0	6,3±0,3	6,3±0,3	6,7±0,3	5,0±0,0
<i>Escherichia coli ATCC 11229</i>	6,3±0,3	7,3±0,3	6,7±0,3	6,3±0,3	6,0±0,0	7,7±0,3	7,3±0,3	7,7±0,3	5,0±0,0
<i>Staphylococcus aureus ATCC 6538</i>	6,3±0,3	6,3±0,3	6,3±0,3	6,3±0,3	7,3±0,3	6,3±0,3	6,0±0,0	7,0±0,0	5,0±0,0
<i>Salmonella typhimurium ATCC 14028</i>	5,3±0,3	5,7±0,3	5,3±0,3	6,0±0,0	6,7±0,3	6,0±0,0	6,3±0,3	6,3±0,3	5,0±0,0
<i>Candida albicans ATCC 10231</i>	8,0±0,0	6,0±0,0	6,3±0,3	7,7±0,3	7,3±0,3	6,3±0,3	6,0±0,0	7,7±0,3	5,0±0,0

Как видно из таблицы 2, все исследуемые производные бензамида не ингибируют рост *Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442*, *Klebsiella pneumoniae ATCC 700603*, *Escherichia coli ATCC 11229*, *Staphylococcus aureus ATCC 6538*, *Salmonella typhimurium ATCC 14028* и *Candida albicans ATCC 10231*. Таким образом, производные бензамида не обладают антимикробной активностью в условиях эксперимента в отношении исследуемых микроорганизмов и не обладают противогрибковой активностью в отношении *Candida albicans ATCC 10231*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе скринингового исследования противотуберкулезной активности *in vitro* новых синтетических конъюгатов

бензамида установлено, что 5 из 8 исследуемых соединений подавляют рост *Mycobacterium terrae* в такой же концентрации, как и противотуберкулезный препарат I ряда рифампицин в условиях эксперимента.

Установлено, что изомерные производные, полученные из изофталевой кислоты и содержащие 3-(трифторметил)анилиновый заместитель (соединения № 1 и № 2), показали значительную противотуберкулезную активность в отличие от изомерных терефталевых аналогов (соединения № 3 и № 4), причем положение атома фтора в остатке бензоилпиперазина не оказывало существенного влияния на активность данных соединений.

Во второй группе изомерных соединений № 5–№ 8, содержащих 3-(4-метил-

1Н-имидазол-1-ил)-5-(трифторметил)анилиновый заместитель, выявлено три соединения (№ 5, № 6 и № 8), которые так же, как и препарат сравнения, полностью подавляли рост *Mycobacterium terrae*. Вероятно, наличие в структуре 4-метил-1Н-имидазола вносит положительный вклад в противотуберкулезную активность. В этой группе соединений не установлена зависимость между противотуберкулезной активностью и изомерией фталевого фрагмента. Также обнаружено, что в конъюгатах № 7 и № 8, полученных из терефталевой кислоты, переход атома фтора из мета-положения в орто-положение приводит к снижению противотуберкулезной активности.

Необходимы дальнейшие исследования на патогенных штаммах *Mycobacterium tuberculosis H37Rv*, чтобы сделать окончательный вывод о влиянии структуры молекулы на противотуберкулезную активность изучаемых соединений.

В ходе скринингового исследования антимикробной активности новых синтетических производных бензамида установлено, что все изученные соединения не обладают антимикробной активностью *in vitro* в отношении штаммов *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 и не обладают противогрибковым действием в отношении штамма *Candida albicans* ATCC 10231.

SUMMARY

O. G. Sechko, V. M. Tsarenkov,
E. N. Kalinichenko, T.S. Bozhok
SCREENING STUDIES
OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY
OF NEW SYNTHETIC BENZAMIDE
CONJUGATES WITH RESPECT
TO *MYCOBACTERIUM TERRAE*
AND SOME OTHER PATHOGENS

The aim of the research is to conduct screening studies of antimicrobial activity of new synthetic benzamide conjugates obtained from iso-/terephthalic acids and containing fragments of 3-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)-5-(trifluoromethyl)aniline, 3-(trifluoromethyl)aniline; and 2(3)-fluorobenzoylpiperazine with respect to *Mycobacterium terrae* 15755, *Pseudomonas*

aeruginosa ATCC 15442, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 и *Candida albicans* ATCC 10231. Antituberculous activity of compounds was tested on *Mycobacterium terrae* 15755 strain using the method of dilutions in solid nutrient medium in Petri dishes. The study of antimicrobial activity was carried out using agar diffusion method on 5 pure cultures of microorganisms that are included in the list of priority pathogenic microorganisms for research and development of new antibiotics in the fight against drug-resistant bacterial infections: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 and on 1 pure culture for testing antifungal activity – yeast *Candida albicans* ATCC 10231. According to the results of the study of antituberculosis activity *in vitro* it was found that 5 out of 8 studied compounds inhibit the growth of *Mycobacterium terrae* in the same concentration as an anti-tuberculosis drug of the first series rifampicin under experimental conditions. According to the results of the study of antimicrobial activity it was found that the compounds studied do not exhibit antimicrobial activity *in vitro* against all the studied strains and do not exhibit antifungal activity against *Candida albicans*.

Keywords: synthetic benzamide conjugates, antituberculous activity, antimicrobial activity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis / World Health Organization. – Geneva: World Health Organization. – 2017. – 87 p.
2. O'Neill, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations / J. O'Neill. – London: Review on Antimicrobial Resistance, 2016. – 80 p.
3. Землянко, О. М. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам / О. М. Землянко, Т. М. Рогоза, Г. А. Журавлева // Эколог. генетика. – 2018. – Т. 16, № 3. – С. 4–17.
4. Глобальный план действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. –

2016. – Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254884>. – Дата доступа: 02.06.2022.

5. Guidance for national strategic planning for tuberculosis / World Health Organization. – Geneva: World Health Organization, 2022. – 70 p.

6. Drug resistance, fitness and compensatory mutations in *Mycobacterium tuberculosis* / A. K. A. Emane [et al.] // Tuberculosis (Edinb). – 2021. – Vol. 129. – P. 102091.

7. Новые данные свидетельствуют о росте устойчивости к противомикробным препаратам по всему миру // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2018. – Т. 17, № 1. – С. 61.

8. Ефименко, Т. А. Современное состояние проблемы антибиотикорезистентности патогенных бактерий / Т. А. Ефименко, Л. П. Терехова, О. В. Ефременкова // Антибиотики и химиотерапия. – 2019. – Т. 64, № 5/6. – С. 64–68.

9. Изучение резистентности патогенных и условно-патогенных грибов к противогрибковым препаратам / А. Д. Козлова [и др.] // Ветеринария сегодня. – 2022. – Т. 11, № 1. – С. 20–26.

10. Lockhart, S. R. Candida auris and multidrug resistance: Defining the new normal / S. R. Lockhart // Fungal Genetics and Biology. – 2019. – Vol. 131. – P. 103243.

11. Новые схемы и новые препараты в лечении туберкулеза: шагнем в ногу? / Д. Ю. Рuzанов [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2021. – Т. 23, № 1. – С. 27–42.

12. Сечко, О. Г. Противотуберкулезная активность производных бензамида и бензойной кислоты / О. Г. Сечко, И. Н. Слабко, В. М. Царенков // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: рецензир. ежегод. сб. науч. трудов / редкол.: С. П. Рубникович, В. А. Филонюк. – Минск: Бел. гос. мед. ун-т, 2021. – Вып. 11. – С. 540–546.

13. Griffiths, P. A. *Mycobacterium terrae*: a potential surrogate for *Mycobacterium tuberculosis* in a standard disinfectant test / P. A. Griffiths, J. R. Babb, A. P. Fraise // J. of hospital infection. – 1998. – Vol. 38, N 3. – P. 183–192.

REFERENCES

1. World Health Organization. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2017. 87 p

2. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. London, England: Review on Antimicrobial Resistance; 2016. 80 p

3. Zemlianko OM, Rogoza TM, Zhuravleva GA. Mechanisms of multiple resistance of bacteria

to antibiotics. Ekolog genetika. 2018;16(3):4–17. doi: 10.17816/ecogen1634-17. (In Russ.)

4. Vsemirnaia organizatsiia zdravookhraneniia. Global action plan to combat antimicrobial resistance [Elektronnyi resurs]. 2016. Rezhim dostupa: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254884>. Data dostupa: 02.06.2022. (In Russ.)

5. World Health Organization. Guidance for national strategic planning for tuberculosis. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2022. 70 p

6. Emane AKA, Guo X, Takiff HE, Liu S. Drug resistance, fitness and compensatory mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb). 2021;129:102091. doi: 10.1016/j.tube.2021.102091

7. New data show rising antimicrobial resistance worldwide. Epidemiologiia i Vaksinoprofilaktika. 2018;17(1):61. (In Russ.)

8. Efimenko TA, Terekhova LP, Efremenkova OV. The current state of the problem of antibiotic resistance of pathogenic bacteria. Antibiotiki i khimioterapiia. 2019;64(5-6):64–8. doi: 10.24411/0235-2990-2019-100033

9. Kozlova AD, Iatsentiuk SP, Sokolov VV, Manoian MG. Study of the resistance of pathogenic and opportunistic fungi to antifungal drugs. Veterinariia segodnia. 2022;11(1):20–6. doi: 10.29326/2304-196X-2022-11-1-20-26

10. Lockhart SR. Candida auris and multidrug resistance: Defining the new normal. Fungal Genet Biol. 2019;131:103243. doi: 10.1016/j.fgb.2019.103243

11. Ruzanov DI, Skriagina EM, Buinevich IV, Goponiako SV, Balasaniants GS, Khimova ES. New schemes and new drugs in the treatment of tuberculosis: are we stepping in step? Klinicheskaiia mikrobiologiia i antimikrobnaia khimioterapiia. 2021;23(1):27–42. doi: 10.36488/emas.2021.1.27-42. (In Russ.)

12. Sechko OG, Slabko IN, Tsarenkov VM. Antituberculous activity of benzamide and benzoic acid derivatives. V: Rubnikovich SP, Filoniuk VA, redaktory. BGMU v avangarde meditsinskoi nauki i praktiki: retsenzir ezhegod sb nauch trudov. Minsk: Bel gos med un-t; 2021. vyp. 11. s. 540–6. (In Russ.)

13. Griffiths PA, Babb JR, Fraise AP. *Mycobacterium terrae*: a potential surrogate for *Mycobacterium tuberculosis* in a standard disinfectant test. J Hosp Infect. 1998;38(3):183–92. doi: 10.1016/S0195-6701(98)90273-0

Адрес для корреспонденции:

220116, Республика Беларусь,
г. Минск, пр. Дзержинского, 83,
УО «Белорусский государственный
медицинский университет»,
кафедра фармацевтической технологии,
e-mail: olgasechko23.06@yandex.ru,
Сечко О. Г.

Поступила 22.09.2022 г.