

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ  
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**Факультет біології, географії і екології**

**Кафедра біології людини та імунології**

**АНТИБІОТИКОЧУТЛИВІСТЬ РІЗНИХ ШТАМІВ БАКТЕРІЙ ПІД  
ВПЛИВОМ ПОХІДНИХ ТЕОФІЛІНУ**

Кваліфікаційна робота

на здобуття ступеня вищої освіти “бакалавр”

Виконала: студентка 4 курсу 411 групи

Спеціальності 091 Біологія\*

Освітньо-професійної програми “Біологія”

Клименко К.О.

Керівник доц. Бесчасний С.П.

Рецензент доц. Загороднюк Н.В.

Херсон – 2020

## **ЗМІСТ**

### **ВСТУП**

### **РОЗДІЛ I. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПОХІДНИХ ПУРИНІВ**

1.1. Алкалоїди.....	4
1.1.1. Кофеїн.....	6
1.1.2. Теофілін.....	8
1.1.3. Теобромін.....	10
1.1.4. Сакситоксин.....	11

### **РОЗДІЛ II. МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИБІОТИКОЧУТЛИВОСТІ**

2.1. Метод серійних розведень.....	14
2.1.1. Розведення в бульйоні.....	15
2.1.2. Розведення в агарі.....	17
2.2. Дифузійні методи.....	18
2.2.1. Метод дисків.....	18
2.2.2. Метод Е-тесту.....	21
2.3. Прискорені методи визначення антибіотикочутливості.....	22

### **РОЗДІЛ III. АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ТА ПРОТИВІРУСНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНИХ ПУРИНІВ**

3.1. Туберкулостатична активність похідних 2-аміно-6-хлорпурину.....	26
3.2. Похідні пурину, які володіють противірусною активністю.....	29

### **ВИСНОВКИ**

### **СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

## ВСТУП

**Актуальність теми:** На сьогоднішній час доволі актуальною залишається проблема вивчення антибіотикочутливості різних штамів бактерій, які викликають захворювання у людини, до певних речовин, а саме, похідних пуринів, таких як теобромін, сакситоксин, ізопринзин та ін. Також відкритим є питання створення засобів для лікування туберкульозу та цитомегаловірусної інфекції, які б володіли більш потужною дією та мали мінімальну цитотоксичність.

**Мета роботи** - Дослідити резистентність мікроорганізмів до деяких похідних пуринів.

**Завдання дослідження:**

1. Розглянути загальну характеристику найпоширеніших похідних пуринів.
2. Розглянути основні методи визначення антибіотикочутливості.
3. Дослідити противірусні та протибактеріальні властивості пуринових похідних.

**Об`єкт** - процес розвитку резистентності у мікроорганізмів до певних сполук

**Предмет** - антибіотикочутливість мікроорганізмів.

**Методи дослідження:** Аналіз наукової літератури з тематики дослідження, аналіз методів дослідження антибіотикорезистентності, дослідження противірусних властивостей похідних пуринів.

**Практичне значення одержаних результатів:** Результати дослідження можуть використовуватися під час вирішення проблем лікування хвороб, що викликаються вірусами та бактеріями та під час вивчення протимікробних властивостей пуринових похідних.

**Структура роботи:** Робота складається зі вступу, трьох розділів, висновків та списку використаної літератури.

## РОЗДІЛ І. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ПОХІДНИХ ПУРИНІВ

### 1.1. Алкалоїди

Алкалоїди являють собою групу хімічних сполук, що зустрічаються в природі та містять переважно азотні основи. Ця група також включає в себе деякі споріднені сполуки з нейтральними і навіть слабкокислими властивостями. Деякі синтетичні сполуки аналогічної структури також називають алкалоїдами. Окрім вуглеводу, водню та азоту, алкалоїди можуть також містити кисень, сірку та, рідше, інші елементи – хлор, бром та фосфор.

Алкалоїди синтезує велике різноманіття організмів, таких як бактерії, гриби, рослини та тварини. Алкалоїди мають широкий спектр фармакологічної активності, включаючи протималярійну (наприклад, хінін), антиастматичну (ефедрин), протипухлинну (гомоаррингтонін), антиаритмічну (квінідин), знеболюючу (морфін), антибактеріальну (хелеритрін) та антигіперглікемічну активність (піперін). Багато з них знайшли застосування в традиційній чи сучасній медицині. Інші алкалоїди мають психотропну (наприклад, псилоцин) та стимулюючу дію (кокаїн, кофеїн, нікотин, теобромін). Також алкалоїди можуть бути токсичними (атропін, тубокурарін). Не дивлячись на те, що вони діють на різноманітні системи в організмі людини і тварин, усі алкалоїди мають гіркий смак. [12]

Назва «алкалоїди» була введена у 1819 році німецьким хіміком Карлом Фрідріхом Вільгельмом Мейснером і походить воно від латинського *alkali* – луг. Але широкого вживання набула лише у 1880 роки.[29]

Рослини, що містять алкалоїди, використовуються людьми з лікувальною та рекреаційною ціллю дуже давно. Наприклад, лікарські рослини були відомі в Месопотамії близько 2000 років до нашої ери. В китайській книзі про кімнатні рослини, що написана в 1-3 столітті до нашої ери, згадується про застосування в медицині ефедри і мака. Крім того, листя коки використовуються південноамериканськими індіанцями з давніх часів. Екстракти з рослин, що містять токсичні алкалоїди, такі як аконіт та тубокурарін, використовувались для отруєння стріл. [10]

Дослідження алкалоїдів почалось у 19 сторіччі. В 1804 році німецький хімік Фрідріх Сертюрнер виділив з опія «снодійну складову», яку назвав «*morphium*» в честь Морфія, грецького бога сновидінь.

Значний вклад в хімію алкалоїдів в перші роки її розвитку внесли французькі дослідники П. Ж. Пеллетье та Ж. Б. Каванту, що відкрили хінін (1819р.) та стрихнін (1818р.). Деякі інші алкалоїди були відкриті приблизно в той же час, а саме ксантин (1817р.), атропін (1819р.), кофеїн (1820р.),

нікотин (1828р.), колхіцин (1833р.), спартеїн (1851р.) та кокаїн (1860р.). Перший повний синтез алкалоїду був здійснений у 1886 році німецьким хіміком Альбертом Ладенбургом. Він створив коніїн шляхом взаємодії 2-метилпірідина з ацетальдегідом та відновленням отриманого 2-пропеніл пірідина з натрієм. Розвиток хімії алкалоїдів було пришвиджено з появою спектроскопічних та хроматографічних методів в 20-му сторіччі.

У порівнянні з більшістю інших класів природних сполук, алкалоїди характеризуються більшим структурним різноманіттям. Не існує єдиної їх класифікації, але алкалоїди часто поділяють на такі групи:

1. «Справжні алкалоїди», які містять азот в гетероциклі і походять від амінокислот. Яскравими прикладами є атропін, нікотин та морфін. Ця група також включає в себе деякі алкалоїди, які. Окрім гетероцикла азота, містять терпен (наприклад, евонін) чи пептидні фрагменти (наприклад, ерготамін). Сюди також входять коніїн та коніцеїн, хоча вони й не походять від амінокислот.

2. «Протоалкалоїди», які містять азот і також походять від амінокислот. Це мескалін, адреналін та ефедрин.

3. Поліамінні алкалоїди – похідні путресцина. Спермідин та спермін.

4. Пептидні та циклопептидні алкалоїди.

5. Псевдоалкалоїди – алкалоїдоподібні сполуки, які не походять з амінокислот. Ця група включає алкалоїди терпенового типу та стероїдні алкалоїди, а також пуринові алкалоїди, такі як кофеїн, теобромін, теофілін та теакрин.

Роль алкалоїдів для живих організмів, що їх продукують, досі не визначена. Більшість відомих функцій пов'язані з захистом. Наприклад, апорфіновий алкалоїд ліріоденін, що синтезується рослиною ліріодендрон тюльпанний з паразитичних грибів. Окрім того, наявність алкалоїдів в рослині попереджує його поїдання комахами та хордовими тваринами. [6]

Медичне використання рослин, що містять алкалоїди, має довгу і багату історію, і, таким чином, коли перші алкалоїди були виділені у 19 сторіччі, вони одразу ж знайшли застосування. Велика їх кількість використовується й досі.

*Таблиця 1.1. Класи лікарських речовин серед алкалоїдів.*

Назва алкалоїду	Клас лікарських речовин
<i>Аймалін</i>	<i>Антиаритмічний алкалоїд</i>
<i>Атропін</i>	<i>Антихолінергічні засоби</i>
<i>Кофеїн</i>	<i>Стимулятор, антагоніст аденозинового рецептора</i>
<i>Кодеїн</i>	<i>Ліки від кашлю, знеболююче</i>
<i>Скололамін</i>	<i>Антихолінергічні засоби</i>

<i>Гіосциамін</i>	<i>Антихолінергічні засоби</i>
<i>Колхіцин</i>	<i>Засіб від подагри</i>
<i>Еметин</i>	<i>Антипротозойний препарат</i>
<i>Алкалоїди споринії</i>	<i>Симптоміметичні, судинорозширюючі, антигіпертензивні засоби</i>
<i>Морфій</i>	<i>Анальгетик</i>
<i>Нікотин</i>	<i>Стимулятор, антагоніст нікотинового ацетилхолінового рецептора</i>
<i>Фізостигмін</i>	<i>Інгібітор ацетилхолінестерази</i>
<i>Хінідин</i>	<i>Антиаритмічний засіб</i>
<i>Резерпін</i>	<i>Гіпотензивна речовина</i>
<i>Тубокурарин</i>	<i>М'язовий релаксант</i>
<i>Вінбластін</i>	<i>Противухлинні засоби</i>
<i>Вінкрістін</i>	<i>Противухлинні засоби</i>
<i>Вінкамін</i>	<i>Судинорозширюючий, антигіпертензивний засіб</i>
<i>Йохімбін</i>	<i>Стимулюючий, збуджуючий засіб</i>

*Продовження Табл. 1.1.*

Засоби рослин, що містять алкалоїди і їх екстракти, а пізніше – чисті алкалоїди, давно почали застосовувати в якості психотропних речовин. Кокаїн, кофеїн і катінон є стимуляторами центральної нервової системи. Мескалін та багато індольних алкалоїдів (наприклад, псилоцибін та ібогаїн) мають галюциногенний ефект. Морфін і кодеїн – сильні наркотичні знеболювальні. Існують алкалоїди, які не мають сильних психоактивних властивостей, але є попередниками для напівсинтетичних психоактивних речовин. Наприклад, ефедрин та псевдоефедрин застосовують для виробництва меткатіона та метамфетаміна. Тебаїн використовується в синтезі багатьох знеболюючих, таких як оксикодон.

### 1.1.1. Кофеїн

Кофеїн – білий, гіркий кристалічний ксантиновий алкалоїд та стимулятор серцевої діяльності та нервової системи. Він у різних кількостях міститься в листках, насінні та плодах деяких рослин і діє в ролі природнього пестициду, який знищує певних комах, що харчуються на рослинах. Людина найчастіше вживає кофеїн у вигляді екстракту, що виділений з насіння листків чайного куща, кавової рослини і різноманітних харчових продуктів та напоїв, що містять речовини, виділені з горіха коли. Також цей алкалоїд міститься в ягодах гуарани і м'яті. [11]

Хімічна назва кофеїну – 1,3,7-три-метил-ксантин. Це сполука ксантину з трьома метиловими (CH<sub>3</sub>) групами, що прикріплені до 1, 3 та 7 вугледів з ксантиновою основою.

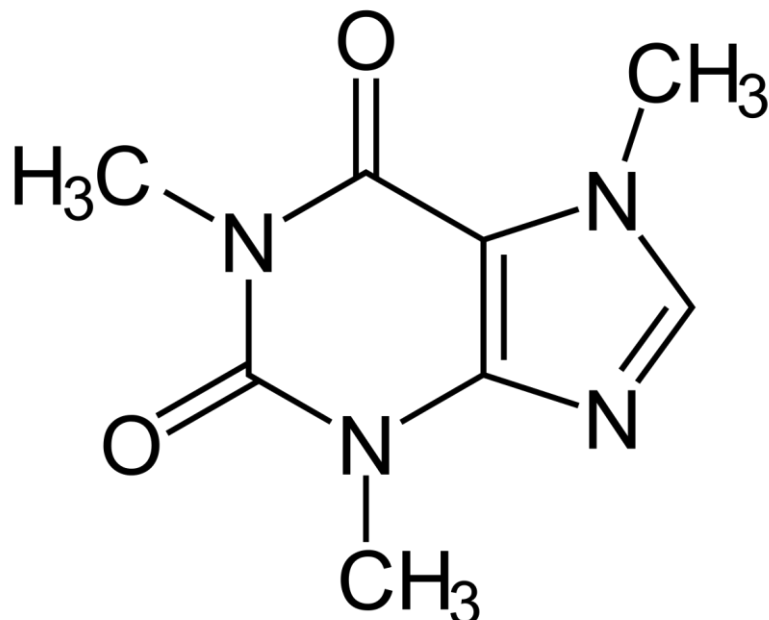


Рис. 1.1. Будова молекули кофеїну.

У 1819 році німецький хімік Фредлієб Фердинанд Рунге виділив відносно чистий кофеїн і назвав його «kaffebase» (тобто, база, що існує в каві). У 1895 році німецький хімік Герман Еміль Фішер вперше синтезував кофеїн з сировини, а ще через два роки відкрив структурну формулу сполуки. [40]

Кофеїн – продукт какао-бобів, який також отримують штучним шляхом в лабораторних умовах. Структура його, незалежно від форми вживання (кава, чай чи таблетки) залишається незмінною. Кофеїн є потужним природним стимулятором. Який використовують для підвищення витривалості та збільшення фізичної сили під час тренувань. Від належить до класу ноотропних речовин, оскільки підвищує чутливість нейронів і стимулює розумову діяльність.

Головний механізм дії кофеїну полягає в його антагонізмі по відношенню до рецепторів аденозину, останній володіє седативною та розслаблюючою дією. Кофеїн інгібує дію аденозину, що робить людину більш бадьорою та уважною.

- кофеїн є потужним стимулятором
- метаболітична (стимулююча обмін речовин) дія кофеїну залежить від ступеня «звикання» до нього та частоти вживання
- метаболітичний ефект також залежить від наявності/відсутності у людини поліморфізма фермента CYP1A1/2

- аналізуючи відмінності у метаболізмі щурів і людей, вчені дійшли висновку, що дозування 10мк/кг маси тіла у щурів є еквівалентом дози 250мг у людини

Високий рівень кофеїну спостерігають в проростках листків, що не мають механічного захисту та в ґрунті, що оточує саджанці какао-бобів. Таким чином, кофеїн є природним пестицидом та інгібітором проросту насіння других прилеглих рослин, тим самим даючи йому більший відсоток виживання. [6]

Механізм дії кофеїну: аденозин діє в ролі інгібуючого нейромедіатора, який пригнічує активність центральної нервової системи. Кофеїн блокує рецептори аденозину і надає вплив також на більшість інших нейромедіаторів, в тому числі на дофамін, ацетилхолін, серотонін, адреналін, глутамат, кортизол, та, в високих дозах, на норадреналін. В значних дозах, що перевищують 500 мг, інгібує нейротрансмісію ГАМК. Зниження ГАМК пояснює, чому кофеїн викликає тривогу, безсоння, збільшення частоти серцевих скорочень та частоту дихання.

Оскільки кофеїн є водо- та жиророзчинною сполукою, то він легко перетинає гематоенцефалічний бар'єр. Його молекула є структурно схожою до молекули аденозину, та може зв'язуватися з аденозиновими рецепторами на поверхні клітин без їх активації, даючи таким чином як конкурентний інгібітор. [12]

Кофеїн, як і інші ксантини, також виступає в якості інгібітора фосфодіестерази. Він підвищує внутрішньоклітинний цАМФ, активує протеїнкіназу А, інгібує ФНО-альфа та синтез лейкотрієну, зменшує запалення. В нервовій системі кофеїн може зменшувати сприйняття фізичного зусилля, знижуючи поріг активації нейрона, завдяки чому м'язам легше здійснювати фізичні вправи.

### 1.1.2. Теофілін

Теофілін, також відомий як 1,3-диметилксантин – метилксантин, природний алкалоїд, що застосовується під час терапії респіраторних захворювань (астми, хронічної обструктивної хвороби легенів). Є похідним родини ксантинів, за будовою схожий на кофеїн і теобромін. Невелика його кількість синтезується в печінці, як продукт метаболізму такого алкалоїду як кофеїн. Цей алкалоїд міститься в листах чайного дерева та каві. За структурою – білий кристалічний порошок, що майже не розчиняється в холодній воді (1:180), але легко розчинний в кислотах, лугах та гарячій воді (1:85). Вперше виділений у 1888 році. [41]



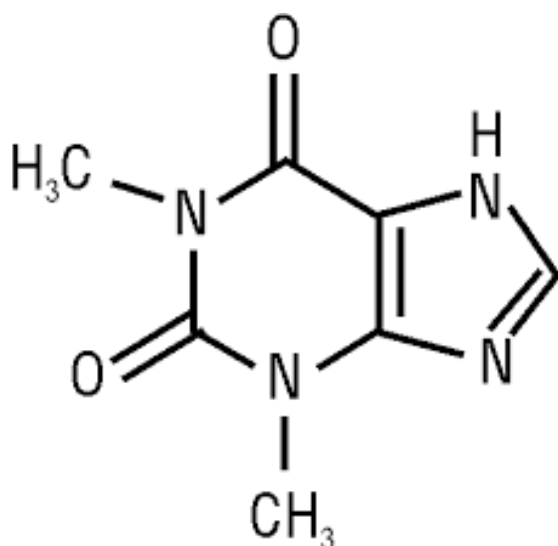


Рис. 1.2. Будова молекули теофіліну.

Теофілін активно впливає на різноманітні функції організму таким чином: він має збуджуючий вплив на ЦНС, але менш виражену, ніж у кофеїну; посилює скоротливу діяльність міокарда; розширює коронарні та периферичні судини; є інгібітором агрегації тромбоцитів; уповільнює вивільнення з тучних клітин медіаторів алергії. Найважливішою функцією теофіліну є його здатність до розширення бронхів.

В механізмі дії теофіліна, як і інших метилксантинів, певну роль відіграють інгібування фосфодіестерази – ферменту класа гідролаз, що каталізує гідроліз, та накопичення в тканинах циклічного 3',5'-аденозинмонофосфата (цАМФ). Серед метилксантинів теофілін є одним з найбільш сильних інгібітрів фосфодіестерази. Накопичення в клітинах цАМФ уповільнює сполучення актина з міозином, що зменшує активність скорочення гладкої мускулатури і сприяє розслабленню бронхів і зняттю спазма. До розслаблення мускулатури призводить також здатність теофіліну пригнічувати транспорт іонів кальцію через «повільні» канали клітинних мембран. [26]

Особливо важливе значення в молекулярному механізмі дії теофіліна має виявлена останнім часом його здатність блокувати аденозинові рецептори. Аденозин, що є ендogenousним пуріновим нуклеозидом, похідним аденіна, розглядається як природній ліганд, який специфічно зв'язується з аденозиновими (пуріновими) рецепторами, які знаходяться в периферичних органах, серцевому м'язі, бронхах, в ЦНС. В наш час розрізняють різноманітні підгрупи аденозинових рецепторів (A1, A2 та інші).

Теофілін за терапевтичної концентрації в плазмі крові (10 мкг/мл) має деякий протизапальний ефект. Насамперед, він знижує викликаний аденозином викид медіаторів з тучних клітин, зменшує утворення вільних кисневих радикалів нейтрофілами і макрофагами, пригнічує синтез та вивільнення із моноцитів і макрофагів цитокінів (інтерлейкіна ІЛ-1 та фактора некрозу пухлин альфа TNF $\alpha$ ), перешкоджає хемотаксису, активації і дегрануляції еозинофілів. [23]

Теофілін надає імуномодулюючу дію: пригнічує проліферацію Т-лімфоцитів, транспорт їх в дихальні шляхи та вивільнення ними інтерлейкіну ІЛ-2, підвищує кількість Т-супресорів в периферичній крові. Крім того, він посилює мукоциліарний транспорт, збільшуючи виділення слизу бронхіальними залозами і підвищуючи швидкість коливання війок в проксимальних відділах бронхів.

### 1.1.3. Теобромін

Теобромін (з лат. *Theobroma cacao* – какао) – ізомер теофіліну, алкалоїд пуринового ряду. Має вигляд прозорих кристалів, що є гіркими на смак та не розчиняються у воді (1:2000). [39]

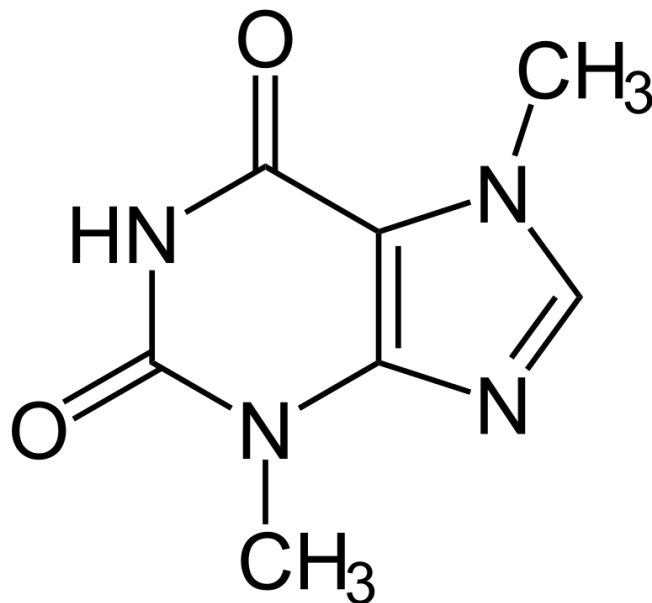


Рис. 1.3. Будова молекули теоброміну.

В медицині його використовують з 1916 року, після його відкриття наприкінці 19 століття, в якості засобу, що розширює судини, стимулює

серцеву діяльність та має мочегінну дію. Теобромін зупиняє агрегацію тромбоцитів (пригнічує фактор активації тромбоцитів та P<sub>g</sub>E<sub>2</sub>-альфа), стабілізує мембрану тучних клітин та призупиняє вивільнення медіаторів алергічних реакцій, зменшує утворення тромбів та підвищує стійкість еритроцитів до деформації (покращує реологічні властивості крові). Має здатність збільшувати силу ЧСС та підвищувати коронарний кровоток і потребу міокарда у кисні. Також він може надавати слабку психостимулюючу дію. [36]

Кількість теоброміна, що міститься в шоколаді, є достатньо невеликою, що дає можливість вважати його безпечним для вживання людиною. Отруєння теоброміном може бути пов'язаним з постійним вживанням великої кількості шоколаду, особливо в похилому віці. [23]

Теобромін та кофеїн є пов'язаними одне з одним алкалоїдами. Як і кофеїн, він може викликати тремор, безсоння, тривожність. Теобромін має більш слабку дію, порівняно з кофеїном, у інгібуванні циклічних нуклеотидних фосфодієстераз та, відповідно, менше впливає на нервову систему людини. Королівський коледж Лондона у 2004 році публікував дослідження, в ході якого було визначено, що протикашльова дія теоброміна (пригнічення активності блукаючого нерва) переважає дію кофеїна. В дослідженні, 1000 мг теоброміна (що є еквівалентним ~ 71 г темного шоколаду) значно підвищувало порогову концентрацію капсаїцину, необхідну для того, щоб визвати кашель, порівняно з плацебо. [1]

#### 1.1.4. Сакситоксин

У 1957 році були вивчені властивості так званої «паралітичної отрути молюсків» - однієї з найбільш токсичних речовин небілкової природи. За назвою морського молюска, з тканин якого і виділили токсикант (*Saxidomus*), речовина отримала назву сакситоксин. Пізніше було встановлено, що в організмі тварин сакситоксин не синтезується, а потрапляє туди з одноклітинними (джгутиковими) виду *Gonyaulax catenella*, якими молюски харчуються. Цілий ряд молюсків, у разі масового розмноження *Gonyaulax*, поглинають їх у великій кількості і концентрують у своїх тканинах токсин, який для них загрози не несе. Стаючи при цьому отруйними, молюски викликають випадки масових отруєнь людей. [9]

Синьо-зелені водорості прісноводних водоймищ також синтезують сакситоксин. Це відкриття дало можливість створити технологію отримання сакситоксину іншим шляхом – шляхом культивування в ферментах тих самих водоростей.

Хімічна природа сакситоксину була визначена у 1971 році, а його будова остаточно у 1975 році. Сакситоксин є алкалоїдом, азотвмісною основою, яка з хлористим воднем утворює хлоргідрат.

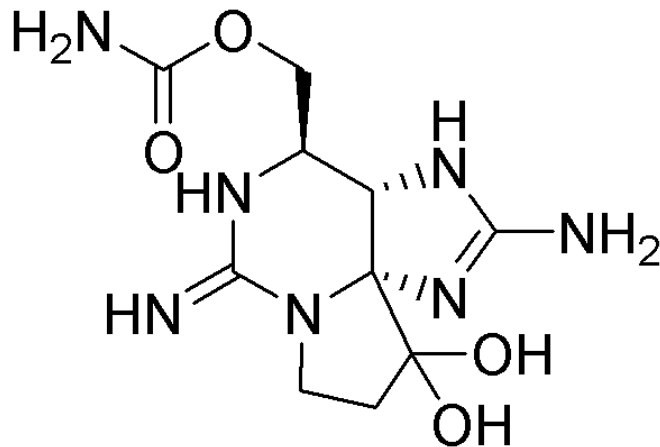


Рис. 1.4. Будова молекули сакситоксину.

Сакситоксин є нейротоксином, а його токсична дія полягає у здатності викликати блокаду пресинаптичних та постсинаптичних йонних каналів. Характер впливу цього токсину на людину добре вивчений у зв'язку з випадками «паралітичних отруєнь їстівними молюсками».

Сакситоксин повністю блокує проникнення йонів  $\text{Na}^+$  по йонним каналам збудливих мембран всередину клітин. При цьому стає неможливим формування потенціала дії збудливих мембран – порушується проведення нервових імпульсів по нейронах, скорочення міоцитів. Відповідно до розрахунків одна молекула токсину повністю блокує один йонний канал. Припускають, що взаємодія токсикату з білковими молекулами, що формують йонний канал, здійснюється за рахунок групи гуанідина, наявної в його структурі.

Першими ознаками отруєння сакситоксином є оніміння губ, язика та кінчиків пальців, які з'являються через декілька хвилин після потрапляння у шлунок. Далі настає загальне порушення м'язової координації, що супроводжується появою слабості, запаморочення, головного болю та сонливості. Смерть настає залежно від дози через 2-12 годин. Летальна доза для людини при оральному шляху потрапляння дорівнює  $(4,0-7,0) \cdot 10^3$  мг/кг. [38]

У 1989 році спеціалістами медичного дослідного інституту інфекційних хвороб армії США було виявлено, що сакситоксин при інгаляційному шляху введення мишам є приблизно в 10 разів токсичнішим, ніж при внутрішньовенному та внутрішньочеревному введенні. Цей феномер пояснюється тим, що при інгаляції дія сакситоксину націлено на орган (легені), а не на організм в цілому, що відбувається при внутрішньовенному введенні. Гибель тварини настає через порушення функціонування органа-мішені. Аналогічна дія спостерігається у інших токсинів, що здатні вражати легені (наприклад, Т-2 токсин). [20]

Сакситоксин, як і деякі інші низькомолекулярні токсини (тетродоксин, бреветоксин, палітоксин, анатоксин і Т-2 токсин) здатен викликати ураження при аплікації на шкіру.

## РОЗДІЛ II. МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИБІОТИКОЧУТЛИВОСТІ

### 2.1. Метод серійних розведень

Показаннями для визначення чутливості до антибіотиків за цим методом є необхідність отримання кількісних даних (при тяжкому перебігу інфекційних процесів) для проведення антибіотикотерапії.

Визначення ступеня чутливості певних мікроорганізмів до антибіотиків впливає на вибір антибактеріального засобу (як приклад, відмова від засобів з високою токсичністю), його дозування (концентрація АБ в крові має в 2-3 рази бути більшою, ніж МІК по відношенню до збудника) і режим введення.

Методи розведення засновані на використанні подвійних послідовних розведень концентрацій антибіотика від максимальної до мінімальної (наприклад від 128 мкг / мл, 64 мкг / мл, і т.д. до 0,5 мкг / мл, 0,25 мкг / мл і 0,125 мкг / мл). Дозволяють кількісно оцінити чутливість виділеного мікроба до антибактеріальних засобів і визначити МІК препарату. Методи серійних розведень базуються на прямому визначенні величини МІК. [24]

Існують два види методу серійних розведень – визначення чутливості на рідкому та густому поживних середовищах. Метод дає можливість визначити МІК засобу для виділеного штаму мікроорганізму.

З двох способів визначення чутливості до антибіотиків у мікроорганізмів (розведень у густому та рідкому середовищах) точнішим є метод серійних розведень у рідкому середовищі. Результати, отримані за допомогою агару, є менш постійними. Даний метод не слід застосовувати під час оцінки чутливості тих мікроорганізмів, що дають розріджений ріст на поверхні чашки (стрептококи, пневмококи) або мають повзучий ріст (протей). [16]

Недоліком методу серійних розведень є їх висока трудоемність, яка обмежує його використання в звичайних лабораторіях бактеріологічного напрямку. Задля спрощення було запропоновано ряд з десяти пробірок, що містять різні концентрації АБ, замінити на три концентрації антибіотика. Перша – максимальна, що знаходиться в крові під час введення

терапевтичних дозувань, друга – рівню, що спостерігається через  $T_{1/2}$  (час, за який концентрація АБ знижується на 50 відсотків), третя – мінімальна, МПК для високочутливих штамів.

Відповідно до використання концентрацій АБ досліджувані штами можна за рівнем чутливості віднести до трьох груп: резистентні (МПК перевищує значення максимальної концентрації АБ у крові), помірно чутливі (МПК наближається до середньої чи максимальної концентрації) і високочутливі (чутливість яких до АБ знаходиться на рівні мінімальної концентрації). Такими концентраціями при визначенні чутливості до бензилпеніциліну є 0,05-0,2, 0,5 і 2,0 ОД/мл, до макролідів – 0,1, 0,5-1,0 і 4,0 мкг/мл, до аміноглікозидів – 0,5-1,0, 6,0-8,0 і 15,0-20,0 мкг/мл. [7]

### 2.1.1. Розведення в бульйоні

Розрізняють два основні варіанти методу серійних розведень в бульйоні: макрометод (пробірочний) і мікрометод (кінцевий об'єм 0,2 мл і менше). Макрометод через низьку продуктивність може використовуватись для оцінки чутливості одиничних штамів. [34]

Макрометод - тестування проводять в обсязі 1 мл кожного розведення АБП з кінцевою концентрацією досліджуваного мікроорганізму приблизно  $5 \cdot 10$  КУО / мл.

Поживний бульйон для визначення чутливості розливають по 0,5 мл в кожену пробірку. Кількість пробірок визначають за необхідним діапазоном розведень АБП і збільшують на одну для постановки "негативного" контролю.

Робочий розчин АБП готують з основного розчину з використанням рідкого живильного середовища. Концентрацію робочого розчину розраховують виходячи з необхідної максимальної концентрації в ряду серійних розведень, враховуючи фактор розведення препарату при подальшій інокуляції. Потім робочий розчин в кількості 0,5 мл за допомогою мікропіпетки зі стерильним наконечником вносять в першу пробірку, що містить 0,5 мл бульйону.

Ретельно перемішують і новим стерильним наконечником переносять 0,5 мл розчину АБП в бульйоні в другу пробірку, що містила спочатку 0,5 мл бульйону. Цю процедуру повторюють, поки не буде приготований весь

необхідний ряд розведень. З останньої пробірки 0,5 мл бульйону видаляють.

Таким чином, отримують ряд пробірок з розчинами АБП, концентрації яких відрізняються в сусідніх пробірках в 2 рази. Одночасно готують додаткові ряди серійних розведень АБП для тестування контрольних штамів. Серія розведень обов'язково повинна включати в себе прикордонні концентрації і допустимі діапазони МПК для контрольних штамів.

Для інокуляції використовують стандартну мікробну суспензію, еквівалентну 0,5 за стандартом МакФарланд, розведена в 100 разів на поживному бульйоні, після чого концентрація мікроорганізму в ній становитиме приблизно 10 КУО / мл.

За 0,5 мл інокулюму вносять в кожен пробірку, що містить по 0,5 мл відповідного розведення АБП, і в одну пробірку з 0,5 мл поживного бульйону без антибіотика ("негативний" контроль). Кінцева концентрація мікроорганізму в кожній пробірці досягне необхідної - приблизно  $5 \cdot 10$  КУО / мл. Інокулюм повинен бути внесений в пробірки з розведеннями АБП не пізніше 15-30 хв з моменту приготування.

Пробірки закривають стерильними ватно-марлевими пробками або металевими ковпачками і всі пробірки з тестованими штамми, крім пробірки "негативний" контроль, інкубують в звичайній атмосфері при температурі 35 ° С протягом 16-20 або 20-24 год (в залежності від виду досліджуваного мікроорганізму). Пробірку "негативний" контроль поміщають в холодильник при 4 ° С, де зберігають до обліку результатів. [21]

Для визначення наявності росту мікроорганізму пробірки з посівами переглядають в прохідному світлі. Зростання культури в присутності АБП порівнюють з референтної колбою ("негативний" контроль), що містить вихідний інокулюм і зберігалася в холодильнику. МПК визначають за найменшою концентрації АБП, яка пригнічує видимий ріст мікроорганізму.

Мікрометод - перевагами мікрометода є висока продуктивність і можливість тривалого зберігання заздалегідь приготовлених планшет. Тестування проводять кінцевий об'єм 0,2 мл і менше, що дозволяє значно скоротити кількість витратних матеріалів. Методика не має відмінностей від макрометоду, за винятком використовуваних обсягів поживного бульйону з розведеннями антибіотиків і інокулюму, але вимагає додаткового оснащення лабораторії багатоканальними піпетками, 96-



ямковими планшетами для імунологічних досліджень (з плоским дном) із стерильними кришками. [15]

Першим етапом є виготовлення планшет, придатних для зберігання. Після внесення робочих розчинів антибіотиків в лунки, запаяні в поліетилен планшети можуть зберігатися при температурі нижче  $-60^{\circ}\text{C}$  до моменту використання. Повторне заморожування-відтавання не допускається.

Для проведення дослідження планшети після вилучення з холодильника витримують до досягнення ними кімнатної температури, після чого проводять інокуляцію приготовленою суспензією досліджуваного мікроорганізму. При проведенні інкубації планшет обов'язково повинен бути закритий кришкою для запобігання висихання вмісту лунок.

Облік результатів проводять візуально або спектрофотометрично, порівнюючи зростання мікроорганізму в присутності АБП з ростом культури в осередку без АБП. За МПК приймають мінімальну концентрацію, що забезпечує повне пригнічення видимого росту досліджуваного штаму. [21]

Метод серійних мікророзведень в бульйоні легко піддається модифікаціям для розробки тест-систем.

### 2.1.2. Розведення в агарі

Принцип методу полягає в посіві тестованих мікроорганізмів на чашки Петрі з агаром, що містить послідовні подвійні розведення антибіотиків. Одночасно проводять тестування партії клінічних штамів і відповідних контрольних штамів, а також контроль росту мікроорганізмів на чашках без АБП і контроль чистоти культури шляхом висіву зразків інокулюму на неселективні поживні середовища.

З основного розчину досліджуваного АБП готують робочий розчин в концентрації, що в 10 разів перевершує максимальну з використовуваних в конкретному дослідженні. Потім готують серію дворазових розведень робочого розчину. Таким чином, концентрація АБП в кожному наступному розведенні повинна бути в 2 рази меншою, ніж в попередньому. Для приготування серії розведень використовують будь-які стерильні хімічно інертні лабораторні ємності з кришками об'ємом не менше 10 мл (для зручності розмішування). [30]

Сухе агаризоване живильне середовище розчиняють і автоклавують відповідно до інструкції виробника. Після автоклавовання колби з живильним середовищем поміщають на водяну баню при 48-50 ° С, де витримують до досягнення вказаної температури, після чого в них асептично вносять робочі розчини антибіотиків (1 частина робочого розчину АБП на 9 частин розплавленого агару) і, при необхідності, термолабільні поживні добавки. Потім середовище ретельно перемішують і розливають по чашках Петрі, товщина шару поживного середовища повинна бути 3-4 мм. [21]

Другим способом приготування чашок Петрі з агаром, що містить розведення АБП, є змішування живильного середовища і розчину АБП безпосередньо в чашці Петрі. Для приготування стандартних пластикових чашок діаметром 90 мм необхідно до 2 мл розчину АБП додати 18 мл розігрітого до 50°C рідкого агару. Чашки попередньо маркують із зазначенням препарату і його концентрації. Дуже важливо ретельно перемішувати агар до того, як він почне застигати для рівномірного розподілу АБП по всій товщі живильного середовища. Перемішування здійснюють на горизонтальній поверхні послідовно плавними різноспрямованими круговими рухами чашки. Після приготування чашок агар повинен затвердіти в горизонтальному положенні. Не можна різко пересувати, переносити чашки до повного застигання агару.

Паралельно з чашками Петрі, що містять розчини антибіотиків, для контролю росту готують чашки Петрі без антибіотиків. Чашки залишають при кімнатній температурі для застигання і підсушування на 10-12 год.

Після інокуляції чашки залишають при кімнатній температурі для підсихання, далі перевертають і інкубують при температурі 35 ° С протягом 18-24 год (в залежності від виду досліджуваного мікроорганізму).

Облік результатів проводять, помістивши чашку на темну, що не відбиває світло поверхню. За МПК приймають концентрацію, що викликала повну інгібіцію видимого росту. Для диференціювання росту від нальоту, що залишився після інокулята, в ряді випадків доцільно використовувати збільшення. Поява єдиної колонії на чашці з концентрацією на 1 розведення вище, ніж явна МПК, можна не враховувати. Результат оцінки антибіотикочутливості має сенс враховувати тільки при підтвердженні чистоти культури. [8]

## 2.2. Дифузійні методи

### 1..2.1. Метод дисків

Диско-дифузійний метод є одним з найстаріших і залишається найбільш поширеним методом оцінки антибіотикочутливості в звичайних бактеріологічних лабораторіях. Він підходить для дослідження більшості бактеріальних патогенів, в тому числі і для найбільш поширених бактерій зі складними живильними потребами. Метод є універсальним для широкого кола антимікробних препаратів і не потребує обов'язкового використання спеціального обладнання. [28]

Для оцінки чутливості бактерій зі звичайними живильними потребами використовують агар Мюллера-Хінтон (МХА) без додаткових добавок. Для бактерій зі складними живильними потребами використовують агар Мюллера-Хінтон з додаванням 5% механічно дефабринованої кінської крові. Живильні середовища, рекомендовані для оцінки антибіотикочутливості окремих бактерій наведені у таблиці 1.

Мікроорганізм	Середовище
<i>Enterobacteriaceae</i>	МХА
<i>Pseudomonas spp.</i>	МХА
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	МХА
<i>Acinetobacter spp</i>	МХА
<i>Staphylococcus spp.</i>	МХА
<i>Enterococcus spp</i>	МХА
Стрептококи груп А, В, С и G	МХА-П1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	МХА-П1
Стрептококи групи Viridans	МХА-П1
<i>Haemophilus spp.</i>	МХА-П1
<i>Moraxella catarrhalis</i>	МХА-П1

Таблиця 2.1. Живильні середовища для визначення антибіотикочутливості

Виготовлення чашок Петрі з МХА:

1. Виготовити і автоклавувати МХА за інструкцією виготовника.
2. Охолодити середовище до 42-45 °С.
3. Швидко розлити у чашки Петрі, таким чином, щоб товщина агара становила  $4\pm 0,5$ мм (що приблизно відповідає 25мл середовища на круглій чашці Петрі діаметром 100мм).
4. Не можна пересувати чашки Петрі до повного затвердіння середовища.
5. Для приготування інокулята використовується метод прямого суспендування в стерильному фізіологічному розчині колоній чистої 18-24-годинної культури бактерій, що виросла на щільному неселективному живильному середовищі.
6. Для цього стерильною бактеріологічною петлею або ватним тампоном необхідно зібрати кілька (якщо можливо) морфологічно схожих колоній, щоб уникнути відбору атипичних варіантів і суспендувати отриманий матеріал в стерильному фізіологічному розчині.
7. Для отримання суцільного газону рівномірно нанести інокулят штриховими рухами на всю поверхню агару в трьох напрямках, повертаючи чашку Петрі на 60°.
8. Диски з антибіотиками наносяться на поверхню інокульованого досліджуваною культурою і підсушеного агару. Контакт диска з агаром повинен бути щільним. Після нанесення на поверхню агару диски не можна пересувати, так як дифузія антибіотика в середовище починається дуже швидко.

Після інокуляції і нанесення дисків чашки Петрі протягом 15 хв повинні бути поміщені в термостат догори дном.

При вимірюванні зон пригнічення росту навколо дисків з будь-якими АМП слід орієнтуватися на зону повного пригнічення росту мікроорганізмів, яка визначається неозброєним оком, при розташуванні

чашки на відстані приблизно 30 см від очей. Вимірювання зон пригнічення зростання необхідно проводити з точністю до міліметра за допомогою лінійки, штангенциркуля або спеціальними автоматичними приладами для обліку результатів визначення чутливості диско-дифузійним методом. [22]

Для вимірювання зон пригнічення росту на оптично-прозорому середовищі (наприклад, МХА) чашку Петрі із закритою кришкою розташовують дном догори на темну матову поверхню, так щоб світло падало на неї під кутом  $45^\circ$  (облік у відбитому світлі). Для вимірювання зон пригнічення росту на оптично-щільному середовищі (наприклад, МХА-П) чашку Петрі поміщають дном донизу, так щоб світло падало на поверхню агару під кутом  $45^\circ$  (облік у відбитому світлі), кришку знімають. [3]

Виявлені в межах зони пригнічення росту окремі колонії необхідно субкультивувати, провести ідентифікацію і при необхідності повторити процедуру визначення чутливості. Якщо підозрілі колонії не є контоменантами, їх необхідно враховувати при вимірі зони пригнічення росту.

### 2.2.2. Метод Е-тесту

Е-тест (E-test) – добре продуманий метод для визначення чутливості до антибіотиків в лабораторіях усього світу. Він широко застосовується при вивченні резистентності як в діагностичних, так і в дослідних клініках. [19]

Тест являє собою кількісний метод визначення антибактеріальних та протигрибкових препаратів для інфекційних агентів, в тому числі септичних, що особливо важливо для тяжких хворих. В цьому методі нараховується більше 100 антибіотиків для тестування ряду аеробних бактерій та інших, таких як пневмококи, *H. pylori*, менінгококи, гонококи, анаеробні гриби та мікобактерії.

Е-тест дає можливість раціонального використання антибіотиків, щоб забезпечити найкращий результат для пацієнта. Тест надзвичайно важливий для визначення дози антимікробного препарату у пацієнтів з топографічно важкодоступною локалізацією джерела інфекції, хронічних інфекціях та у пацієнтів з імунodefіцитом. [28]

Принцип Е-тесту полягає в тому, що на пластикову тест-смужку нанесені послідовні розведення антибіотика від меншого до більшого. Це дозволяє

точно виділити по 15-ти розведенням антимікробну активність бактеріальних агентів.

Готують суспензію тест-мікроорганізмів в концентрації  $10^8$  КОЕ/мл, занурюють в неї стерильний тампон, рівномірними рухами розподіляють суспензію по поверхні середовища Мюллер-Хінтона чи АГВ (рН  $7,2 \pm 0,1$ ), поверхню середовища висушують. На чашку діаметром 90 мм наносять не більше двох смужок Е-тесту (на чашку діаметром 150 мм не більше 6), інкубують 16-18 годин.

Антибіотик з Е-теста центробіжно дифундує в середовище, в місці його активної дії ріст мікроорганізмів пригнічується і утворюється еліпсоїдна (каплевидна) зона затримки росту. Так як концентрація антибіотика на смужці знижується, то утворюється не концентрична, а еліпсоїдна зона затримки росту. Місце перетину основи еліпса зі шкалою концентрації Е-теста відповідає мінімальній інгібуючій концентрації (МІК) антибіотика. [22]

Інгібування росту мікроорганізмів навколо смужки-носія відбувається тільки в тій зоні, де концентрація антибіотика вище МІК. Визначають МІК тест-культури та порівнюють зі стандартними величинами МІК. Відносять тест-культуру до чутливої, помірно чутливої чи резистентної.

Е-тест має ряд переваг у контролі резистентності, так як він містить градієнт концентрацій, що здатний показати найменші зміни чутливості. Ширина градієнта концентрації цього тесту охоплює варіації чутливості мікроорганізмів і визначає як низький, так і високий рівні резистентності. Це найбільш чутливий тест на сьогоднішній час. Він є макрометодом, який може бути легко впроваджений в лабораторію для визначення чутливості. В еру відкриття нових інфекцій і збільшення резистентності їх до антибактеріальних препаратів, Е-тест визначений в усьому світі як найважливіша інновація у визначенні антимікробної активності. [3]

Перевагою цього методу є його простота та швидкість виконання, що дозволяє тестувати стрептококи, пневмококи, гемофіли, гонококи. Але метод Е-тесту не отримав дуже широкого використання через дорогу вартість матеріалів.

### **2.3. Прискорені методи визначення антибіотикочутливості**

Висока частота стійкості збудників гнійно-септичних захворювань до антибіотиків та зміна спектру і рівня стійкості популяцій мікроорганізмів протягом перебігу хвороби зумовлює необхідність визначення їх чутливості перед призначенням засобу для лікування. При використанні класичних методів визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків – методу серійних розведень в рідкому та густому живильному середовищі, а також методу паперових дисків – результати можуть бути отримані не раніше ніж через 20 годин від початку дослідження (з урахуванням часу, необхідного для виділення чистих культур – через 48-72 год.). [18]

Ефективність хіміотерапії підвищується під час раннього призначення етіотропного лікування, яке можна забезпечити використанням методів та засобів швидкого визначення антибіотикочутливості збудників захворювання. Створені для цього методи розділяють на прискорені, в яких досліджуються виділені чисті культури збудників та експрес-методи, що дозволяють встановити антибіотикограму збудників безпосередньо у нативному матеріалі чи первинному посіві, тобто без виділення чистих культур. [5]

Прискорені методи визначення антибіотикочутливості до хіміопрепаратів дають можливість отримати відповідь через 2-6 годин від початку дослідження чистих культур. За принципом реакцій, що виникають у результаті дії антибіотиків, можна виділити 5 груп прискорених методів, які засновані на:

- визначенні певних змін у активності ферментів бактерій: сутність методів цієї групи полягає у додаванні в м'ясо-пептонний бульйон з глюкозою антибіотику в необхідній концентрації і висіванні дослідного штаму мікроорганізмів. Стійкі до даного антибіотику мікроорганізми засвоюють глюкозу, що проявляється зміною кислотно-лужного потенціалу середовища. Для визначення змін рН середовища запропоновано використовувати індикатори, які змінюють свій колір під час зниження рН – феноловий червоний, індикатор Андреде та бромтімоловий синій.

- визначенні змін окисно-відновного потенціалу середовища мікроорганізмами, що розвиваються: методи цієї групи, що отримали найбільше поширення, засновані на виявленні змін окисно-відновного потенціалу середовища (rH<sub>2</sub>) в присутності антибіотиків за допомогою хімічних чи біологічних редокс-індикаторів. У зв'язку з цим для визначення чутливості бактерій різних видів можливо використання одних

і тих же індикаторів. Мікроорганізми, які є стійкими до антибіотика, ростуть та розмножуються у середовищі та знижують  $\text{rH}_2$  – потенціал, внаслідок чого індикатор, що додали в живильне середовище, змінює свій колір. Чутливі мікроорганізми в зоні дифузії антибіотиків не розмножуються і не змінюють  $\text{rH}_2$ , внаслідок цього колір середовища навколо дисків не змінюється. [4]

У ролі таких індикаторів знайшли використання резузарин, суспензії еритроцитів людини, кролика чи барана, 2,6-дихлорфеноліндофенол, 2,3,5-трифенілтетразолій хлорид, водні розчини кров'яної солі та залізоаміачних квасців, метиленовий синій, молібденовий амоній, солі азотної кислоти.

= цитоморфологічній оцінці змін бактеріальних клітин та формування мікроколоній: цитоморфологічні прискорені методи засновані на принципі того, що мікроорганізми, чутливі до антибіотиків при 3-4 часовому рості на середовищах з хіміопрепаратами, не збільшують розмірів мікробної клітини та не утворюють мікроколоній на спеціальних препаратах з живильними середовищами. Необхідність використання в методах цієї групи або спеціальних засобів для встановлення змін величини клітин, або мікрокамер, пластинок чи мембранних фільтрів з подальшим мікроскопічним визначенням формування на них мікроколоній у світовому, фазово-контрастному чи люмінісцентному мікроскопах робить ці методи трудомісними та потребуючими спеціального обладнання;

- визначення змін оптичної густини середовища популяції, що росте, чи включення радіоізотопів в мікробні клітини: запропоновані прискорені методи засновані на виявленні динаміки оптичної густини культур у присутності антибіотика за допомогою нефелометра та спектрофотометра;

- використанні спеціальних живильних середовищ зі стимуляторами росту: ця група заснована на використанні спеціальних живильних середовищ з ростовими стимуляторами для досягнення швидкого реєстрування змін у середовищі. В ролі таких стимуляторів використовують екстракт бичачого серця та глюкозу, кров та глюкозу, гіберелін.

М.І. Леві запропонував експрес-метод визначення чутливості до антибіотиків збудників гнійно-септичних інфекцій. Для експрес-аналізу був використаний метод серійних розведень антибіотиків у кольоровому живильному середовищі, що містить 0,002% індикатора бромкрезолпурпурного та 0,5% глюкози. Під час росту стійких до



антибіотиків мікроорганізмів знижується рН живильного середовища і індикатор змінює свій колір, чутливі до антибіотиків мікроорганізми колір середовища не змінюють. Дослідження проводили у пластикових планшетах, в луночках яких готували розведення антибіотиків на кольоровому живильному середовищі. В контрольні лунки вносили тільки кольорове живильне середовище. Гній з ран хворих людей брали ватним тампоном, змоченим у кольорове живильне середовище, готували розведення матеріалу та по 0,05 мл додавали в лунки планшетів з різними розведеннями антибіотиків. Планшети поміщали у термостат до зміни вихідного кольору живильного середовища у контрольних лунках (без антибіотиків) на жовтий (3-6 годин). Потім враховували результати аналізу. Збереження вихідного кольору живильного середовища в дослідній лунці свідчило про чутливість мікрофлори до даної концентрації антибіотика, поява жовтого кольору – про стійкість мікрофлори до такої концентрації препарату. [21]

Принципово новий метод експресного визначення лікарської стійкості мікроорганізмів розроблений на основі використання реакції ДНК-РНК гібридизації. Принцип методу полягає у застосуванні ДНК-зондів, що виявляють у мікробів генетичні детермінанти, які кодують плазмідну чи хромосомну резистентність популяції мікроорганізмів до певних типів чи груп антибіотиків. ДНК-зонди мітяться радіоактивною, люмінісцентною чи ферментною міткою. При використанні ДНК-зондів не потребується виділення чистої культури мікробів чи вирощування матеріалу на живильних середовищах, що значно скорочує термін дослідження.

Чутливість реакції ДНК-ДНК гібридизації може бути значно підвищена при попередньому використанні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), в якій за 30-40 циклів протягом години з одного ДНК-фрагменту можна отримати до  $10^8$  ампліконів. Після накопичення ДНК та її рестрикції ендонуклеазами генетичний аналіз фрагментів проводять у реакції ДНК-ДНК гібридизації. Завдяки високій специфічності і чутливості спільного використання ПЛР і методу молекулярної гібридизації забезпечується можливість отримання результатів протягом 6-8 годин від початку дослідження нативного матеріалу. Однак, необхідність наявності складного та дороговартісного обладнання та реактивів обмежує використання методів молекулярної діагностики на практиці.

## РОЗДІЛ III. АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ТА ПРОТИВІРУСНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНИХ ПУРИНІВ

### 3.1. Туберкулостатична активність похідних 2-аміно-6-хлорпурину

Лікування туберкульозу залишається однією з найбільш важливих проблем охорони здоров'я, оскільки це захворювання є одним з найпоширеніших інфекційних захворювань в світі. Щорічно від туберкульозу вмирає 1,5 млн людей. Особливу небезпеку становлять форми туберкульозу, що володіють множинною лікарською стійкістю (МЛС-ТБ) до наявних препаратів. [1]

Пуринові основи розглядаються як перспективний клас для створення на їх основі нових протитуберкульозних засобів. В ряді похідних пурина виявлені сполуки, що володіють високою протитуберкульозною активністю *in vitro*.

Відомо, що хлорвмісні похідні пурина володіють і деякими іншими видами біологічної активності: фунгіцидною та протипухлинною. Також експериментально встановлено, що хлорвмісні 9-бензилпурини проявляють високу антимікобактеріальну активність. [42]

Механізм туберкулостатичної активності похідних пурина на сьогоднішній день залишається невивченим. Можливо, він пов'язаний з тим, що сполуки на основі пурину можуть володіти високою інгібуючою активністю відносно ферментів, що володіють кіназною активністю, в тому числі протеїнкіназ.

Метою дослідження було вивчення туберкулостатичної активності N-ацетилпохідних 2-аміно-6-хлорпурину (Ia) і здатності найбільш активних з

них інгібувати мікобактеріальні серин-треонінові протеїнкінази (СТПК). На основі доступної сполуки 2-аміно-6-хлорпурина (Ia), по відомим методикам було отримано такі N-ацил-2-аміно-6-хлорпурини, як 2-ацетиламіно-6-хлор-9H-пурин (Iб), 2-форміламіно-6-хлор-9H-пурин (Iв), -трифторацетиламіно-6-хлор-9H-пурин (Iг) і 2-трет-бутилоксикарбоніл-аміно-6-хлор-9H-пурин (Iд).

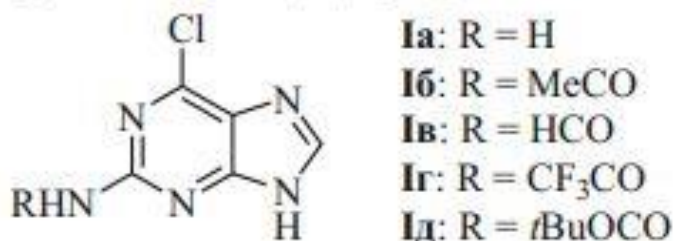


Рис. 3.1

Дослідження туберкулостатичної активності сполук Ia-д у відношенні лабораторного штаму *Mycobacterium tuberculosis H37Rv in vitro* проведено методом вертикальної дифузії. Для приготування розчинів досліджуваних сполук Ia-д наважку сполуки (10мг) розчиняли у 5,0 мл ДМСО. Далі до отриманого розчину додавали 5,0 мл стерильної дистильованої води і отримували розчин А (концентрація 1000 мкг/л). До 2,0 мл розчину А додавали 18,0 мл води і отримували перше розведення – 100 мкг/мл. Далі, використовуючи метод двократних серійних розведень, отримували розчини досліджуваних сполук в наступних концентраціях: 12,5; 6,2; 3,1; 1,5; 0,7; 0,35; 0,16 мкг/мл. [43]

Виготовлення розчинів препаратів для порівняння – ізоніазиду та офлоксацину – проводили насупним чином: наважку ізоніазиду (20 мг) розчиняли у 20 мл дистильованої води і отримували розчин Б (концентрація 1000 мкг/мл). До 1,0 мл розчину Б додавали 9,0 мл води і отримували перше розведення – 100 мкг/мл. У випадку офлоксацину (20 мг) розчиняли у 20 мл 0,1 н. розчину NaOH і отримували розчин В (концентрація 1000 мкг/мл); далі до 3 мл розчину В додавали 12 мл дистильованої води і отримували розчин з концентрацією 200 мкг/мл; використовуючи метод серійних розведень, отримували розчин офлоксацину з кінцевою концентрацією 0,1 мкг/мл.

Живильне середовище розливали у нахилені пробірки по 5 мл таким чином, щоб ½ частина дна залишалась вільною. Середовище засівали по 0,1

мл суспензією мікобактерій різних штамів, розведених у відповідності до міжнародного стандарту мутності 10 од. і в нахиленому стані поміщали у термостат на 24 години для вирощування мікобактерій. Через 1 добу пробірки ставили у вертикальне положення і по вільному краю додавали по 0,3 мл розчинів сполук у досліджуваних концентраціях: 12,5; 6,2; 3,1; 1,5; 0,7; 0,35 мкг/мл. Потім пробірки розміщували у термостаті за температури 37 °С та інкубували протягом 10 діб. Оцінку росту мікобактерій проводили за стандартною методикою, відповідно до якої поява зон затримки росту мікобактерій (більше 10 мм) свідчить про наявність туберкулостатичних властивостей сполуки. Затримка росту 100 мм та більше свідчить про повну затримку росту бактерій. У якості контролю застосовували ізоніазил та офлоксацин у відповідних концентраціях.

Результати, представлені в таблиці, свідчать про те, що 2-аміно-6-хлорпурин (Ia), 2-ациламіно-6-хлорпурини Ib та Iv володіють високою туберкулостатичною активністю (МІК від 0,7 до 1,5 мкг/мл).

Ці сполуки також протестовані на штамів *M. avium*, *M. terrae* та клінічному штамі з МЛС-ТБ, виділеном у людини, що хворіє на туберкульоз. В таблиці представлені результати дослідження сполук у порівнянні з відомими лікарськими засобами ізоніазидом та офлоксацином. Встановлено, що сполуки Ia-в володіють високою туберкулостатичною активністю відносно усіх досліджуваних штамів. Для сполук Ia-г, що проявили антимікобактеріальну активність, була вивчена їх цитотоксична активність по відношенню до фібробластів ембріону людини (шкірно-м'язова тканина). Встановлено, що сполуки Ia-г є практично нетоксичними ( $IC_{50} > 50$  мкМ). [42]

З метою визначення можливого механізму туберкулостатичної активності перевірена здатність сполук Ia-г інгібувати мікобактеріальні серин-треонінові протеїнінази (СТПК). Перевірка проводилась методом паперових дисків в тест-системі *M. smegmatis* *aphVIII+*, валідованої для відбору інгібіторів мікобактеральних СТПК, а особливо для кінази PknA. Ключовим елементом цієї тест-системи є фермент аміноглікозид-3'-фосфотрансфераза тип APHVIII штама *Streptomyces rimosus* ATCC 10970, що забезпечує стійкість актинобактерій до катаміцину.

*Таблиця 3.1.*

Сполука	Антимікобактеріальна активність* (МІК), мкг/мл				Цитотоксичність** ICW <sub>50</sub> , мкМ
	H37Rv	<i>M. avium</i>	<i>M. terrae</i>	МЛС-ТБ***	
<b>Ia</b>	0,7	0,7	0,35	0,7	>50
<b>Iб</b>	1,5	1,5	1,5	1,5	>50
<b>Iв</b>	1,5	1,5	0,7	1,5	>50
<b>Iг</b>	6,2	6,2	6,2	6,2	>50
<b>Iд</b>	12,5	...	...	...	...
Ізоніазид	0,1	0,1	0,1	-	
Офлоксацин	0,1	0,1	0,1	0,1	

Продовження Табл. 3.1.

Таким чином, серед похідних 2-аміно-6-хлорпурину виявлені сполуки, які проявляють високу туберкулоостатичну активність. Їх подальша хімічна модифікація може призвести до отримання сполук, що є перспективними для створення лікарських засобів для лікування туберкульозу. Сполуки є практично нетоксичними. Встановлено, що туберкулоостатична активність похідних 6-хлорпурину не пов'язана з інгібуванням ними СТПК. [37]

### 3.2. Похідні пурину, які володіють протівірусною активністю

Похідні пурину за різноманітністю біологічної активності, що вони проявляють, займають одне з провідних місць серед гетероциклічних сполук. Важливу біологічну роль відіграють гідрокси- та амінопохідні пурину (аденін та гуанін), які входять до складу нуклеозидів, нуклеотидів та нуклеїнових кислот. В медицині застосовують наступні похідні пурину: 6-меркаптопурин, тіогуанін та їх похідні (онкологічні захворювання), 9-гідроксиетоксиметилгуанін (ацикловір) та його похідні (антигерпесні засоби). Варто зазначити, що систематизований пошук антивірусної активності в ряді пуринових похідних до теперішнього часу не був проведений. В той же час в ряді нуклеозидів були відкриті ефективні сполуки, які в справжній час застосовуються для лікування ВІЛ, герпесу, гепатитів В і С і інших вірусних інфекцій. [44]

В лабораторній стереохімії ферментативних реакцій було отримано більше 50 похідних пурину, протівірусні властивості яких були вивчені в

Інституті Рега католицького університету Леувена, Бельгія. Були відкриті сполуки, що володіють значною активністю відносно вірусу поліомієліту, вірусу Коксакі та ентеровірусу. Ці похідні демонструють широкий спектр біологічної активності. Було досліджено, що природні похідні цитокінів N6-ізопентеніладенозин та N6-бензиладенозин проявляють високу антиентеровірусну активність, але мають високу цитотоксичність. [47]

Цитомегаловіруси (ЦМВ), або віруси герпесу людини 5 типу, надзвичайно широко поширені серед людської популяції. В промислово розвинутих країнах, насамперед у США та Європі, більшість населення інфіковано цим вірусом. За статистикою, більше ніж 50% сільського та до 90% міського населення віком до 40 років є його носіями. У людей з нормальним імунним статусом ЦМВ інфекція може протікати безсимптомно і знаходитися в організмі в латентному стані. При послабленні імунітету ЦМВ проявляються у вигляді мононуклеозу чи у генералізованій формі, при якій можуть уражатися практично всі органи (печінка, нирки, селезінка, підшлункова залоза, стравохід, кишківник, легені, головний мозок). [49]

Відомо, що багато похідних пурину, в тому числі нуклеозидні та нуклеотидні похідні пуринових основ аденіну та гуаніну, володіють вираженою противірусною активністю.

Ізопринзин – синтетичне комплексне похідне пурину, що володіє імуностимулюючою активністю та неспецифічним противірусним імунітетом. Він відновлює функції лімфоцитів в умовах імунодепресії, підвищує бластогенез в популяції моноцитарних клітин, стимулює експресію мембранних рецепторів на поверхні Т-хелперів, попереджує зниження активності лімфоцитів під впливом глюкокортикостероїдів. Ізопринозин проявляє противірусну активність *in vivo* по відношенню вірусів *Herpes simplex*, цитомегаловірусу та вірусу кіру, вірусу Т-клітинної лімфоми людини тип III, поліовірусів, грипа А і В, ЕСНО-вірус (ентероцитопатогенний вірус людини), енцефалокардиту і кінського енцефаліту. Механізм противірусної дії цієї речовини пов'язаний з інгібуванням вірусної РНК та ферменту дигідрооптероатсинтетази, що бере участь у реплікації деяких вірусів, посилює пригнічений вірусами синтез мРНК лімфоцитів, що супроводжується пригніченням біосинтезу вірусної РНК і трансляції вірусних білків, підвищує продукування лімфоцитів, що володіють противірусною дією інтерферонів – альфа і гамма. [45]

Ациклічний аналог гуанозину-9-(2-гідроксиетоксиметил)гуанін (ацикловір) став першим ефективним антигерпесним противірусним засобом пуринової природи, що був введений в клінічну практику. Ряд похідних та аналогів ацикловіра пуринової природи також демонструють яскраво виражену протигерпесну активність.

Близькими структурними аналогами ацикловіру є 9-[(1,3-дигідрокси-2-пропокси)метил]гуанін (ганцикловір), що значно перевершує ацикловір за спектром противірусної активності, та його різноманітні N-алкілпохідні, також активні у відношенні герпесвірусів. Описаними є ізомерні аналоги ацикловіру та ганцикловіру, що володіють противірусною активністю та мають принципово іншу будову ациклічного ланцюга, сполученої з положенням N9 пуринового циклу безпосередньо через атом водню. [48]

У 2001 році був зареєстрований новий, більш ефективний анти-ЦМВ засіб, запропонований для лікування ЦМВ ретиніту, - валганцикловір, що є пролікарською формою ганцикловіру, його ефіром з L-валіном. [46]

Серед похідних аденіну, що демонструють виражену антивірусну дію, відомий 9-(S)-(2,3-дигідроксипропіл)аденін, що володіє широким спектром противірусної активності, а також ациклічні фосфонатні аналоги аденінових нуклеотидів.

Однак всі вище описані похідні пурину, за виключенням ганцикловіру, не володіють рівнем анти-ЦМВ дії, достатньої для створення на їх основі лікарських засобів для лікування ЦМВ інфекції.

## ВИСНОВКИ

1. Алкалоїди мають широкий спектр фармакологічної активності, включаючи протималярійну (хінін), антиастматичну (ефедрин), протипухлинну (гомоаррингтін), антиаритмічну (квінідин), знеболюючу (морфін), антибактеріальну (хелеритрін) та антигіперглікемічну активність (піперін). Інші алкалоїди мають психотропну (псилоцин), стимулюючу (кофеїн, кокаїн, теобромін) та токсичну дію (атропін, тубокурарін).

У порівнянні з більшістю інших класів природних сполук, алкалоїди характеризуються більшим структурним різноманіттям.

Найбільш поширеним серед цих сполук є кофеїн. Він є стимулятором серцевої діяльності ті нервової системи і міститься у какао-бобах. Головний механізм дії кофеїну полягає у його антагонізмі по відношенню до рецепторів аденозину, останній володіє седативною та розслаблюючою дією.

2. Основними методами визначення антибіотикочутливості в мікробіології є метод серійних розведень у бульйоні та агарі, та дифузні методи, такі як метод дисків та Е-тесту.

Методи розведення засновані на використанні подвійних послідовних розведень концентрацій антибіотика від максимальної до мінімальної і базуються на прямому визначенні величини мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). З двох способів визначення чутливості (у бульйоні та агарі) точнішим є розведення у рідкому середовищі, бо результати, що отримані у агарі, є менш постійними. Недоліком методу серійних розведень і їх висока трудоемність, яка обмежує його використання в звичайних бактеріологічних лабораторіях.



Диско-дифузійний метод є одним з найстаріших і залишається найбільш поширеним методом оцінки антибіотикочутливості. Він підходить для дослідження більшості бактеріальних патогенів. Метод є універсальним для широкого кола антимікробних препаратів і не потребує обов'язкового спеціального обладнання.

Метод Е-тесту широко застосовується при вивченні резистентності як в діагностичних, так і в дослідних клініках. Він дає можливість раціонального використання антибіотиків, щоб забезпечити найкращий результат для лікування. Перевагою цього методу є його простота та швидкість виконання, але він не отримав широкого застосування через дорогу вартість матеріалів.

3. Лікування туберкульозу залишається однією з найбільш важливих проблем охорони здоров'я, оскільки щорічно від нього вмирають 1,5 млн людей. Пуринові основи розглядаються як перспективний клас для створення на їх основі нових протитуберкульозних засобів, бо в ряді похідних пурина виявлені сполуки, що володіють високою туберкулостатичною активністю *in vitro*. Механізм цієї активності на сьогоднішній день залишається невивченим. Можливо, він пов'язаний з тим, що сполуки на основі пурину можуть володіти високою інгібуючою активністю відносно ферментів, що володіють кіназною активністю, в тому числі протеїнкіназ.

Похідні пурину за різноманітністю біологічної дії займають одне з провідних місць серед гетероциклічних сполук. Серед них 9-гідроксиетоксиметилгуанін (ацикловір) та його похідні, що володіють вираженою противірусною активністю. Варто зазначити, що систематизований пошук антивірусної дії в ряді пуринових похідних до теперішнього часу не був проведений. В той же час в ряді нуклеозидів були відкриті сполуки, які в справжній час застосовуються для лікування ВІЛ, герпесу, гепатитів В і С та інших вірусних інфекцій.

Було досліджено, що природні похідні цитокінів N6-бензиладенозин проявляють високу антиентеровірусну дію, але мають високу цитотоксичність.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Архипов В.В. Фармакоэкономический подход к терапии хронической обструктивной болезни легких // Consilium Medicum.– 2010. – Т. 12 , №3.
2. Безуглий П.О. Фармацевтична хімія: підручник / Безуглий П.О. — Вінниця: Нова Книга, 2008. — 560 с.
3. Белетов Н.В., Корнелаева Р.П., Кострина П.Г.. Санитарная микробиология. - М.: Пищевая промышленность, 1980г. - 352с.
4. Беясова, Н.А. Микробиология: Учебник / Н.А. Беясова. - Мн.: Вышэйшая шк., 2012. - 443 с.
5. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. - М., 2004.
6. Вартанян Р.С. Синтез основных лекарственных средств / Вартанян Р.С. — М., 2004; Компендиум 2015 —
7. Волкова Е.А. Культуральные свойства энтеробактерий на диагностических средах//Ветеринария. - 2009г. - №2 . – с.26-29
8. Воробьев А.А., Кривошеин Ю.С., Широкобоков В.Н. Медицинская и санитарная микробиология. - М.: издательский центр Академия, 2006г., 464с
9. Гаевый М. Фармакотерапия с основами клинической фармакологии. / Гаевый М.Д., Галенко-Ярошевский П.А., Петров В.И. — Волгоград, 1996. - 452 с.

10. Генри Т.А. Химия растительных алкалоидов. / Пер. с англ. под ред. акад. В.М. Родионова и докт. хим. наук Н.С. Вульфсона. — М.: Государственное научно-техническое издательство химической литературы, 1956. — 904 с.
11. Головенко Н. Биохимическая фармакология препаратов. / Головенко Н. Я. Кравченко И. А. — Одесса : Экология, 2007. — 360 с.
12. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. В 2 т. — М., 1986; Орехов А.П. Химия алкалоидов. — М., 1955; Химическая энциклопедия / Гл. ред. И.Л. Кнунянц. — М., 1988. — Т. 1; Юнусов М.С. Алкалоиды. — Ташкент, 1981.
13. Донецкая, Э.Г. Клиническая микробиология: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики / Э.Г. Донецкая. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. - 480 с.
14. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и аллергология / М.: Мед.информ. агентство.- 2003.- С.113–127.
15. Казак Л.І. та ін. – Вінниця, Нова книга, 2010. – 784 с.
16. Кишкун А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике / Кишкун А.А. – М.:Мединформ агенство. – 2006. – 532 с.
17. Клінічна і лабораторна імунологія. За загальною ред. Кузнецової Л.В., Фролова В.М., Бабаджана В.Д. Національний підручник. К. ООО «Поліграф плюс», 2012. – 922 с.: іл.
18. Клінічна імунологія та алергологія / О.М. Біловол,П.Г. Кравчун, В.Д. Бабаджан та ін. – Х.: «Гриф», 2011.- 550 с.
19. Красильников А.П., Романовская Т.Р.. Микробиологический словарь-справочник. - Минск: «Асар», 1999г.
20. Кресюн В. Фармакокинетические основы взаимодействия организма и лекарств. / Кресюн В. И., Бажора Ю. И. – Одесса : Одеский медуниверситет. 2007. – 163 с.

21. Мерджинов М.М. и др. Диагностическая эффективность питательных сред для бактериологического выявления энтеробактерий. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - 2005г. - №4. - с.15-18
22. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания.
23. Нековаль І.В. Фармакологія: підручник / І. В. Нековаль, Т. В. Казанюк. — 4-е вид., виправл. — К.: ВСВ «Медицина», 2011.— 520 с.
24. Новиков Д.К., И.И. Генералов, Н.В. Железняк, В.К.Окулич «Медицинская иммунология». – Минск-Витебск, 1998.
25. От субстанции к лекарству / Под ред. В.П. Черных. — Х., 2005
26. Посохова К. Фармакологія. Підручник / Посохова К.А., Скакун М.П. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2003. – 740 с.
27. Пяткин К.Д., Кривошеин Ю.С.. Микробиология. - М.: Медицина, 1980г. - 512с.
28. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1/ Под. ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Воминой. - М.: Издательство БИНОМ, 2008г. - 1800с.
29. Сергеев П.В. Очерки биохимической фармакологии. / Сергеев П.В., Галенко-Ярошевський П.А., Шимановський Н.Л. - Москва:РЦ «Фармединфо», 1996. - 384 с.
30. Ситник І.О., Климнюк С.І., Творко М.С. Мікробіологія, вірусологія, імунологія, для вищих медичних навчальних закладів І-ІІ рівнів акредитації / І.О. Ситник, С.І. Климнюк, М.С. Творко - Тернопіль: Укр-медкнига, 1998. - 392 с.
31. Соодаева С.К. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе ХОБЛ // Атмосфера. Пульмонология и аллергология. – 2000.– № 5.– С. 27–31.
32. Творко М.С. Імунологія (лекції для студентів медичного факультету) / М.С.Творко.- Тернопіль: ТДМУ, 1998. - 186 с.

33. Творко, М. С. Основи імунології (теорія і практика): навчальний посібник / М. С. Творко, С. І. Климнюк, Н. І. Ткачук. - Тернопіль : Укрмедкнига, 2009. - 298 с.
34. Тимаков В.Д., Левашев В.С., Борисов Л.Б. Микробиология. - М.: «Медицина», 1983 - 512с.
35. Титов Л.П. «Иммунология. Терминологический словарь». – Мн, 2002.
36. Фармакологія. Підручник для студентів медичних факультетів / Чекман І.С., Горчакова Н.О.,
37. Хаитов Р.М. Иммунология: учебник для медицинских вузов / Хаитов Р.М. – М., Из-во «ГОЭТАР Медиа» - 2006.
38. Харкевич Д.А. Фармакология. - Москва: «ГЭОТОР-МЕДИА», 2008. - 750с
39. Чекман І. Фармакологія. Підручник / Чекман І.С., Туманов В.А., Горчакова Н.О. та ін. – К.: Вища школа, 2001. – 598 с.
40. Чучалин А.Г. Система оксиданты и антиоксиданты и пути коррекции // Пульмонология. – 2004. – № 4. – С. 111 – 115.
41. Швайка О. Основи синтезу лікарських речовин та їх проміжних продуктів. — Донецьк, 2004
42. Якобисяк М. Імунологія / Переклад з польської за ред. проф. В.В. Чоп'як. – Вінниця: Нова книга, 2004.
43. Ярилин А.А. Иммунология: учебник / Ярилин А.А. – М., Медицина, 2010.
44. Agut H. Le cytomegalovirus en pediatrie // Sem. Hop. Paris. - 1988. - Vol.64. - No. 16. - P. 1103-1109
45. Curran M., Noble S. Valganciclovir // Drugs. - 2001. - Vol. 61. - N 8. - P. 1145-1150; Cocohoba J.M., McNicholl I.R. Valganciclovir: an advance in cytomegalovirus therapeutics // Ann. Pharmacother. - 2002. - Vol. 36. - N 6. - P. 1075-1079
46. Kestelyn P.O., Cunningham E.T. HIV/AIDS and blindness // Bull. World Health Org. - 2001. - Vol. 79. - N 3. P. - 208-213

47. Peters B.S., Beck E.J., Anderson S., Coleman D., Coker R., Main J., Migdal C., Harris J.R.W., Pinching A.J. Cytomegalovirus infection in AIDS. Patterns of disease, response to therapy and trends in survival // *J. Infect.* - 1991. - Vol. 23. - P. 129-137
48. Rubin R.H. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplantant recipients // *Rev. Infect. Dis.* - 1990. - Vol. 12. - P. 754-766
49. Stevens J.G. Human herpesviruses: a consideration of the latent state // *Microbiol. Rev.* - 1989. - Vol. 53. - No. 3. - P. 318-332