

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ім. М.І. ПИРОГОВА МОЗ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Настенко Володимир Борисович

УДК: 615.281.8:547.233:576.8:579+582.28+576.89

ДИСЕРТАЦІЯ
АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ ЧЕТВЕРТИННИХ СОЛЕЙ
АРИЛОКСИЕТОКСИ ДІАЛКІЛ АМОНІЮ В УМОВАХ
ЕКСПЕРИМЕНТУ

091 «Біологія»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії в галузі «Біологія»

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ **В.Б. Настенко**

Наукові керівники

Ковальчук Валентин Петрович, доктор медичних наук, професор

Широбоков Володимир Павлович, академік НАН та НАМН України,
доктор медичних наук, професор

Вінниця 2025

АНОТАЦІЯ

Настенко В. Б. Антимікробні властивості четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію в умовах експерименту. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 09 «Біологія» за спеціальністю 091 «Біологія» – Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова МОЗ України; Вінниця, 2025.

Метою дисертаційної роботи є вивчення антимікробних властивостей новосинтезованих похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію в умовах експерименту.

Дисертація присвячена вивченню антимікробних властивостей новосинтезованих четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію в умовах експерименту для оцінки їхнього потенціалу як перспективних агентів проти широкого спектра патогенних мікроорганізмів, включаючи штами з ознаками антибіотикорезистентності.

В умовах глобального зростання антибіотикорезистентності пошук нових антимікробних засобів з альтернативними механізмами дії є вкрай актуальним. Завдяки амфіфільній природі, наявності катіонного центру та здатності до взаємодії з мембранами мікроорганізмів, четвертинні амонієві сполуки розглядаються як перспективні кандидати для розробки нових антибактеріальних і антимікотичних препаратів.

У межах проведеного дослідження здійснено комплексну оцінку протимікробної активності 52 новосинтезованих похідних арилоксиетокси діалкіл амонію. Дослідження охоплювали референтні та клінічні штами грампозитивних бактерій (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), нетуберкульозних мікобактерій (*Mycobacterium smegmatis*, *M. terrae*, *M. avium*, *M. B5*), грибів роду *Candida* spp., пліснявих грибів (*Aspergillus niger*) та вільноживучих амеб (*Acanthamoeba* spp.).

Під час вивчення антибактеріальної активності встановлено, що похідні з 2,4-дітретбутилфеноксигрупою та тетраметилбутильним фрагментом демонстрували найвищу ефективність проти грампозитивних коків. Серед усіх досліджених сполук виділено найбільш активні Кс22, Кс14, Кр18 та Кр19, мінімальні інгібуючі концентрації яких щодо референтного штаму *S. aureus* ATCC 25923 становили 1,17-1,56 мкг/мл. Медіанні значення МІК для клінічних ізолятів MSSA і MRSA знаходилися в межах 1,95-3,9 мкг/мл, що свідчить про високу активність незалежно від фенотипу резистентності.

Антимікобактеріальна активність досліджуваних сполук проявлялася щодо *M. smegmatis*, *M. terrae*, *M. avium* та штаму *M. B5*. Найактивніші речовини (Кс22, Кс14, Кр18, Кр19) продемонстрували мінімальні інгібуючі концентрації на рівні 4,0-6,0 мкг/мл, що підкреслює перспективність подальшого вивчення їхньої дії на мікобактерії.

У дослідженні протигрибкової активності встановлено, що найбільш чутливими до дії сполук були штами *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* та *C. auris*, з медіаною МІК у межах 2-12 мкг/мл. Плісняві гриби *Aspergillus niger* також виявляли чутливість, хоча для них ефективні концентрації були вищими. Дослідження протиамебної активності продемонстрували здатність активних сполук інгібувати життєдіяльність амеб роду *Acanthamoeba*, що є важливим у контексті профілактики та лікування важких очних і шкірних інфекцій.

Фармакодинамічні дослідження методом *time-kill* показали концентраційно- і часозалежний характер антимікробної дії. При застосуванні концентрації $2 \times \text{МІК}$ досягалося зниження життєздатності патогенів на $\geq 3 \log_{10}(\text{CFU/мл})$ протягом перших 4-6 годин експозиції, що свідчило про бактерицидний або фунгіцидний ефект залежно від об'єкта дослідження. Встановлено тривалий постантибіотичний ефект найбільш активних сполук: понад 4 години щодо *S. aureus*, 2,5-3 години щодо *Ent. faecalis* та до 3 годин щодо *C. albicans*.

Результати МТТ-аналізу на клітинах HEp-2 свідчать про сприятливий профіль безпеки найбільш активних сполук. При концентраціях до 31,25 мкг/мл

життєздатність клітин зберігалася на рівні 75-88%, що демонструє прийнятний рівень токсичності для подальших доклінічних досліджень. Особливо низький цитотоксичний ефект спостерігався для сполук Кс22, Кр18 та Кр19, які навіть при концентрації 15,63 мкг/мл забезпечували життєздатність клітин понад 85%, а при 7,81 мкг/мл – понад 90%. Сполука Кс14, яка також продемонструвала високу антимікробну активність, виявила дещо вищу токсичність на клітинному рівні, однак життєздатність залишалася вище порогового рівня 70% при концентрації до 15,63 мкг/мл. Таким чином, Кс22, Кр18 і Кр19 можуть розглядатися як найбільш збалансовані за співвідношенням ефективність/цитотоксичність кандидати для подальшої доклінічної розробки.

Отримані результати вказують на перспективність сполук Кс22, Кс14, Кр18 та Кр19 як кандидатів для створення нових антимікробних агентів широкого спектра дії. Їх висока активність щодо референтних і клінічних штамів грампозитивних бактерій, мікобактерій, грибів роду *Candida* та проти амеб свідчить про значний потенціал для подолання існуючих викликів, пов'язаних із розвитком антибіотикорезистентності.

Ключові слова: арил ациклічні аміноспирти, антимікробна активність, протигрибкові препарати, антибіотики, антибіотикорезистентність, мультирезистентність до антибіотиків, фармакокінетика, постантибіотичний ефект, декаметоксин, токсичність, грампозитивні мікроорганізми, грамнегативні мікроорганізми, мікобактерії, кандиди, експеримент.

SUMMARY

Nastenka V.B. Antimicrobial properties of quaternary salts of aryloxyethoxy dialkyl ammonium in the experiment - Qualification scientific work on the rights of manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 09 “Biology”, specialty 091 “Biology” – National Pirogov Memorial Medical University, Ministry of Health of Ukraine; Vinnytsia, 2025.

The aim of the dissertation is to study the antimicrobial properties of newly synthesized quaternary aryloxyethoxy dialkyl ammonium derivatives in the experimental conditions.

The dissertation is devoted to the study of antimicrobial properties of newly synthesized quaternary salts of aryloxyethoxy dialkyl ammonium in the experimental conditions to assess their potential as promising agents against a wide range of pathogenic microorganisms, including strains with signs of antibiotic resistance.

In the context of the global growth of antibiotic resistance, the search for new antimicrobial agents with alternative mechanisms of action is extremely important. Due to their amphiphilic nature, the presence of a cationic center and the ability to interact with the membranes of microorganisms, quaternary ammonium compounds are considered as promising candidates for the development of new antibacterial and antimycotic drugs.

In the present study, a comprehensive evaluation of the antimicrobial activity of 52 newly synthesized aryloxyethoxy dialkyl ammonium derivatives was carried out. The study covered reference and clinical strains of gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), nontuberculous mycobacteria (*Mycobacterium smegmatis*, *M. terrae*, *M. avium*, *M. B5*), and fungi of the genus *Candida* spp.

The study of antibacterial activity revealed that derivatives with a 2,4-ditrobutylphenoxy group and a tetramethylbutyl fragment showed the highest efficacy against Gram-positive cocci. Among all the studied compounds, the most active were Kc22, Kc14, Kp18 and Kp19, whose minimum inhibitory concentrations against the reference strain *S. aureus* ATCC 25923 were 1.17-1.56 µg/ml. The median MIC values for clinical isolates of MSSA and MRSA were in the range of 1.95-3.9 µg/ml, indicating high activity regardless of the resistance phenotype.

The antimycobacterial activity of the studied compounds was manifested against *M. smegmatis*, *M. terrae*, *M. avium* and *M. B5* strain. The most active substances (Kc22, Kc14, Kp18, Kp19) showed minimal inhibitory concentrations at

the level of 4.0-6.0 µg/ml, which emphasises the prospects for further study of their effect on mycobacteria.

In the study of antifungal activity, it was found that the most sensitive to the action of the compounds were *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. auris* strains, with a median MIC in the range of 2-12 µg/ml. The mold *Aspergillus niger* also showed sensitivity, although the effective concentrations were higher for them. Studies of antiamoebic activity demonstrated the ability of the active compounds to inhibit the vital activity of *Acanthamoeba* amoebae, which is important in the context of the prevention and treatment of severe eye and skin infections.

Pharmacodynamic studies by the time-kill method showed a concentration- and time-dependent nature of the antimicrobial effect. When using a concentration of 2×MIC, a decrease in pathogen viability by $\geq 3 \log_{10}(\text{CFU/ml})$ was achieved during the first 4-6 hours of exposure, which indicated a bactericidal or fungicidal effect depending on the test object. A long-lasting postantibiotic effect of the most active compounds was found: more than 4 hours against *S. aureus*, 2.5-3 hours against *Ent. faecalis* and up to 3 hours against *C. albicans*.

The results of the MTT assay on HEP-2 cells indicate a favorable safety profile of the most active compounds. At concentrations up to 31.25 µg/ml, cell viability was maintained at 75-88%, which demonstrates an acceptable level of toxicity for further preclinical studies. A particularly low cytotoxic effect was observed for compounds Kc22, Kp18 and Kp19, which even at a concentration of 15.63 µg/ml provided cell viability of more than 85%, and at 7.81 µg/ml - more than 90%. The compound Kc14, which also demonstrated high antimicrobial activity, showed slightly higher toxicity at the cellular level, but viability remained above the threshold level of 70% at concentrations up to 15.63 µg/ml. Thus, Kc22, Kp18, and Kp19 can be considered as the most balanced candidates for further preclinical development in terms of efficacy/cytotoxicity.

The results obtained indicate the prospects of compounds Kc22, Kc14, Kp18 and Kp19 as candidates for the development of new broad-spectrum antimicrobial agents. Their high activity against reference and clinical strains of Gram-positive

bacteria, mycobacteria, *Candida* fungi and amoebae indicates a significant potential for overcoming the existing challenges associated with the development of antibiotic resistance

Key words: aryl acyclic amino alcohols, antimicrobial activity, antifungal drugs, antibiotics, antibiotic resistance, multidrug resistance, pharmacokinetics, postantibiotic effect, decamethoxine, toxicity, staphylococci, enterococci, mycobacteria, candida, experiment.

Список публікацій здобувача за темою дисертації

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. **Настенко, В. Б.**, Короткий, Ю. В., Смертенко, О. А., Осипчук, Н.О., Широбоков, В. П., Чоботар, А. П. (2018). Вивчення протимікробної активності солей алкіл (г-арил) оксидиалкіл амонію щодо референтних штамів мікроорганізмів. *Мікробіологія і біотехнологія*, (1), 18–27.
[https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1\(41\).117806](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1(41).117806)
2. Osypchuk, N. O., **Nastenko, V. B.**, Shirobokov, V. P., & Korotkyi, Y. V. (2020). Sensitivity of antifungal preparations of *Candida* isolates from sub-biotopes of the human oral cavity. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11(1), 82–87.
<https://doi.org/10.15421/022011>
3. **Nastenko, V.** (2024). Antimicrobial properties of newly synthesised aryl acyclic amino alcohols against clinical strains of enterococci. *ScienceRise: Biological Science*, 4 (41), 11-18. DOI: 10.15587/2519-8025.2024.325076
<http://doi.org/10.15587/2519-8025.2024.325076>
4. **Nastenko, V.** (2025). Antimycobacterial activity of new aryloxyethoxy-dialkylaminopropanol derivatives against reference strains of nontuberculous mycobacteria. *ScienceRise: Biological Science*, 1 (42), 12–17.
<http://doi.org/10.15587/2519-8025.2025.326435>

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

5. Осипчук Н.О., **Настенко В.Б.**, Широбоков В.П., Короткий Ю.В. (2020). Чутливість до синтетичних аромациклічних аміноспиртів ізолятів *Candida*, що виділені від пацієнтів з цукровим діабетом 1-го типу. Довкілля та здоров'я, №1 (94), 39-47. <https://doi.org/10.32402/dovkil2020.01.039> (Категорія В – нефактове видання)

Список наукових праць, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

6. **Nastenko, V. B.**, Voloshchuk, O. M., Korotkiy, J. V., Smertenko, A. A., Chuyko, A. L., & Shyrobokov, V. P. (2015). Peculiarities of antimicrobial action of synthetic aromatic alcohols. In *X International Summer School-Conference "Molecular microbiology and biotechnology"* (p. 146). Odesa.

7. **Настенко В.Б.**, Короткий Ю.В., Смертенко О.А. (2017). Антимікробні властивості похідних арил ациклічних аміноспиртів щодо метицилін-резистентних стафілококів. У *Тези доповідей XV з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського* (11-15 вересня 2017 р., м. Одеса) (с. 214).

8. **Настенко В.Б.** (2017). Скринінг похідних арил ациклічних аміноспиртів з антимікробними властивостями. У *XV Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances»* (18–21 квітня 2017 р., м. Київ) (с. 71-72).

9. **Nastenko V.B.**, Osypchuk N.O. (2018). Features of detection of MRSA strains among clinical isolates. In *III International Scientific Conference: Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century* (April 18, 2018, Kyiv) (p. 75-76).

10. **Настенко В.Б.**, Короткий Ю.В., Смертенко О.А., Осипчук Н.О., Широбоков В.П. (2018). Антимікробні властивості похідних арил ациклічних аміноспиртів щодо референтних мікроорганізмів. У *Сучасні проблеми*

антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності: Матеріали конференції (29 січня 2018 р., м. Чернівці) (с. 129-130).

11. **Настенко В.Б.**, Вавринюк В.В. (2020). Дослідження спектру активності новосинтезованих похідних четвертинних солей арил ациклічних аміноспиртів щодо музейних штамів. У *XIV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної медицини»* (20 листопада 2020 р., м. Запоріжжя) (с. 143-144).

12. **Настенко В.Б.** (2021). Скринінг протигрибкової активності новосинтезованих похідних четвертинних солей арил ациклічних аміноспиртів щодо музейних штамів. У *XV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної медицини»* (29 листопада 2021 р., м. Запоріжжя) (с. 189-190).

13. **Настенко В.Б.** (2022). Дослідження антистафілокової активності новосинтезованих похідних четвертинних солей арил ациклічних аміноспиртів щодо клінічних штамів *Staphylococcus aureus*. У *XVI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної медицини»* (24-25 листопада 2022 р., м. Запоріжжя) (с. 145-146).

14. **Nastenko V.B.**, Osypchuk N.O., & Shyrobokov V.P. (2022). Sensitivity of *Candida* clinical isolates to antimycotic drugs. In *IV International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century”* (September 22, 2022, Kyiv) (p. 47).

15. **Настенко В.Б.**, Широбоков В.П., Ковальчук В.П., Короткий Ю.В. (2024). Протигрибкові властивості новосинтезованих похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо клінічних штамів *C. albicans*. У *Мечниковські читання – 2024: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю* (1 листопада 2024 р., м. Харків) (с. 82-83).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	13
ВСТУП.....	16
РОЗДІЛ 1 ІСТОРИЧНІ ПЕРЕДУМОВИ, МЕХАНІЗМИ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ НОВИХ ЧЕТВЕРТИННИХ АМОНІЄВИХ СПОЛУК У ПРОТИМІКРОБНІЙ ТЕРАПІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	25
1.1 Поширення антибіотикорезистентності серед представників мікробного світу, що мають найбільше значення в розвитку інфекційної патології людини.....	25
1.2 Механізми виникнення стійкості мікроорганізмів до хіміотерапевтичних препаратів та способи дослідження антибіотикорезистентності.	35
1.3 Шляхи вирішення проблеми лікарської стійкості до протимікробних засобів	39
1.4 Складності та перспективи пошуку нових протимікробних лікарських засобів.	40
1.5 Особливості протимікробної активності похідних аміноспиртів	42
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	47
2.1 Характеристика досліджуваних новосинтезованих четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію	47
2.2 Характеристика препаратів порівняння	51
2.3 Характеристика тест-мікроорганізмів для визначення протимікробних властивостей похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію ..	54
2.4 Дослідження антимікробної активності похідних арил ациклічних аміноспиртів	57
2.5 Визначення чутливості тест-мікроорганізмів до антибіотиків	58
2.6 Дослідження фармакодинамічних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію	59

2.7 Дослідження антипротозойного ефекту похідних арил ациклічних аміноспиртів	62
2.8 Визначення цитотоксичного профілю четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію з вираженою антимікробною активністю	63
2.9 Методика статистичної обробки результатів.....	65
РОЗДІЛ 3 АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ЧЕТВЕРТИННИХ СОЛЕЙ АРИЛОКСИЕТОКСИ ДІАЛКІЛ АМОНІЮ.....	67
3.1 Скринінг антибактеріальної активності сполук щодо референтних штамів мікроорганізмів.....	67
3.2 Визначення чутливості тест-мікроорганізмів до антибіотиків	75
3.3 Визначення фенотипових ознак резистентності стафілококів до метициліну.....	87
3.4 Визначення чутливості тест-мікроорганізмів до антисептичних препаратів порівняння	88
3.5 Вивчення ступеню антибактеріальних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо клінічних штамів.....	91
3.6 Порівняльна характеристика антистафілокової активності четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо представників <i>MSSA</i> та <i>MRSA</i>	104
3.7 Вивчення ступеню антибактеріальних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо мікобактерій	108
Висновки до розділу 3	113
РОЗДІЛ 4 ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ЧЕТВЕРТИННИХ СОЛЕЙ АРИЛОКСИЕТОКСИ ДІАЛКІЛ АМОНІЮ З ЕУКАРІОТИЧНИМИ МІКРООРГАНІЗМАМИ.....	117
4.1 Протигрибкові властивості досліджуваних похідних арил ациклічних аміноспиртів	117
4.1.1 Скринінг антифунгальних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію.....	117

4.1.2 Визначення чутливості музейних штамів дріжджеподібних грибів роду <i>Candida</i> до антибіотиків і антисептичних засобів.....	122
4.1.3. Визначення чутливості музейних штамів <i>Candida non-albicans</i> похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію	124
4.1.4 Визначення чутливості клінічних штамів дріжджеподібних грибів роду <i>Candida</i> до антибіотиків і антисептичних засобів.....	128
4.1.5 Вивчення ступеню протигрибкових властивостей четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо клінічних штамів дріжджеподібних грибів роду <i>Candida</i>	133
4.2 Скринінгове дослідження протиамебної активності четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію	144
Висновки до розділу 4.....	147
РОЗДІЛ 5 ФАРМАКОЛОГІЧНА ОЦІНКА ЧЕТВЕРТИННИХ СОЛЕЙ АРИЛОКСИЕТОКСИ ДІАЛКІЛ АМОНІЮ <i>IN VITRO</i>	151
5.1 Оцінка фармакодинамічних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію.....	151
5.1.1 Аналіз кінетики «time-kill» похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо чутливих референтних штамів в умовах <i>in vitro</i>	152
5.1.2 Аналіз залишкової антимікробної дії арилоксиетокси четвертинних амонієвих сполук щодо чутливих референтних штамів	168
5.2 Дослідження цитотоксичності четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію	185
Висновки до розділу 4.....	192
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	195
ВИСНОВКИ	211
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ	215
ДОДАТКИ	248

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

AmB – Amphotericin B (амфотерицин В)

ATCC – American Type Culture Collection (Американська колекція типових культур)

CAESAR – Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (Система нагляду за антимікробною резистентністю в регіоні СЄЄ)

CDC – Centers for Disease Control and Prevention (Центри з контролю та профілактики захворювань США)

CFU (КУО) – colony-forming units (колонієутворюючі одиниці)

CI – confidence interval (довірчий інтервал)

CIS – Collection of Institute of Phthisiology and Pulmonology (Колекція Інституту фтизіатрії та пульмонології)

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute (Інститут клінічних і лабораторних стандартів)

COVID-19 – Coronavirus Disease 2019 (коронавірусна хвороба 2019 року)

CRE – carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (карбапенем-резистентні ентеробактерії)

DMSO – диметилсульфоксид

DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Німецька колекція мікроорганізмів і клітинних культур)

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control (Європейський центр профілактики та контролю захворювань)

ESBL – extended-spectrum beta-lactamases (бета-лактамази розширеного спектра)

ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* spp. (група основних антибіотикорезистентних госпітальних патогенів)

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Європейський комітет з тестування антимікробної чутливості)

GLASS – Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (Глобальна система нагляду за антимікробною резистентністю і використанням)

IC₅₀ – concentration inhibiting 50% of cell viability (концентрація інгібування 50% життєздатності клітин)

M – середнє арифметичне

m – середня похибка

MDR-TB – multidrug-resistant tuberculosis (мультирезистентний туберкульоз)

MIC₅₀ – minimum inhibitory concentration for 50% of isolates (мінімальна інгібуюча концентрація для 50% ізолятів)

MIC₉₀ – minimum inhibitory concentration for 90% of isolates (мінімальна інгібуюча концентрація для 90% ізолятів)

MRSA – methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (метицилін-резистентний золотистий стафілокок)

MRSE – methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (метицилін-резистентний епідермальний стафілокок)

MSSA – methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (метицилін-чутливий золотистий стафілокок)

MSSE – methicillin-susceptible *Staphylococcus epidermidis* (метицилін-чутливий епідермальний стафілокок)

NCTC – National Collection of Type Cultures (Національна колекція типових культур)

OD – optical density (оптична щільність)

p – рівень статистичної значущості

PAE – post-antibiotic effect (постантибіотичний ефект)

PAFE – post-antifungal effect (постантифунгальний ефект)

pre-XDR-TB – pre-extensively drug-resistant tuberculosis (передрозширено-резистентний туберкульоз)

SAR – structure–activity relationship (структурно-активні залежності)

SD – стандартне відхилення

SME (*Serratia marcescens* enzyme)

VISA – vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (помірночутливий стафілокок до ванкоміцину)

- VRE – vancomycin-resistant *Enterococcus* (ванкоміцин-резистентні ентерококи)
- VRSA – vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (ванкоміцин-резистентний стафілокок)
- XDR-TB – extensively drug-resistant tuberculosis (розширено-резистентний туберкульоз)
- AMP – антимікробна резистентність
- ВІЛ – вірус імунодефіциту людини
- ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я
- ЗРБ – зона редукції бляшок
- МБІК – мінімальна бляшкоінгібуюча концентрація
- МБК – мінімальна бактерицидна концентрація
- МІК – мінімальна інгібуюча концентрація
- МТТ – метилгіазол тетразолій
- НТМ – нетуберкульозні мікобактеріози
- УКМ – українська колекція мікроорганізмів

ВСТУП

Актуальність теми. Відкриття антибіотиків стало одним із найбільших досягнень медицини XX століття, що суттєво знизило смертність від бактеріальних інфекцій. Однак уже через декілька років після початку клінічного застосування пеніциліну були виявлені перші випадки резистентності серед *Staphylococcus aureus* [1, 2]. Поява стійкості до пеніцилінів, наступне виникнення метицилін-резистентних стафілококів, нечутливості ентерококів до ванкоміцину, а також продукування β -лактамаз розширеного спектра серед ентеробактерій свідчать про глибину проблеми, яка нині має глобальний характер [3, 4].

Антибіотикорезистентність визнана однією з основних загроз для глобальної охорони здоров'я, що ускладнює лікування поширених бактеріальних інфекцій та знижує ефективність хірургічних і трансплантаційних втручань [5]. При цьому темпи відкриття нових антибактеріальних агентів є надто низькими: за останні 30 років у клінічну практику було впроваджено лише декілька нових класів антибіотиків, зокрема оксазолідинони та ліпопептиди [5, 6].

Основними бар'єрами у розробці нових протимікробних препаратів залишаються висока вартість науково-дослідних робіт, тривалість доклінічних та клінічних випробувань, а також економічна непривабливість інвестування у створення нових антибіотиків порівняно з препаратами, орієнтованими на тривале лікування хронічних захворювань [6, 7].

Одним із перспективних шляхів подолання проблеми є синтез нових сполук на основі відомих структурних платформ із модифікацією їх фізико-хімічних властивостей. Особливий інтерес становлять похідні арил ациклічних аміноспиртів, зокрема четвертинні солі арилоксиетокси діалкіл амонію. Завдяки поєднанню гідрофільних та гідрофобних фрагментів у молекулі, наявності катіонного центру, такі сполуки демонструють виражену антибактеріальну, протигрибкову, антипротозойну та противірусну активність [8–17].

Результати експериментальних досліджень свідчать, що амфіфільні ароматичні аміноспирти і четвертинні амонієві солі на їх основі ефективно

пригнічують ріст грампозитивних та грамнегативних збудників, пліснявих та дріжджеподібних грибів та мікобактерій [11, 18–20].

Таким чином, вивчення протимікробної активності новосинтезованих похідних арилоксиетокси діалкіл амонію є актуальним завданням, що має як теоретичне, так і практичне значення для пошуку нових антимікробних препаратів, здатних протидіяти викликам антибіотикорезистентності.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану науково-дослідних робіт кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) ім. М. І. Пирогова «Дослідження біологічних властивостей збудників інфекцій, пов'язаних з наданням медичної допомоги, та розробка засобів боротьби з ними» (0123U101070) та кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця «Дослідження протимікробної активності новосинтезованих похідних четвертинних солей арил ациклічних аміноспиртів» (№ 0120U101354).

Мета та завдання досліджень.

Мета – встановлення протимікробних властивостей новосинтезованих похідних арил ациклічних аміноспиртів – четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію в умовах експерименту.

Завдання дослідження:

Для досягнення поставленої мети в процесі виконання роботи поставлені наступні задачі:

1. Провести первинний скринінг антибактеріальної та антимікотичної активності досліджуваних речовин щодо референтних штамів мікроорганізмів.
2. Встановити спектр та ступінь протимікробної дії досліджуваних сполук, відібраних за результатами первинного скринінгу, з використанням музейних штамів та клінічних ізолятів визначених груп мікроорганізмів.

3. Дослідити фармакокінетичні особливості досліджуваних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію в умовах експерименту.

4. Визначити наявність протиамебної активності у досліджуваних сполук.

5. Провести *in vitro* визначення ступеню токсичності найбільш перспективних, у якості нових протимікробних засобів, четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію.

Об'єкт досліджень – новосинтезовані сполуки похідні арил ациклічних аміноспиртів – четвертинні солі арилоксиетокси діалкіл амонію

Предмет досліджень – дослідження в експериментальних умовах протимікробних властивостей новосинтезованих похідних арил ациклічних аміноспиртів – четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію, а також визначення їх фармакокінетики та токсичності.

Методи дослідження: мікробіологічні та паразитологічні (культивування референтних і клінічних штамів бактерій та грибів та акантамеб для скринінгу антимікробної активності четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію; визначення мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК) методом серійних розведень; дослідження кінетики знищення мікроорганізмів методом «*time-kill assay*»; оцінка постантимікробного ефекту (РАЕ, РАФЕ); визначення чутливості до стандартних антибіотиків і антисептичних засобів), біохімічні та фізико-хімічні (спектрофотометричний аналіз життєздатності клітин за тестом МТТ для оцінки цитотоксичності), статистичні (методи варіаційної статистики, однофакторний дисперсійний аналіз (ANOVA), критерій Тьюкі).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексне мікробіологічне дослідження 52 новосинтезованих похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію (Кс1-Кс31, Кр1-Кр21) щодо референтних та клінічних штамів бактерій, грибів та найпростіших. Дослідження охоплювало грамнегативні та грампозитивні бактерії (*S. aureus*, *Enterococcus*

faecalis, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureginosa*, *Escherichia coli*), нетуберкульозні мікобактерії (*Mycobacterium smegmatis*, *M. terrae*, *M. avium*, *M. B-5*), дріжджоподібні гриби (*Candida* spp.) та умовно-патогенні вільноживучі амеби (*Acanthamoeba* sp.).

У ході дослідження встановлено, що похідні на основі 2,4-дітретбутилфенокси- та 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси-груп характеризуються високою протимікробною активністю переважно щодо грампозитивних бактерій та мікобактерій. Одержано нові дані, які підтверджують високу активність сполук Кс22, Кс3, Кр18 і Кр19 щодо референтного штаму *S. aureus* ATCC 25923 та клінічних ізолятів MSSA і MRSA із середніми значеннями МІК у межах 1,17-1,56 мкг/мл для музейних штамів та медіанами МІК 1,95-3,9 мкг/мл для клінічних ізолятів.

Вперше встановлено антимікобактеріальну активність сполук Кс22 та Кс14 проти *M. smegmatis* ATCC 14468 із мінімальними інгібуючими концентраціями 4,0 мкг/мл, а також активність сполук Кр18 та Кр19 проти клінічних ізолятів *M. terrae* та *M. avium*, що демонстрували медіанні МІК у межах 4,0-6,0 мкг/мл.

Дослідження протигрибкової активності дозволило визначити 44 із 52 досліджених сполук, які проявили протикандидозну активність щодо *Candida albicans* ATCC 10231. Встановлено виражену активність сполук щодо референтних штамів non-*albicans* і розширено знання про антифунгальну активність щодо клінічних ізолятів *Candida* spp. (*C. krusei*, *C. glabrata*, *C. auris* – медіана значень МІК у межах 2-12 мкг/мл). Також визначено антимікотичну активність проти *Aspergillus niger*, де найактивнішими були сполуки Кр19, Кс14, Кр8, Кр16 та Кр21 зі значеннями МІК у межах 3,12-7,81 мкг/мл.

Уперше досліджено протипротозойну активність новосинтезованих четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо амеб у моделях *in vitro*. У ході скринінгового аналізу встановлено, що сполуки Кс10, Кс11, Кс15 та Кс19 формували зони інгібування діаметром понад 20 мм при вихідній концентрації 100 мкг/мл, що свідчить про високу ефективність проти акантамеб.

На основі проведених фармакодинамічних досліджень методом «*time-kill*» доведено чітку концентраційно- та часозалежну антимікробну дію досліджуваних сполук. За умов експозиції $2 \times \text{MIK}$ спостерігалось зниження життєздатності популяцій *S. aureus* ATCC 25923, *Ent. faecalis* ATCC 29212 та *C. albicans* ATCC 10231 на $\geq 3 \log_{10}$ CFU/мл протягом перших 4-6 годин інкубації, що свідчить про бактерицидний або фунгіцидний характер дії залежно від мікроорганізму.

Вперше встановлено наявність тривалого постантибіотичного ефекту (PAE) для найбільш активних сполук (Kc22, Kp18, Kp19): понад 4 години щодо референтного штаму *S. aureus*; 2,5-3 години щодо *Ent. faecalis* ATCC 29212; а також постантифунгального ефекту (PAFE) тривалістю до 3 годин щодо *C. albicans* ATCC 10231. Отримані результати мають важливе значення для майбутньої розробки режимів дозування препаратів на основі цих сполук з метою зменшення кратності введення та мінімізації ризику розвитку антибіотикорезистентності.

Проведена оцінка цитотоксичності на клітинній лінії HEp-2 за допомогою МТТ-аналізу дозволила визначити сприятливий профіль безпеки активних сполук: збереження життєздатності клітин на рівні 75–88% при концентраціях до 31,25 мкг/мл, що свідчить про перспективність їх подальшого доклінічного розвитку.

Отримані результати порівняльного аналізу свідчать, що новосинтезовані похідні арилоксиетокси діалкіл амонію за антимікробною активністю не поступаються, а в ряді випадків перевищують ефективність референтних антисептиків (декаметоксин, мірамістин) та антибіотиків (ампіцилін, ванкоміцин, тетрациклін) проти широкого спектру клінічно значущих патогенів.

Одержані дані вказують на високу перспективність сполук Kc22, Kc14, Kp18 і Kp19 для створення нових антимікробних агентів із розширеним спектром дії та потенціалом подолання проблеми антибіотикорезистентності.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати комплексного дослідження 52 новосинтезованих похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію (Kc1-Kc31, Kp1-Kp21) є вагомим науковим підґрунтям для створення нових протимікробних препаратів широкого спектра дії. Встановлено, що окремі сполуки виявили вибірккову або багатонаправлену антимікробну активність залежно від виду збудників.

Так, Kc22 проявила високу активність одночасно проти грампозитивних коків (*S. aureus*, *E. faecalis*), нетуберкульозних мікобактерій (*M. smegmatis*, *M. terrae*), дріжджоподібних грибів (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. auris*), а також показала добру дію проти *A. niger* і продемонструвала виражений інгібуючий ефект щодо *Acanthamoeba spp.*, формуючи зону затримки понад 20 мм. Сполука Kc14 демонструвала активність проти коків (*S. aureus*), дріжджових грибів (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*), пліснявих грибів (*A. niger*) та також виявила помірну дію проти *Acanthamoeba spp.*. Kp18 та Kp19 забезпечували інгібування *S. aureus*, *E. faecalis*, грибів роду *Candida*, *A. niger*, а також амеб, що свідчить про їхню мультиспрямовану та потенційно універсальну біоцидну дію.

Деякі сполуки мали вузьконаправлену активність: наприклад, Kc2 і Kc16 проявили ефективність переважно проти грибів роду *Candida*, тоді як Kp8 була активною як щодо грибів (*C. albicans*, *C. tropicalis*), так і щодо *S. aureus*, демонструючи також помірну інгібуючу дію проти акантамеб.

Наявність потужної антибактеріальної та антимікотичної активності у поєднанні з доведеними фармакодинамічними характеристиками, такими як бактерицидна дія при концентрації $2 \times \text{MIK}$ та тривалий постантибіотичний ефект (понад 4 години для *S. aureus*, 2,5-3 години для *E. faecalis*, до 3 годин для *C. albicans*), свідчить про можливість використання зазначених сполук для подальших досліджень в якості перспективних антимікробних засобів.

Оцінка цитотоксичності підтвердила добру біосумісність найактивніших речовин (Kc22, Kc14, Kp18, Kp19), оскільки життєздатність клітин HEp-2 становила понад 75-88% при концентраціях до 31,25 мкг/мл, що розширює перспективи їх безпечного клінічного застосування.

Одержані дані є науковим обґрунтуванням для подальшої розробки лікарських форм на основі активних сполук, зокрема антисептичних розчинів та потенційно нових систем пролонгованого вивільнення діючої речовини. Результати наукових досліджень впроваджені в освітній процес кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (акт впровадження № 15 від 07.03.2025 р.), кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова (акт впровадження №8 від 20.02.2025 р.), кафедри фармації Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика (акт впровадження № 06/2025 від 11.03.2025 р.) та кафедри мікробіології, вірусології та імунології Буковинського Державного медичного університету (протокол № 28/2025 від 18.04.2025).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійним науковим дослідженням автора. Автор особисто обрав напрям дослідження, самостійно провів патентно-інформаційний пошук, здійснив аналіз та систематизацію сучасних літературних джерел за темою роботи, визначив наукову новизну, сформулював тему, мету, завдання дослідження, а також розробив загальну концепцію виконання експериментальних робіт.

Дисертантом самостійно розроблено дизайн експериментальних досліджень, підібрано адекватні методи вивчення антимікробної активності новосинтезованих четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо референтних та клінічних штамів бактерій, грибів і найпростіших. Проведено оптимізацію умов скринінгових та кількісних методів визначення активності (дискодифузія, серійні розведення у рідкому та твердому середовищі), здійснено стандартизацію підходів до оцінки протигрибкової та протимікобактеріальної активності.

Особисто проведено весь обсяг експериментальних досліджень, включаючи визначення мінімальних інгібуючих концентрацій, вивчення фармакодинамічних характеристик сполук методом *time-kill* щодо *S. aureus*,

E. faecalis та *C. albicans*, оцінку постантибіотичного (РАЕ) та постантифунгального ефекту (РАФЕ) активних сполук. Самостійно здійснено дослідження цитотоксичної активності сполук методом МТТ на культурі клітин HEp-2 та проведено оцінку біосумісності досліджуваних речовин.

Дисертантом особисто виконано обробку первинних даних, статистичний аналіз результатів із застосуванням варіаційних методів та кореляційного аналізу, інтерпретацію отриманих даних, формулювання висновків кожного розділу та загальних висновків дисертації.

Автором самостійно здійснено узагальнення результатів фармакодинамічних і фармакокінетичних досліджень активних сполук, проаналізовано перспективи їх практичного застосування як потенційних антимікробних агентів широкого спектра дії, а також підготовлено розділи дисертаційної роботи, що стосуються обговорення наукової новизни, практичного значення та можливих напрямів подальшої доклінічної розробки.

У наукових працях, опублікованих за темою дисертації у співавторстві, здобувачу належить провідна роль у постановці задач, плануванні і виконанні експериментів, обробці і аналізі отриманих результатів, підготовці рукописів статей, формулюванні висновків і науково-практичних рекомендацій.

Висловлюю щирю подяку кандидату фармацевтичних наук, завідувачу відділу трансферу технологій, інноваційної діяльності та інтелектуальної власності Короткому Ю.В. та провідному інженеру відділу фізико-хімічних досліджень Інституту органічної хімії НАН України Смертенко О.А. за надання новосинтезованих похідних аміноспиртів, що стали об'єктом експериментальних досліджень у межах цієї роботи. Дякую моїм науковим керівникам, академіку НАН та НАМН України, завідувачу кафедри мікробіології та паразитології НМУ імені О.О. Богомольця В.П. Широбокову і завідувачу кафедри мікробіології ВНМУ імені М. І. Пирогова, професору В.П. Ковальчуку, за їх допомогу на всіх етапах дисертаційної роботи та координацію виконання дослідницької діяльності.

Апробація результатів дисертації. Основні наукові положення дисертації представлені та обговорені на X Міжнародній літній школі-конференції «Молекулярна мікробіологія та біотехнологія» (Одеса, 2015); XV З'їзді Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (Одеса, 2017); XV Міжнародній науково-практичній конференції студентів, аспірантів та молодих учених «Шевченківська весна» (Київ, 2017); III Міжнародній науковій конференції «Мікробіологія та імунологія – перспективи розвитку у XXI столітті» (Київ, 2018); Науково-практичній конференції «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» (Чернівці, 2018); XIV, XV, XVI Всеукраїнських науково-практичних конференціях «Актуальні питання клінічної медицини» (Запоріжжя, 2020-2022); IV Міжнародній науковій конференції «Мікробіологія та імунологія – перспективи розвитку у XXI столітті» (Київ, 2022); Науково-практичній конференції «Мечніковські читання» (Харків, 2024).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 15 наукових праць, серед яких: 1 стаття у фаховому науковому виданні України, що включене до міжнародної наукометричної бази Web of Science; 3 статті у фахових виданнях України категорії Б; 1 стаття у науковому виданні; 9 тез доповідей у матеріалах науково-практичних конференцій.

Обсяг та структура дисертації. Робота викладена українською мовою на 257 сторінках комп'ютерного тексту (основний текст на 190 сторінках), складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів досліджень, шести розділах власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаної літератури, що включає 276 найменувань (260 джерел латиницею та 16 кирилицею). Робота ілюстрована двома таблицями та 44 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ІСТОРИЧНІ ПЕРЕДУМОВИ, МЕХАНІЗМИ РЕЗИСТЕНТНОСТІ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ НОВИХ ЧЕТВЕРТИННИХ АМОНІЄВИХ СПОЛУК У ПРОТИМІКРОБНІЙ ТЕРАПІЇ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1 Поширення антибіотикорезистентності серед представників мікробного світу, що мають найбільше значення в розвитку інфекційної патології людини.

Інфекційні захворювання значну частину історії були екзистенціальною загрозою людству. Мільйони хворих на холеру, чуму, туберкульоз, тиф – це реалії кінця XIX століття, і абсолютно можлива перспектива антибіотичного апокаліпсису XXI сторіччя.

Активні мікробіологічні, біохімічні та фармацевтичні дослідження, що розпочалися наприкінці XIX – на початку XX століття, започаткували еру боротьби з бактеріальними інфекціями. Хоча ідеї про використання мікроорганізмів у терапії виникали ще наприкінці XIX століття, лише відкриття антимікробної дії пеніциліну Александром Флемінгом у 1928 році стало відправною точкою епохи антибіотикотерапії. Подальші дослідження в галузі хіміотерапії, зокрема концепція «чарівної кулі», сформульована П. Ерліхом, створили теоретичне підґрунтя для цілеспрямованого пошуку нових препаратів [21, 22]. Усе це дало початок «золотому століттю» антибіотиків, яке тривало до появи масштабної резистентності збудників до класичних препаратів.

Усі ці відкриття стали фундаментом для розвитку хіміотерапії та широкого впровадження антибіотиків у медичну практику. Проте у XXI столітті їх ефективність суттєво знижується через глобальне поширення антибіотикорезистентності серед клінічно значущих патогенів. Це ускладнює лікування навіть рутинних інфекцій, подовжує тривалість терапії, підвищує ризики ускладнень та летальність [23].

Пандемія COVID-19 ще більше загострила проблему антибіотикорезистентності. Попри вірусну природу збудника SARS-CoV-2, широке і часто необґрунтоване застосування антибіотиків у госпіталізованих пацієнтів з підозрою на бактеріальні коінфекції сприяло зростанню селекційного тиску на госпітальні мікроорганізми [24, 25]. У дослідженнях зазначено, що антибіотики отримували понад 70% пацієнтів з COVID-19, тоді як бактеріальні коінфекції підтверджувалися менш ніж у 10% випадків. Така диспропорція сприяла поширенню резистентних штамів, зокрема мультирезистентних *Acinetobacter baumannii* [26].

У відповідь Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) оновила перелік «пріоритетних патогенів», що включає 24 бактерії з 15 родин. Цей список поділено на три категорії за рівнем пріоритетності: критичний, високий та середній [27]. У цей перелік потрапили так звані ESKAPE-патогени (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Enterobacteriaceae spp.*), які проявляють стійкість до дії сучасних антибіотиків та несуть найбільшу загрозу у медичних закладах [28, 29]. Саме ці збудники є основною причиною нозокоміальних інфекцій, тяжких ускладнень у пацієнтів із ослабленим імунітетом та є першочерговими цілями для розробки нових антимікробних засобів [30]. Також до цієї категорії включено мультирезистентний *Mycobacterium tuberculosis*.

Клінічне застосування пеніциліну в 1941-1942 роках стало відправною точкою ери антибіотикотерапії. Спочатку він вважався універсальним засобом проти бактеріальних інфекцій, однак вже протягом першого десятиліття спостерігалось зростання резистентності, що підтвердило прогнози щодо обмеженої тривалості його ефективності [31].

Поява стійких до пеніциліну штамів *S. aureus* відбулася стрімко: з 94% чутливих ізолятів у 1943 році – до понад 50% резистентних уже в 1950-му [32]. Основним механізмом виявилась продукція β -лактамаз, ферментів, що інактивують антибіотик [33]. Сьогодні понад 90% клінічних штамів *S. aureus*

здатні до β -лактамазної активності, що унеможливлює ефективність пеніциліну в більшості випадків [34].

Дослідження механізмів дії β -лактамаз і розкриття їхньої ролі у руйнуванні β -лактамного кільця антибіотиків заклали основу для створення напівсинтетичних похідних. Першим представником цього класу став метицилін, розроблений у 1960 році для лікування пеніцилінрезистентного *S. aureus* [35]. Однак вже у 1961 році було вперше описано штами *S. aureus*, стійкі до метициліну (MRSA), що означало початок нової епохи антибіотикорезистентності [36].

З 1960-х років частота виявлення MRSA стрімко зростала: до 2004 року понад 60% ізолятів *S. aureus* у деяких країнах демонстрували резистентність до метициліну [37]. Спочатку MRSA асоціювали виключно з госпітальними інфекціями (HA-MRSA), проте у 1990-х роках з'явилися повідомлення про циркуляцію так званих «ком'юніті»-асоційованих штамів (CA-MRSA), які мають інші генетичні та фенотипові характеристики [38].

Поширення MRSA суттєво варіює між регіонами. Найнижчі рівні (<1%) зафіксовані в Північній Європі (Нідерланди, Скандинавія) завдяки ефективним стратегіям контролю [39, 40]. Значно вищі показники виявлено в Південній Європі, Азії та Африці – до 40-45% серед клінічних ізолятів у Китаї та до 22,5% серед колонізуючих штамів в Африці. Така географічна різниця обумовлює потребу в регіонально адаптованих протимікробних стратегіях і розробці нових засобів боротьби з MRSA [41].

Одним із основних препаратів для лікування MRSA-інфекцій залишається ванкоміцин – глікопептидний антибіотик, отриманий у 1950-х роках із метаболітів *Nocardia orientalis*. Його назва походить від англійського «*vanquish*» – «перемагати» [42]. У 1970-1980-х роках ванкоміцин був «золотим стандартом» у терапії резистентних стафілококів. Проте у 1997 році було описано перший клінічний ізолят MRSA зі зниженою чутливістю до ванкоміцину (Mu50, VISA – *vancomycin-intermediate S. aureus*), а у 2002 році – перший штам VRSA (*vancomycin-resistant S. aureus*) в США [43].

Передача резистентності до ванкоміцину у *S. aureus* частково зумовлена горизонтальним переносом генетичних елементів від ентерококів, які мають внутрішні механізми стійкості до пеніциліну, ампіциліну та інших β -лактамів [44]. Найбільше клінічне значення серед цього роду мають *Ent. faecalis* та *Ent. faecium*, які становлять основну частку інфекцій, пов'язаних із медичною допомогою [45].

Упродовж тривалого періоду ванкоміцин був основним препаратом для лікування тяжких ентерококових інфекцій, зокрема у пацієнтів з імуносупресією. Проте у 1986 році у Франції та Великобританії вперше було виділено штами ентерококів зі стійкістю до ванкоміцину (VRE – *vancomycin-resistant enterococci*), а в 1987 – у США (CDC, 2023). Вже до початку 1990-х у США зафіксовано стрімке зростання частоти VRE: від 0,3% у 1989 році до 7,9% у 1993 році в загальних ізолятах, і до 13,6% – в реанімаційних відділеннях [46].

Станом на 2020-ті роки *Ent. faecium* становить понад 80% випадків VRE у США, демонструючи вищу резистентність порівняно з *Ent. faecalis* [47]. За даними Європейського центру контролю захворювань, у 2013-2016 роках високі рівні VRE (25-50%) були зафіксовані у південно-східному регіоні ЄС (Греція, Кіпр, Ірландія, Румунія та ін.) [48].

У 1950–1960-х роках було відкрито нові класи антибіотиків – аміноглікозида, тетрацикліни, макроліди – які почали активно застосовуватись як альтернатива пеніциліну, зокрема у пацієнтів з алергічними реакціями. Проте вже у перші роки їх клінічного використання з'явилися множинно-резистентні бактеріальні штами, що обмежило терапевтичні можливості навіть цих новітніх засобів [49].

Розробка цефалоспоринів розпочалась після ізоляції гриба *Cephalosporium acremonium* (нині *Acremonium*) у 1945 році. Його культуральний фільтрат продемонстрував антимікробну активність, зокрема щодо грамнегативних бактерій. Першою виділеною активною сполукою був цефалоспорин Р, що діяв переважно на грампозитивні мікроорганізми. У 1949-

1954 роках було отримано більш стабільну і клінічно перспективну сполуку – цефалоспорин С [50, 51].

Наприкінці 1980-х років було створено цефалоспорины третього покоління (наприклад, цефіксим, цефтазидим, цефтриаксон), які характеризувалися розширеним спектром дії проти грамнегативних бактерій та стійкістю до β -лактамаз вузького спектра (TEM-1, TEM-2, SHV-1, OXA-1). Проте згодом з'явилися бактерії, що продукують β -лактамази розширеного спектра (ESBL), здатні гідролізувати навіть цефалоспорины останніх поколінь, що знову ускладнило терапію інфекцій [52].

Згідно з останнім звітом Європейського центру профілактики та контролю захворювань, у 2021 році резистентність *Klebsiella pneumoniae* до цефалоспоринів III покоління перевищувала 50% у 19 із 45 країн Європейського регіону, переважно в південних та східних регіонах. У той же час, *Escherichia coli* демонструвала резистентність на рівні $\geq 50\%$ у 4 країнах (9%) [53].

У клінічному дослідженні, проведеному в Ефіопії, 84% ізолятів *K. pneumoniae* були резистентними до цефтриаксону, а 100% – до цефотаксиму та цефазоліну [54]. Аналогічна ситуація спостерігалася в Пакистані, де серед ізолятів *E. coli* резистентність до цефтриаксону досягала 72%, а до цефіксиму – 55% [55]. У деяких регіонах Китаю та Індії ESBL-позитивні штами *K. pneumoniae* і *E. coli* виявляються у 50-70% випадків [56]. Подібні показники пояснюються широким поширенням ESBL та відсутністю належних заходів з інфекційного контролю. Основними молекулярними механізмами зниження чутливості до цефалоспоринів є посилена експресія β -лактамаз типу AmpC (AmpC-E), що розщеплюють цефалоспорины III покоління, а також продукція β -лактамаз розширеного спектра (ESBL), зокрема TEM, SHV і CTX-M [52, 57].

Поширеність β -лактамаз стала основною передумовою зниження ефективності β -лактамних антибіотиків. У відповідь на цю проблему, в 1976 році було відкрито оліванову кислоту (ММ 4550) – продукт життєдіяльності *Streptomyces olivaceus*, який виявив здатність пригнічувати активність β -лактамаз. Проте ця речовина була нестабільною і не проникала в бактеріальну

клітину [52]. Подальші пошуки інгібіторів призвели до відкриття клавуланової кислоти, яку синтезує *S. clavuligerus*, та тієнаміцину – природного антибіотика з широким спектром дії, отриманого з *S. cattleya*. На основі тієнаміцину було розроблено перший синтетичний карбапенем – іміпенем (МК 0787), який з 1985 року став використовуватись у клінічній практиці як один із найефективніших засобів для лікування тяжких інфекцій, спричинених грамнегативними бактеріями [50].

Однак уже в 1982 році в Лондоні були описані перші клінічні ізоляти *Serratia marcescens*, що продукували карбапенемазу SME (*Serratia marcescens* enzyme). У 1984 році в США був виявлений штам *Enterobacter cloacae*, резистентний до іміпенему, що продукував карбапенемазу ІМІ [58]. Ці випадки стали початком епідеміологічного розповсюдження ентеробактерій, що продукують карбапенемази (CRE – *carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*), головними представниками яких стали *Klebsiella pneumoniae* та *Escherichia coli*.

До 2013 року у США частота інфекцій, спричинених CRE, перевищувала 9000 випадків на рік, із часткою карбапенемаз-продуцентів серед *K. pneumoniae* на рівні 11%, а серед *E. coli* – 2% [59]. За останніми даними, у 2022 році зареєстровано понад 13 000 випадків CRE-інфекцій у США, що демонструє поступове зростання [60].

У Європі, за даними ECDC за 2023 рік, середній рівень резистентності *K. pneumoniae* до карбапенемів у країнах ЄС/ЄЕЗ сягнув 13,3% (у 2019 – 10,4%), а у Болгарії, Румунії та Греції перевищував 63%. Водночас *E. coli* зберігає відносно низький рівень стійкості до карбапенемів – у межах 0,3% [61]. Така стійкість обумовлена продукцією ферментів класу А (KPC), В (NDM, VIM, IMP) і D (OXA-48), які здатні гідролізувати всі відомі β-лактами, включно з карбапенемами.

Під час пандемії COVID-19 спостерігалось значне збільшення інфекцій, пов'язаних із медичним обслуговуванням, спричинених стійкими до антимікробних препаратів патогенами, включаючи CRE. Зокрема, у 2020 році кількість таких інфекцій зросла щонайменше на 15% порівняно з попередніми

роками. Це зростання пов'язане з підвищеним використанням антибіотиків, труднощами у дотриманні заходів інфекційного контролю та перевантаженням системи охорони здоров'я під час пандемії [60].

У Європі, за даними щорічного звіту ECDC, середня поширеність карбапенемрезистентних *K. pneumoniae* у кровотокових інфекціях становила 3,97 на 100 000 населення, що на 57,5% перевищує показники 2019 року. В окремих країнах, таких як Болгарія, Румунія та Греція, рівень перевищував 50% [62].

Ситуація з *Pseudomonas aeruginosa* також є загрозовою. У країнах Південно-Східної Азії резистентність до іміпенему досягає 38,4%, а в Китаї цей показник становить 56,9% [63]. В Європейському регіоні понад 50% ізолятів *P. aeruginosa* виявились стійкими до карбапенемів у 7 країнах ЄС

Серед *Acinetobacter spp.*, зокрема *A. baumannii*, поширення резистентності до карбапенемів досягло критичних рівнів. У країнах Південно-Східної Азії, таких як Таїланд, В'єтнам і Південна Корея, частка нечутливих до карбапенемів ізолятів перевищує 90% [64]. У країнах Європи стійкість *Acinetobacter spp.* перевищує 50% у 18 державах, особливо у Балканському регіоні та Греції [62]. У США ще у 2013 році мультирезистентними були 63% ізолятів цього збудника [30].

Серед мікроорганізмів, яким властива мультирезистентність до антибіотиків, особливе місце займає *Mycobacterium tuberculosis*. Цей збудник не був включений до переліку «пріоритетних патогенів» Всесвітньої організації охорони здоров'я, оскільки боротьба з туберкульозом є предметом окремої глобальної стратегії. За оцінками ВООЗ, близько чверті населення світу інфіковано латентною формою туберкульозу, і у 5-10% випадків інфекція може перерости в активну форму захворювання [65].

Відкриття стрептоміцину у 1943 році стало першим справжнім проривом у лікуванні туберкульозу. Його ізолював аспірант Альберт Шац у лабораторії Селмана Ваксмана в Університеті Ратгерса. Стрептоміцин став першим антибіотиком, ефективним проти *M. tuberculosis*, що відзначено Нобелівською

премією з фізіології або медицини, присудженою Ваксману у 1952 році. Однак вже наприкінці 1940-х років були зафіксовані перші випадки стійкості до цього антибіотика, що стало поштовхом для розробки комбінованих режимів терапії із залученням парааміносаліцилової кислоти та ізоніазиду. Ізоніазид був синтезований у 1951 році та впроваджений у клінічну практику у 1952 році. Його відкриття дозволило створити ефективніші схеми лікування туберкульозу [66].

Подальшим етапом стало відкриття рифампіцину – антибіотика на основі метаболіту *Nocardia mediterranei*, який був відкритий у 1965 році та схвалений для клінічного використання в США у 1971 році. Рифампіцин значно підвищив ефективність терапії туберкульозу завдяки своїй стерилізуючій активності та здатності скорочувати тривалість лікування [67].

Незважаючи на появу ефективних препаратів, епідемія ВІЛ-інфекції та неконтрольоване використання антибіотиків сприяли виникненню лікарсько-стійких форм туберкульозу. Згідно з оновленою класифікацією ВООЗ 2021 року, виділяють три основні типи лікарсько-стійкого туберкульозу: мультирезистентний туберкульоз (MDR-TB), передрозширено-резистентний туберкульоз (pre-XDR-TB) і розширено-резистентний туберкульоз (XDR-TB). MDR-TB визначається як стійкість до щонайменше ізоніазиду та рифампіцину. Pre-XDR-TB передбачає додаткову стійкість до будь-якого фторхінолону серед випадків MDR-TB. XDR-TB означає додаткову стійкість до будь-якого нового перорального препарату другої лінії – бедаквіліну або лінезоліду [65].

У 2022 році в країнах Європейського регіону було зареєстровано понад 170 000 нових випадків туберкульозу. Східна Європа залишається регіоном з найвищим навантаженням MDR-TB. Зокрема, в Україні частка мультирезистентних випадків серед нових пацієнтів перевищує 27%, а серед раніше лікованих – понад 40%. Це робить Україну однією з країн з найвищим рівнем MDR-TB у світі. Потік біженців з України в 2022 році вплинув на епідеміологію MDR-TB у сусідніх країнах. Наприклад, у Польщі кількість випадків MDR-TB серед українців зросла з 13% у 2010-2021 роках до 58% у 2022 - першому кварталі 2024 року [68].

У Північній Америці захворюваність на MDR-TB залишається низькою: у США у 2022 році частка становила 1,1%, а випадки XDR-TB є поодинокими [69]. Найбільш загрозлива ситуація в Азії: зафіксовано близько 35% всіх випадків MDR-TB у світі, причому найвищі показники реєструються в Індії, Китаї та КНДР [65].

У глобальному масштабі за оцінкою ВООЗ, частка мультирезистентного туберкульозу серед нових випадків у 2022 році становила 3,5%, а серед пацієнтів із повторним лікуванням – понад 18%. Частка XDR-TB серед випадків MDR-TB оцінюється приблизно в 6% [65].

Резистентність грибів до протигрибкових препаратів є однією з нових глобальних загроз у медицині. Особливе занепокоєння викликає зростання стійкості серед представників родів *Candida* та *Aspergillus*, які є провідними етіологічними агентами інвазивних мікозів у пацієнтів із імуносупресією та тяжкими супутніми захворюваннями [70, 71].

Полієнові антибіотики, продуцентами яких є бактерії роду *Streptomyces*, зокрема амфотерицин В (AmB), завдяки особливостям механізму дії демонструють високу ефективність проти дріжджеподібних і пліснявих грибів. Першим представником цієї групи був фунгіцидин (ністатин), відкритий у 1950 році [72]. Попри тривале клінічне застосування, резистентність до AmB залишається відносно рідкісним явищем: мінімальні інгібуючі концентрації (МІК) щодо резистентних штамів перевищують 2 мг/мл, що переважно фіксується серед окремих представників родів *Candida* та *Aspergillus* [72, 73]. Водночас головним обмеженням застосування полієнових антибіотиків залишається їхня виражена токсичність, зокрема нефротоксичність [72].

Альтернативою в лікуванні грибкових інфекцій залишаються азольні протигрибкові засоби, для яких у останні десятиліття спостерігається суттєве зростання рівня стійкості серед клінічних ізолятів грибів. Активне клінічне застосування азолів розпочалося з відкриття перших похідних у 1958 році, а широке використання зумовлено впровадженням флуконазолу в 1990-х роках [74]. Чутливість грибів роду *Candida* до азольних препаратів, зокрема

флуконазолу, значною мірою залежить від видової приналежності. Для *Candida albicans* рівень стійкості до флуконазолу залишається відносно низьким, становлячи менше 1% у більшості регіонів світу. Проте в окремих країнах, таких як Китай, зафіксовані вищі показники: серед ізолятів *C. albicans* частота стійкості може досягати 32% [73, 75].

Серед non-*albicans* видів *Candida* спостерігається вищий рівень резистентності. Для *C. tropicalis* у деяких регіонах Китаю рівень стійкості може сягати 55,8% [75]. *C. glabrata* демонструє змінну стійкість залежно від географічного регіону – від 10 до 23%. Водночас *C. krusei* має природжену нечутливість до флуконазолу, що обумовлює необхідність підбору альтернативної терапії [76].

Особливу загрозу становить поява *C. auris* – представника кандид, вперше ідентифікованого у 2009 році в Японії. Цей вид характеризується високим рівнем резистентності до кількох класів протигрибкових засобів, включаючи азоли, полієни та ехінокандини, а також здатністю викликати тяжкі інвазивні інфекції, що часто призводять до летальних наслідків [77, 78]. За даними CDC, понад 90% штамів *C. auris* у деяких регіонах проявляють резистентність щонайменше до одного класу протигрибкових препаратів, а близько 30% – до двох або більше [70].

До кінця 2021 року у США зафіксували 3 270 клінічних випадків *Candida auris* та 7 413 випадків, виявлених під час скринінгу. Динаміка захворюваності демонструвала стрімке зростання: якщо у 2019 році кількість клінічних випадків збільшилася на 44%, то у 2021 році цей показник досягнув 95%. Обсяги колонізаційного скринінгу також суттєво розширилися, зрісши більш ніж на 80%, тоді як кількість виявлених скринінгових випадків збільшилася понад удвічі. Протягом 2019-2021 років у 17 штатах вперше зареєстрували *C. auris*. Крім того, у 2021 році число випадків, спричинених штамми *C. auris*, стійкими до ехінокандинів, було приблизно втричі вищим порівняно з кожним із двох попередніх років [79].

Серед інших патогенних еукаріотичних мікроорганізмів важливу роль відіграють найпростіші. Упродовж 1950-1960-х років відзначено поширення стійкості *Plasmodium falciparum* до основних протималярійних засобів – хлорохіну та сульфадоксин-піриметаміну, що суттєво ускладнило лікування малярії [80]. У відповідь на зростання резистентності в Китаї було розпочато пошук нових препаратів на основі традиційної медицини, що завершився відкриттям артемізиніну у 1972 році [81]. Перші клінічні свідчення зниження чутливості *P. falciparum* до артемізиніну були зафіксовані у Таїланді та Індії в середині 1990-х років, а на початку 2000-х підтверджені в Камбоджі [82]. Згодом регіон Великого Меконгу був визнаний епіцентром резистентності до артемізиніну.

1.2 Механізми виникнення стійкості мікроорганізмів до хіміотерапевтичних препаратів та способи дослідження антибіотикорезистентності.

Молекулярні механізми антибіотикорезистентності поділяють на два основних типи: природжену (видову) стійкість та набуту. Сучасні дослідження свідчать, що резистентність до антимікробних речовин має давнє походження і сформувалася задовго до початку клінічного застосування антибіотиків [83, 84]. Це дає підстави розглядати антибіотикорезистентність як один із фундаментальних еволюційних механізмів виживання мікроорганізмів. Природна резистентність обумовлена структурними або функціональними особливостями клітинної стінки, метаболізму чи механізмів транспорту речовин [85].

Набута резистентність виникає у результаті генетичних змін у штамів, які спочатку були чутливими до антимікробних сполук. Основними механізмами набуття стійкості є спонтанні мутації та горизонтальний перенос генетичних детермінантів резистентності [85].

Спонтанні мутації виникають внаслідок помилок реплікації або дефектів систем відновлення пошкодженої ДНК. Такі мутації можуть змінювати

послідовність нуклеотидів, що, у свою чергу, призводить до змін у складі білків-мішеней антибіотиків [86]. Особливе значення має дисфункція системи виправлення невідповідностей, до якої належать гени *mutS*, *mutL*, *mutH*, *mutT*, *mutY*, *mutM* та *uvrD*. Порушення в цих генах збільшують частоту спонтанних мутацій та сприяють генетичній рекомбінації, що забезпечує більшу варіативність механізмів резистентності [87-89].

У низці випадків розвиток стійкості потребує кумулятивного ефекту множинних мутацій. Наприклад, стійкість *E. coli* до фторхінолонів формується внаслідок послідовного накопичення змін у гені *gyrA*, тоді як для набуття резистентності до рифампіцину часто достатньо однієї точкової мутації у гені *rpoB* [90, 91].

Горизонтальний перенос генів є одним із ключових процесів розповсюдження резистентності серед мікроорганізмів. Його основними механізмами є трансформація, трансдукція та кон'югація, які супроводжуються участю мобільних генетичних елементів, зокрема плазмід, транспозонів та інтегронів [92]. Встановлено також, що новим шляхом передачі генів резистентності може бути везикулярна передача [93, 94].

Попри відносну простоту процесу трансформації, лише обмежена кількість прокаріотичних організмів здатна самотійно поглинати молекули ДНК з навколишнього середовища. Архетипним прикладом такого механізму є набуття резистентності до пеніциліну у *Streptococcus pneumoniae* внаслідок рекомбінації з ДНК *Str. mitis* [95].

Трансдукція передбачає перенесення фрагментів бактеріальної ДНК за участі бактеріофагів і обмежується видовою чутливістю бактерії до відповідного фага. Встановлено, що бактеріофаги сприяють поширенню генів стійкості до метициліну серед стафілококів [96]. При деяких обставинах можлива одночасна передача декількох генів, включно з детермінантами ESBL [97].

Кон'югація полягає у перенесенні плазмідної або хромосомної ДНК через секс-пілі під час безпосереднього контакту між донорною та реципієнтною

клітиною. Цей механізм є ключовим для горизонтальної передачі антибіотикорезистентності, зокрема в умовах кишечника людини [92].

Одним із природних механізмів захисту бактерій є зниження проникності клітинної стінки. Грамнегативні бактерії здатні модифікувати експресію поринів, створюючи додатковий бар'єр для антимікробних агентів [98].

Іншим важливим механізмом є активація систем ефлюкс-насосів, що активно виводять антимікробні препарати з клітини. Відомими прикладами є системи AcrB у *E. coli*, MexB у *P. aeruginosa*, KexD у *K. pneumoniae* та LmrS у *S. aureus* [99]. Ефлюкс-насоси поділяють на п'ять основних сімейств: MFS, SMR, RND, ABC та MATE, які різняться джерелом енергії та специфічністю до субстратів [100].

Механізм дії антибіотиків ґрунтується на специфічній взаємодії з певними мішенями в клітині. Наприклад, рифампіцин інгібує бактеріальну РНК-полімеразу [101, 102], тоді як інгібітори синтезу білка впливають на рибосомальні субодиниці [103].

Разом із тим, тривала дія антибіотиків сприяла появі у мікроорганізмів механізмів захисту, що ускладнюють або унеможливають взаємодію препарату з його мішенню. Одним із провідних шляхів такої адаптації є модифікація мішеней антибіотиків. Метилювання 16S рРНК спричиняє стійкість до аміноглікозидів у мікобактерій [104], тоді як метилювання 23S рРНК захищає бактерії від макролідів [105].

Одним із найважливіших механізмів стійкості серед стафілококів є резистентність до бета-лактамних антибіотиків, зокрема до метициліну. Метицилін-резистентні стафілококи набули ген *mecA*, що кодує альтернативний пеніцилінзв'язуючий білок PBP2a з низькою спорідненістю до бета-лактамів [106]. Наявність PBP2a дозволяє стафілококам синтезувати клітинну стінку навіть у присутності високих концентрацій бета-лактамних антибіотиків, що робить терапію інфекцій, спричинених MRSA, суттєво складнішою [107].

З появою альтернативних препаратів, у мікроорганізмів виникають нові механізми стійкості. Зокрема, у ванкоміцин-резистентних стафілококів

основною адаптаційною зміною є потовщення клітинної стінки, що призводить до зниження проникності препарату та поглинання молекул ванкоміцину без досягнення критичної концентрації в місці дії. У таких випадках ванкоміцин зв'язується із надлишковими шарами незрілого пептидоглікану, не досягаючи активних ділянок клітинної стінки [108, 109]. Це явище відоме як феномен *vancomycin trapping* (з англ. – захоплення ванкоміцину). Натомість у ванкоміцин-резистентних ентерококів (VRE) реалізується інший механізм: зміна структури попередників пептидоглікану. Внаслідок заміни термінального дипептиду D-Ala-D-Ala на D-Ala-D-Lac або D-Ala-D-Ser знижується афінність ванкоміцину до мішені в 1000 разів, що суттєво зменшує антибактеріальну активність препарату. Ці модифікації контролюються наборами генів ванкоміцин-резистентності, серед яких найбільш поширеними є кластери *vanA* і *vanB* [110, 111].

Ферментативна інактивація антибіотиків є ще одним шляхом розвитку резистентності. Так, бета-лактамази гідролізують бета-лактамне кільце пеніцилінів [112]. Плазмідні гени TEM і SHV у *E. coli* еволюціонували до варіантів ESBL, таких як CTX-M [113]. Карбапенемази, які спочатку були хромосомними ферментами, тепер виявлені і на плазмідах у різних видів, зокрема IMP-1, OXA-23, KPC [114].

Особливу увагу привертає феномен персистенції, за якого незначна частка бактеріальної популяції зберігає життєздатність попри експозицію високих концентрацій антибіотиків [115].

Таким чином, антибіотикорезистентність є багатофакторним і динамічним явищем, що охоплює природні еволюційні механізми виживання мікроорганізмів та індуковані впливом зовнішніх факторів адаптаційні зміни. Вона формується внаслідок комбінації генетичних мутацій, горизонтального переносу генів резистентності, модифікацій мішеней дії антибіотиків, активації ефлюкс-систем та ферментативної інактивації антимікробних засобів [92, 99, 116, 117].

1.3 Шляхи вирішення проблеми лікарської стійкості до протимікробних засобів

Масштабному поширенню антибіотикорезистентності сприяє низка факторів, серед яких важливу роль відіграє необґрунтоване застосування антибактеріальних засобів без попереднього підтвердження необхідності та оцінки ефективності препарату *in vitro* [49]. Помилки при використанні антибіотиків охоплюють неправильний вибір препарату, порушення дозування, інтервалів введення, тривалості терапії, а також некоректне комбінування з іншими лікарськими засобами [118].

Соціально-економічні чинники мають істотний вплив на подолання проблеми антибіотикорезистентності. Інфекційні процеси, спричинені резистентними штамами, як правило, характеризуються тяжчим клінічним перебігом, потребують тривалого перебування в стаціонарі та застосування дорогих антимікробних препаратів. Це обумовлює економічний тиск на систему охорони здоров'я та збільшує ризик поширення мультирезистентних патогенів серед соціально незахищених верств населення [119, 120]. Ефективний епідеміологічний нагляд за стійкістю до антибіотиків є критично важливим для розуміння масштабів проблеми та визначення найбільш загрозливих патогенів. З цією метою ВООЗ розробила "Глобальний план дій щодо стримування стійкості до протимікробних препаратів", затверджений у 2015 році [121], який передбачає розвиток глобальних і національних систем моніторингу.

У 2016 році Генеральна Асамблея ООН ухвалила політичну декларацію, яка закликала до глобальної координації зусиль у боротьбі з антимікробною резистентністю у сферах охорони здоров'я людини, ветеринарії та сільського господарства. Це рішення стало лише четвертим випадком, коли питання охорони здоров'я розглядалося на такому високому рівні в ООН [122].

У 2024 році відбулася друга Високорівнева зустріч Генеральної Асамблеї ООН з питань антибіотикорезистентності, на якій було ухвалено нову політичну декларацію. У ній країни-члени зобов'язалися скоротити глобальну смертність, пов'язану з резистентністю до антибіотиків, на 10% до 2030 року, зменшити

використання антибіотиків у агропродовольчому секторі та забезпечити справедливий доступ до антимікробних препаратів [122].

В Україні боротьба з антимікробною резистентністю активно інтегрується у міжнародні ініціативи. З 2018 року Україна приєдналася до програми CAESAR (Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance), яка координується Європейським регіональним бюро ВООЗ. У межах цієї системи здійснюється стандартизований моніторинг чутливості основних бактеріальних патогенів до антимікробних препаратів, що забезпечує порівнянність даних на національному та міжнародному рівнях [123].

Крім того, у 2021 році Україна стала учасником Глобальної системи нагляду за антимікробною резистентністю (GLASS) – глобальної ініціативи Всесвітньої організації охорони здоров'я, спрямованої на зміцнення систем епіднагляду, стандартизацію методів збору даних і покращення глобальної оцінки рівня стійкості до антибіотиків [124].

Проблема антибіотикорезистентності залишається однією з ключових загроз глобальному здоров'ю, уповільнюючи досягнення у боротьбі з інфекційними захворюваннями. Посилення державної підтримки досліджень, мінімізація неправильного використання антибіотиків і розвиток нових терапевтичних стратегій є критично важливими для стримування цієї загрози [120, 122, 125]. Як зазначив лауреат Нобелівської премії Джошуа Ледерберг: «Майбутнє людства і мікробів, ймовірно, розгортатиметься як епізоди трилера, який можна було б назвати «Наш розум проти їхніх генів»» [126].

1.4 Складності та перспективи пошуку нових протимікробних лікарських засобів.

Втрату ефективності антибіотиків вважають загрозою, яка може призвести до економічних збитків, співставних із глобальною фінансовою кризою 2008 року. За оцінками експертів, падіння світового ВВП унаслідок антибіотикорезистентності може досягти 2–3,5% [127]. Для порівняння, під час пандемії COVID-19 глобальне падіння ВВП у 2020 році становило приблизно

3,1%. Однак, на відміну від економічної кризи 2008 року або пандемії COVID-19, наслідки антибіотикорезистентності матимуть більш тривалий, накопичувальний та глобальний ефект, що безпосередньо впливатиме на системи охорони здоров'я, економіку та добробут населення протягом десятиліть [128].

"Золотий період" антибіотиків розпочався з впровадження пеніциліну Олександром Флемінгом і тривав кілька десятиліть [49]. Однак з 1980-х років частота відкриття нових антимікробних агентів суттєво знизилася. Світові фармацевтичні компанії скоротили фінансування програм з пошуку нових антибіотиків майже на 50%, що призвело до драматичного зменшення кількості нових класів антимікробних засобів [129].

Протягом останнього десятиліття у розробці нових антибіотиків спостерігається обережний оптимізм. Станом на 2025 рік кілька дослідницьких груп повідомили про відкриття принципово нових класів антибактеріальних сполук із унікальними механізмами дії.

Одним із найбільш важливих досягнень стало схвалення препарату гепотідацину – першого представника нового класу тριαзааценафтиленових антибіотиків. Гепотідацин інгібує бактеріальну ДНК-гіразу та топоізомеразу IV за механізмом, відмінним від класичних фторхінолонів [130].

Іншим проривом стало відкриття нового класу ласо-пептидів – ларіюцидину. Ці сполуки діють шляхом інгібування бактеріального синтезу білка, зв'язуючись із рибосомами у нетрадиційних місцях, що надає їм активність проти мультирезистентних штамів [131].

Окрему увагу привертають оксепанопролінамідні антибіотики, зокрема ібоксаміцин. Ці сполуки були спеціально розроблені для подолання стійкості, спричиненої метилуванням рибосомальної РНК, що традиційно робить бактерії нечутливими до багатьох класичних антибіотиків [132].

Важливим доповненням до терапевтичного арсеналу може стати зосурабалпін – макроциклічний пептид, що специфічно інгібує транспортер

ліпополісахаридів у грамнегативних бактерій. Такий механізм дії відкриває нові можливості лікування інфекцій, викликаних *A. baumannii* [133].

Крім того, дослідники ідентифікували новий клас сполук, що таргетують фермент LpxH – ключовий ензим у біосинтезі ліпиду А в грамнегативних бактерій. Інгібітори LpxH демонструють високу ефективність *in vivo* проти мультирезистентних ізолятів [134].

Таким чином, відкриття нових класів антибіотиків залишається складним, повільним і дороговартісним процесом. Відповідно інформації з платформи MedChemExpress, що спеціалізується на продажу хімічних сполук для наукових досліджень вартість 10 мг гепотідацину становить близько 756 доларів США, тоді як 10 мг ібоксаміцину – приблизно 1 040 доларів США [135]. Такі високі витрати обмежують доступність нових препаратів для широкого клінічного використання, що змушує шукати альтернативні шляхи удосконалення антимікробної терапії.

Одним із таких шляхів є модифікація існуючих антибіотиків або розробка похідних сполук, здатних долати відомі механізми резистентності. Наприклад, ібоксаміцин – синтетичний похідний лінкозаміду – був спеціально створений для нейтралізації стійкості, спричиненої метилуванням рибосомальної РНК, що традиційно ускладнює дію класичних антибактеріальних агентів [132].

Модифікація існуючих антибіотиків може підвищувати проникність молекул через клітинні бар'єри навіть у мікроорганізмів із підвищеною стійкістю, однак вона може також змінювати фармакокінетичні властивості і спектр дії препарату, тоді як основний механізм антимікробної активності залишається незмінним.

1.5 Особливості протимікробної активності похідних аміноспиртів

Перспективними для створення нових лікарських засобів антимікробної дії є похідні аміноспиртів. Завдяки своїм фізико-хімічним і хімічним властивостям аміноспирти становлять значний інтерес як потенційні біологічно активні сполуки, що підтверджується даними про їхні фармакологічні

властивості. Представники цієї групи демонструють широкий спектр антимікробної активності. За літературними даними, аміноспирти виявляють протівірусну, антибактеріальну, протигрибкову та антипротозойну активність [18, 19, 136–138].

Група дослідників під керівництвом Bhaskar R. Manda (Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Бразилія) вивчала протимікробні властивості нових похідних аміноспиртів на основі карданолу та гліцерину. Встановлено активність досліджуваних сполук проти представників грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів. Дослідження показало, що частина речовин виявляла виражений інгібуючий ефект щодо збудників стафілококової інфекції, включаючи MRSA). МІК таких сполук коливалася в межах від 3,90 до 15,60 мкг/мл. Крім того, деякі аміноспирти демонстрували активність проти збудника туберкульозу – *M. tuberculosis*. МІК найбільш активної сполуки становила 3,18 мкг/мл, а МІК₉₀ (мінімальна інгібуюча концентрація, що пригнічує 90% ізолятів) – 7,36 мкг/мл [19].

Найбільш активні щодо грампозитивних мікроорганізмів сполуки мали у своїй структурі гетероциклічні аліфатичні аміни, піридинові фрагменти або аліфатичні ланцюги. На думку авторів, саме така структурна організація відповідала за підвищену антибактеріальну активність досліджених аміноспиртів [19].

Подібні результати отримала й група Angelina M. de Almeida та співавторів (2013), які досліджували антимікробну активність амфіфільних ароматичних аміноспиртів *in vitro*. Прогнозовано сполуки виявили вищу активність щодо грампозитивних бактерій порівняно з грамнегативними. МІК для *S. aureus* ATCC 29213 та *S. epidermidis* ATCC 12228 варіювали від 2 до 1024 мкг/мл, тоді як для *E. coli* ATCC 11229 і *P. aeruginosa* ATCC 27853 – від 16 до 1024 мкг/мл [136].

Одночасно доведена ефективність щодо кандид (*C. albicans* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. glabrata* ATCC 18804, *C. parapsilosis* ATCC 90030). Для порівняння фунгіцидної активності було взяти інтраконазол, даний

лікарський засіб фактично не проявив інгібуючої активності. В свою чергу, інгібуюча концентрація найбільш активних речовин становила 2-64 мкг/мл [136, 137]

У дослідженні Grenier M. та співавторів (2012) було синтезовано нові бі-четвертинні амонієві солі на основі біс(піридинілметил)аміну з різною довжиною алкільних ланцюгів. Встановлено, що сполука з ланцюгом C14 виявила найкращу антимікробну активність: мінімальна інгібуюча концентрація проти *S. aureus* становила 1 мкг/мл, проти *E. coli* – 8 мкг/мл, а проти *P. aeruginosa* – 16 мкг/мл. Зазначено, що подвоєння катіонних центрів сприяє збільшенню активності за рахунок посиленої взаємодії з мембраною [16].

У дослідженнях Yang Jiao та ін. найвищу антимікробну активність виявляли кватерні амонієві солі та полімери, що містили довгі алкільні ланцюги або ароматичні групи. Механізм дії цих сполук реалізується через електростатичну взаємодію позитивно зарядженого кватерні амонієвого центру з негативно зарядженими фосфоліпідними компонентами бактеріальної мембрани, що призводить до деполаризації, втрати цитоплазматичного вмісту та загибелі клітин. Мінімальні інгібуючі концентрації активних кватерні амонієвих агентів варіювалися в межах 2-8 мкг/мл для грампозитивних бактерій (включно з MRSA) і 8-64 мкг/мл для грамнегативних штамів (*E. coli*, *P. aeruginosa*). У випадку грибів роду *Candida* ефективні концентрації становили 4–32 мкг/мл [13].

Похідні піперезин пропанолу, антимікробні властивості яких досліджували японські вчені Osamu Kondoh та ін., володіли вираженими антифунгальними властивостями щодо представників дріжджеподібних та пліснявих грибів. Сполука з кодовою назвою GSI578 у концентрації 0,17 мкг/мл інгібувала ріст музейного штаму *C. glabrata*, це у 2 рази ефективніше ніж амфотерицин В, який застосовано як референтний препарат. Щодо представників *C. albicans* GSI578 проявила меншу активність, інгібуюча концентрація становила 0,22 мкг/мл, а щодо клінічних визначалась в діапазоні 0,71-1,3 мкг/мл. Пригнічуючий ефект щодо представників *A. fumigatus* різко відрізнявся по значенню в залежності від штаму. Так, щодо штаму CF1083

сполука проявляла інгібуючу дію при концентрації 0,15 мкг/мл, для порівняння МІК препарату порівняння – 0,22 мкг/мл. Відносно інших штамів актиноміцет МІК зростала до 1,1 мкг/мл [139].

Дослідження Osamu Kondoh et. al. складалось з двох частин, перша пов'язана з антифунгальною активністю похідних піперезин пропанолу, друга – з визначенням механізму дії активної речовини. Вченим вдалось встановити, що сполука GSI578 володіла властивостями інгібітора 3- β -d-глюкан синтази, що каталізує синтез 1,3- β -d -глюкану – основного компоненту клітинної стінки грибів. Варто зазначити, що механізм пригнічуючого ефекту відрізняється від інгібіторів ліпопептидів, таких як аеротрицину та каспофунгіну [139].

Визначення спектра антибактеріальної активності близькоспоріднених похідних арилаліфатичних аміноспиртів Дроновою Л.М. демонструє спектр та механізм активності щодо мікроорганізмів. Так, сполука KBM-204 володіла інгібуючим впливом щодо різних представників грампозитивних та грамнегативних мікроорганізмів. Антимікробний ефект був краще проявлений щодо грампозитивних мікроорганізмів, МІК аміноспиртів щодо кокової форми визначалась на рівні ванкоміцину та цефтриаксону, які застосовувались як препарати порівняння. МІК щодо *S. aureus* ATCC 25923 становив 2,5 мкг/мл, *S. epidermidis* ATCC 14990 – 5,0 мкг/мл [20]

Антибактеріальні властивості KBM-204 проти грамнегативних бактерій були менш вираженими. Інгібуючий ефект на *E.coli* ATCC 8739 спостерігався при концентрації 15 мкг/мл, що значно перевищило результати препаратів порівняння (амікацин - ≤ 4 мкг/мл, хлорамфенікол - ≤ 8 мкг/мл). В свою чергу, відносно *S. paratyphi* А пригнічуюча дія 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(N-бензил-4-метилпіперидиній)-2-пропанолу хлориду спостерігалась при концентрації 5 мкг/мл, яка наближена до МІК амікацину, щодо даного мікроорганізму - 4 мкг/мл. За рівнем активності проти псевдомонад сполука практично не поступалась препарату порівняння азтреонаму (МІК $\leq 8,0$ мкг/мл), МІК досліджуваної речовини була проявлена в діапазоні 3,12 - $> 25,0$ мкг/мл [11].

Дослідження спектру активності адамантилвмісних похідних амінопропанолу-2 демонструють, що дана група сполук володіє інгібуючим ефектом стосовно представників прокаріот, дріжджеподібних грибів, а також вірусів. Їх антимікробна дія проти грампозитивних бактерій (*Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Corynebacterium glutamicum*) не поступається ефективності ванкоміцину, лінезоліду та тетрацикліну (МІК $\leq 4,0$ мкг/мл). Відносно грамнегативних мікроорганізмів бактеріоцидна дія похідних аміноспиртів (МІК 0,9–6,25 мкг/мл) була більш вираженою ніж у ампіциліна (МІК $\leq 8,0$ мкг/мл) та хлорамфенікола (МІК $\leq 8,0$ мкг/мл) та не поступається активності гентаміцину (МІК $\leq 2,0$ мкг/мл) та цефтазидиму (МІК $\leq 4,0$ мкг/мл) [8, 140].

Відповідно до опрацьованої літератури, антимікробний ефект похідних арилаліфатичних аміноспиртів розповсюджується на мікроорганізми без клітинної стінки. Дослідження інгібуючих властивостей похідних алкоксіамінопропанолу на бактерії класу *Mollicutes* продемонструвало, що дані сполуки пригнічували життєдіяльність *Acholeplasma modicum* ATCC 29102 у діапазоні концентрацій 3,12-25 мкг/мл. МІК сполук щодо *Mycoplasma pneumoniae* ATCC 15531 становила 4,68-6,25 мкг/мл, що за своєю ефективністю є наближено до гентаміцину, лінкоміцину та стрептоміцину, які слугували препаратами порівняння [9, 141].

Дослідниками на чолі із Дудіковою. Д.М. встановлено, що найбільш ефективні сполуки КВМ-97 та ЮК-23 зумовлюють порушення цілісності та функціонування цитоплазматичної мембрани та хімічного складу клітиної стінки бактерій. Антифунгальний ефект пояснюється значним порушенням структури клітинної мембрани та функціонуванням мітохондрій [8].

Опрацьовані матеріали демонструють глибину проблеми антибіотикорезистентності та перспективи дослідження похідних аміноспиртів в якості можливих протимікробних агентів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

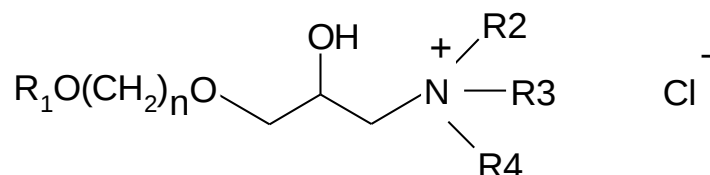
Робота присвячена мікробіологічному обґрунтуванню використання похідних арил ациклічних аміноспиртів та четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію як перспективних протимікробних засобів. З метою розкриття дисертаційного дослідження була розроблена програма поетапного виконання експериментальних робіт, яка включала чотири взаємопов'язаних етапів: дослідження антибактеріальної активності четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію відносно референтних і клінічних штамів грампозитивних та грамнегативних бактерій; вивчення протигрибкової активності арил ациклічних аміноспиртів щодо представників дріжджеподібних та пліснявих грибів; встановлення активності досліджуваних речовин щодо найпростіших; визначення ступеня цитотоксичності синтезованих сполук.

Дослідження виконувались на базі кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця та кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова. Робота проведена в умовах бактеріологічної лабораторії кафедри мікробіології ВНМУ ім. М.І. Пирогова та кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця.

Усі дослідження проведено відповідно до принципів біоетики, що схвалено комітетом з етичної експертизи ВНМУ ім. М.І. Пирогова (протокол № 11 від 03.12.2020 р.; протокол № 3 від 17.03.2025 р.).

2.1 Характеристика досліджуваних новосинтезованих четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію

У роботі досліджувались антимікробні властивості 52 новосинтезованих похідних четвертинних солей арил ациклічних аміноспиртів (табл. 2.1) – похідних алкіл (арилоксиетокси) діалкіламінопропанолу загальної формули:



Досліджувані сполуки були синтезовані в Інституті органічної хімії НАН України канд. хім. наук Коротким Ю.В та передані для досліджень НМУ імені О.О. Богомольця в рамках договору про співробітництво.

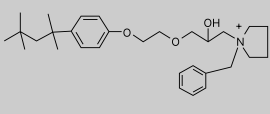
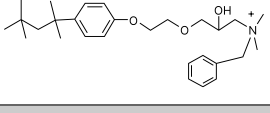
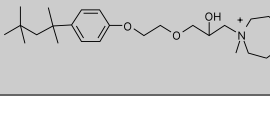
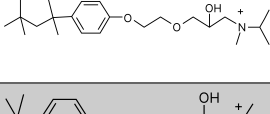
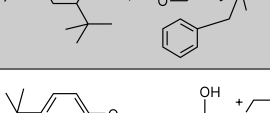
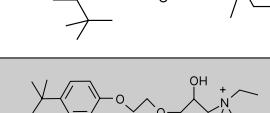
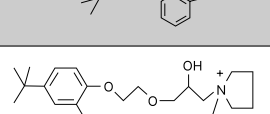
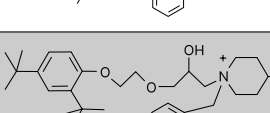
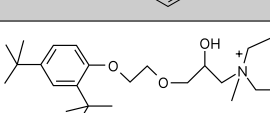
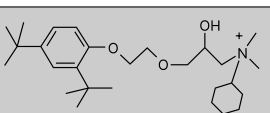
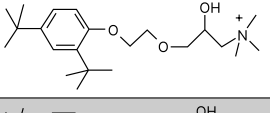
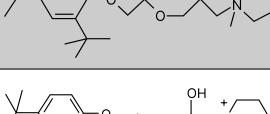
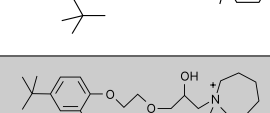
Для отримання сполук використано спрямований синтез. 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси-1-етокси] -2,3-епоксипропан, який одержано в умовах міжфазного каталізу (50.0% NaOH, тетрабутиламоній хлорид, епіхлоргідрин) за методикою, який далі в спиртовому розчині взаємодіє з вторинними амінами, даючи відповідні 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси-1-етокси] -3-діалкіламіно)-2- пропанол: останні обробляють при нагріванні в ацетоні (ізопропанол, ацетонітрил) галоїдними алкілами, даючи кінцеві сполуки [142, 143].

Таблиця 2.1

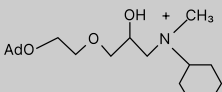
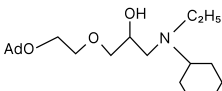
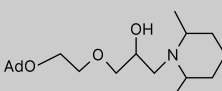
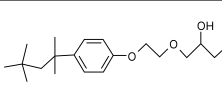
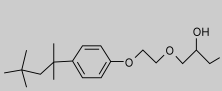
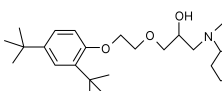
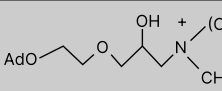
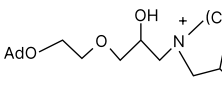
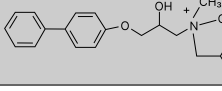
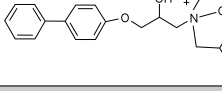
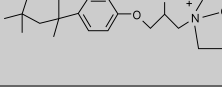
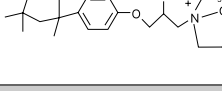
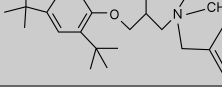
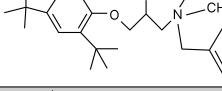
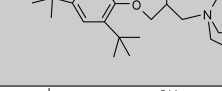
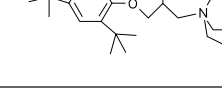
Структура досліджуваних похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію

Код	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	n	Структурна назва	Зображення
Кс1	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси	етил	етил	бензил	2	1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-бензил діетиламіно)-2-пропанол хлорид	
Кс2	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси	-	4-метилпіперидиний	бензил	2	1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-бензил 4-метилпіперидиний)-2-пропанол хлорид	
Кс3	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси	метил	циклогексил	бензил	2	1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-бензил N-метил циклогексаламіно)-2-пропанол хлорид	
Кс4	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси	-	гексаметилен	бензил	2	1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-бензил гексаметилениміній)-2-пропанол хлорид	
Кс5	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси	метил	діметиламін	-	2	1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-метил диметиламіно)-2-пропанол йодид	
Кс6	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил) фенокси	метил	піролідиний	-	2	1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-метил піролідиний)-2-пропанол йодид	

продовження табл. 2.1

Код	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	n	Структурна назва	Зображення
Kc8	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси	-	піролідиній	бензил	2	1-[4-1(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-бензил піролідиній)-2-пропанол хлорид	
Kc9	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси	діметил	-	бензил	2	1-[4-1(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-бензил діметиламіно)-2-пропанол хлорид	
Kc10	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси	метил	гексаметиле німіній	-	2	1-[4-1(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-метил гексаметилениміній)-2-пропанол йодид	
Kc11	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси	-	ізопропила міно	-	2	1-[4-1(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-ізопропіламіно-2-пропанол гідрохлорид	
Kc12	2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси	діметил	-	бензил	2	1-(2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси)-3-(N-бензил діметиламіно)-2-пропанол хлорид	
Kc13	2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси	метил	морфолін	-	2	1-(2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси)-3-(N-метил морфоліній)-2-пропанол йодид	
Kc14	2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси	діметил	-	бензил	2	1-(2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси)-3-(N-бензил діметиламіно)-2-пропанол хлорид	
Kc15	2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси	-	піролідиній	бензил	2	1-(2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси)-3-(N-бензил піролідиній)-2-пропанол хлорид	
Kc16	2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси	-	4-метилпіпер идиній	бензил	2	1-(2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси)-3-(N-бензил 4-метилпіперидиній)-2-пропанол хлорид	
Kc17	2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси	-	гексаметиле німіній	бензил	2	1-(2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси)-3-(N-бензил гексаметилениміній)-2-пропанол йодид	
Kc18	2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси	діметил	циклогекс ил	-	2	1-(2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси)-3-(N-діметил циклогексиламіно)-2-пропанол йодид	
Kc19	2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси	метил	діметиламін о	-	2	1-(2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси)-3-(N-метил діметиламіно)-2-пропанол йодид	
Kc20	2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси	метил	піролідиній	-	2	1-(2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси)-3-(N-метил піролідиній)-2-пропанол йодид	
Kc21	2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси	метил	4-метилпіпер идиній	-	2	1-(2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси)-3-(N-метил 4-метил піперидиній)-2-пропанол йодид	
Kc22	2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси	-	гексаметиле німіній	бензил	2	1-(2,4-дітретбутилфенок си-1-етокси)-3-(N-бензил гексаметилениміній)-2-пропанол хлорид	

продовження табл. 2.1

Код	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	n	Структурна назва	Зображення
Кс24	1-адамантоксиетокси	метил	циклогексил	-	2	1-(1-адамантоксиетокси)-3-(N-метил циклогексиламіно)-2-пропанол гідрохлорид	
Кс25	1-адамантоксиетокси	етил	циклогексил	-	2	1-(1-адамантоксиетокси)-3-N-етил циклогексиламіно-2-пропанол гідрохлорид	
Кс26	1-адамантоксиетокси	-	2,6-діметилпіперидин	-	2	1-(1-адамантоксиетокси)-3-2,6-діметилпіперидино-2-пропанол гідрохлорид	
Кс27	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси	метил	циклогексил	-	2	1-[4-1(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-метил циклогексиламіно)-2-пропанол гідрохлорид	
Кс28	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси	-	2,6-діметилпіперидин	-	2	1-[4-1(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(2,6-діметил піперидино)-2-пропанол гідрохлорид	
Кс29	2,4-дітретбутилфенокси-1-етокси	метил	циклогексил	-	2	1-92,4-дітретбутилфенокси-1-етокси)-3-N-метил циклогексиламіно-2-пропанол гідрохлорид	
Кс30	1-адамантоксиетокси	-	-	триметиламоній	2	1-(1-адамантоксиетокси)-3-(N-триметиламоній)-2-пропанол йодид	
Кс31	1-адамантоксиетокси	діметил	-	бензил	2	1-(1-адамантоксиетокси)-3-(N-бензил діметиламоній)-2-пропанол хлорид	
Кр1	4-фенилфенокси	діметил	-	4-CH ₃ -бензил	2	1-(4-фенил)фенокси-3-(N-(4-CH ₃ -бензил)-діметиламоній)-2-пропанол хлорид	
Кр2	4-фенилфенокси	діметил	-	4-F-бензил	2	1-(4-фенил)фенокси-3-(N-(4-F-бензил)-діметиламоній)-2-пропанол хлорид	
Кр3	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси	діметил	-	4-CH ₃ -бензил	2	1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(N-(4-CH ₃ бензил)-діметиламоній)-2-пропанол хлорид	
Кр4	4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси	діметил	-	4-F-бензил	2	1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-3-(N-(4-F-бензил)-діметиламоній)-2-пропанол хлорид	
Кр5	2,4-дітретбутилфенокси	діметил	-	4-CH ₃ -бензил	2	1-(2,4-дітретбутил фенокси)-3-N-(4-CH ₃ -бензил)-діметиламоній)-2-пропанол хлорид	
Кр6	2,4-дітретбутилфенокси	діметил	-	4-F-бензил	2	1-(2,4-дітретбутил фенокси)-3-N-(4-F-бензил)-діметиламоній)-2-пропанол хлорид	
Кр7	2,4-дітретбутилфенокси	-	піролідиній	4-F-бензил	2	1-(2,4-дітретбутил фенокси)-3-N-(4-F-бензил-піролідиній)-2-пропанол хлорид	
Кр8	2,4-дітретбутилфенокси	-	піролідиній	4-CH ₃ -бензил	2	1-(2,4-дітретбутил фенокси)-3-N-(4-CH ₃ -бензил-піролідиній)-2-пропанол хлорид	

продовження табл. 2.1

Код	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	n	Структурна назва	Зображення
Кр10	4-(1-адамантил)фенокс и	діметил	-	CH ₃ - бензил	2	1-[4-(1-адамантил)фенокси]- 3-(N-(CH ₃ -бензил)- диметиламоній)-2-пропанол хлорид	
Кр11	4-метокси-2- третбутилфенокс и	-	гексаметиле німіній	бензил	2	1-(4-метокси-2- третбутилфенокси)-3-(N- бензил гексаметиленіміній)- 2-пропанол хлорид	
Кр12	4-метокси-2- третбутилфенокс и	-	4- метилпіпер идиній	бензил	2	1-(4-метокси-2- третбутилфенокси)-3-(N- бензил 4-метилпіперидиній)- 2-пропанол хлорид	
Кр13	4-метокси-2- третбутилфенокс и	-	гексаметиле німіній	бензил	2	1-(4-метокси-2- третбутилфенокси)-3-(N- бензил гексаметиленіміній)- 2-пропанол хлорид	
Кр14	2-метил-3-бутил	-	піролідиній	бензил	2	1-(2-метил-3-бутил)-3-(N- бензил піролідиній)-2- пропанол хлорид	
Кр15	2,4- дітретбутилфенок си	-	гексаметиле німіній	4- метилб ензил	2	1-(2,4-дітретбутилфенокс и)-3-(N-(4-метил бензил)- гексаметиленіміній)-2- пропанол хлорид	
Кр16	2,4- дітретбутилфенок си-1-етокси	діметил	-	4- метилб ензил	2	1-(2,4-дітретбутилфенокс и-1-етокси)-3-(N-(4-метил бензил)-діметиламіно)-2- пропанол хлорид	
Кр17	2,4- дітретбутилфенок си-1-етокси	діметил	-	4-F- бензил	2	1-(2,4-дітретбутилфенокс и-1-етокси)-3-(N-(4-F-бензил)- діметиламіно)-2-пропанол хлорид	
Кр18	4-(1,1,3,3- тетраметилбутил) фенокс-1-етокси	діметил	-	4-F- бензил	2	1-[4-(1,1,3,3- тетраметилбутил) фенокс-1- етокси]-3-(N-(4-F бензил) діметиламіно)-2-пропанол хлорид	
Кр19	4-(1,1,3,3- тетраметилбутил) фенокс-1-етокси	діметил	-	4- метилб ензил	2	1-[4-(1,1,3,3- тетраметилбутил) фенокс-1- етокси]-3-(N-(4-метил бензил) діметиламіно)-2- пропанол хлорид	
Кр20	4-(1,1,3,3- тетраметилбутил) фенокс-1-етокси	-	гексаметиле німіній	4- метилб ензил	2	1-[4-(1,1,3,3- тетраметилбутил) фенокс-1- етокси]-3-(N-(4-метил бензил гексаметиленіміній)-2- пропанол хлорид	
Кр21	4-(1,1,3,3- тетраметилбутил) фенокс-1-етокси	-	гексаметиле німіній	4-F- бензил	2	1-[4-(1,1,3,3- тетраметилбутил) фенокс-1- етокси]-3-(N-(4-F бензил гексаметиленіміній)-2- пропанол хлорид	

2.2 Характеристика препаратів порівняння

При визначенні антимікробних властивостей досліджуваних сполук в експериментальних умовах щодо тест-мікроорганізмів застосовувались різні групи препаратів порівняння.

Препарати з вираженою протибактеріальною дією:

Бензилпеніцилін (Benzylpenicillin)[®]. Виробник – корпорація «Артеріум». Діюча речовина – бензилпеніциліну натрієва сіль. Бензилпеніцилін – антибіотик β -лактамної групи з бактерицидною дією. Механізм дії полягає у порушенні синтезу пептидних зв'язків у клітинній стінці бактерій шляхом інгібування транспептидази [144].

Ампіцилін (Ampicillin)[®]. Реєстраційне посвідчення № UA/2950/01/01. Виробник – корпорація «Артеріум». Діюча речовина – ампіциліну натрієва сіль. Ампіцилін – напівсинтетичний антибіотик широкого спектра дії, що належить до бета-лактамних пеніцилінів. Його дія базується на інгібуванні синтезу клітинної стінки бактерій [145].

Цефазолін (Cefazolin)[®]. Реєстраційне посвідчення № UA/7835/01/01. Виробник – корпорація «Артеріум». Діюча речовина – цефазоліну натрієва сіль. Цефазолін – антибіотик першого покоління групи цефалоспоринів з бактерицидним ефектом. Механізм антимікробної дії пов'язаний з інгібуванням транспептидази та синтезу мукопептиду у клітинній стінці бактерій [146].

Ванкоміцин (Vancomycin)[®]. Реєстраційне посвідчення № UA/13483/01/02. Виробник – ТОВ «Фармекс Груп». Діюча речовина – ванкоміцину гідрохлорид. Ванкоміцин – трициклічний глікопептидний антибіотик з бактерицидною дією. Механізм дії полягає в пригніченні синтезу клітинної стінки бактерій шляхом гальмування полімеризації глікопептидів та селективного інгібування синтезу бактеріальної РНК [147].

Тетрациклін (Tetracycline)[®]. Реєстраційне посвідчення № UA/3520/01/01. Виробник – ПАТ «ВІТАМІНИ». Діюча речовина – тетрацикліну гідрохлорид. Тетрациклін – антибіотик широкого спектра дії з групи тетрациклінів. Його антибактеріальний ефект зумовлений пригніченням синтезу білка на рівні рибосом мікробної клітини [148].

Препарати з вираженою антифунгальною активністю:

Флуконазол (Fluconazole)[®]. Виробник – корпорація «Дарниця». Діюча

речовина – флуконазол. Флуконазол – синтетичний протигрибковий препарат класу азолів широкого спектра дії. Механізм дії полягає в інгібуванні ферменту ланостерол-14 α -деметилази, що призводить до порушення біосинтезу ергостеролу – ключового компонента клітинної мембрани грибів. Це спричиняє накопичення токсичних стеролів і порушення функціонування мембрани, що зупиняє ріст грибка. Відомо, що *Candida krusei* та *Candida glabrata* мають природну резистентність до флуконазолу [149].

Ністатин (Nystatin)[®]. Виробник – корпорація «Здоров'я». Діюча речовина – ністатин. Ністатин – антибіотик полієнової групи, що продукується актиноміцетами *Streptomyces noursei*. Механізм дії полягає у зв'язуванні з ергостеролом у клітинній мембрані грибків, що призводить до утворення пор у мембрані, підвищення її проникності, витоку іонів та інших внутрішньоклітинних компонентів, що зрештою спричиняє загибель грибкової клітини [150].

Амфотерицин В (Amphotericin B)[®]. Виробник – ОАО «СИНТЕЗ». Діюча речовина – амфотерицин В. Амфотерицин В – антибіотик полієнової групи, що продукується актиноміцетами *Streptomyces nodosus*. Його механізм дії полягає у зв'язуванні з ергостеролом у клітинній мембрані грибів, що призводить до утворення пор, підвищення проникності мембрани, витоку іонів та інших молекул, що спричиняє загибель клітини [151].

Антисептичні засоби для порівняльного аналізу антимікробної активності четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію:

Декаметоксин (Decamethoxin)[®]. Виробник – ПАТ НВЦ «Борщагівський ХФЗ». Діюча речовина – декаметоксин. Декаметоксин – синтетичний антисептик та протигрибковий препарат для місцевого застосування. Механізм дії полягає у порушенні проникності цитоплазматичної мембрани бактерій та грибків шляхом з'єднання з фосфатидними групами ліпідів мембрани, що призводить до руйнування клітинної стінки мікроорганізмів. Препарат активний щодо стафілококів, стрептококів, синьогнійної паличок, дріжджових та

дріжджоподібних грибів тощо [152].

Мірамістин (Miramistin)®. Виробник – ПрАТ «Фармацевтична фірма «Дарниця». Діюча речовина – мірамістин. Мірамістин – катіонна поверхнево-активна речовина (ПАР) з протимікробною (антисептичною) дією. Механізм дії полягає в прямій гідрофобній взаємодії молекули мірамістину з ліпідами мембран мікроорганізмів, що призводить до їх фрагментації та руйнування. Препарат чинить виражену бактерицидну дію щодо грампозитивних та грамнегативних, аеробних та анаеробних бактерій, включаючи госпітальні штами, резистентні до антибіотиків [153].

2.3 Характеристика тест-мікроорганізмів для визначення протимікробних властивостей похідних четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію

Для дослідження антимікробної активності арил ациклічних аміноспиртів використовували референтні клінічні штами бактерій та мікроскопічних грибів з музейних колекцій кафедри мікробіології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова та Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Перелік та характеристика тест-мікроорганізмів, що використовувались у дослідженні

Етап дослідження	Мікроорганізми	К-сть штамів	Характеристика штамів
Скринінг	Бактерії		
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	Референтний штам для оцінки антимікробної активності
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1	Референтний штам для оцінки антимікробної активності
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1	Референтний штам для оцінки антимікробної активності
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213		Референтний штам для оцінки антимікробної активності

продовження таблиці 2.2

Етап дослідження	Мікроорганізми	К-сть штамів	Характеристика штамів
Скринінг	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1	Референтний штам ентерококів для мікробіологічних досліджень
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1	Модельний грампозитивний спороутворюючий мікроорганізм
	<i>Mycobacterium smegmatis</i> CIP 56.5	1	Модель для тестування антимікобактеріальної дії
	Мікроскопічні гриби		
	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 704	1	Застосовується для тестування протигрибкової активності щодо плісневих грибів
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1	Типовий представник дріжджоподібних грибів, чутливий штам
Розширене дослідження	Бактерії		
	Референтні штами		
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	1	Референтний штам епідермального стафілокока
	<i>Mycobacterium</i> B-5	1	Клінічно значущий ізолят, модель для дослідження активності протитуберкульозних засобів
	<i>Mycobacterium terrae</i> DSM 43227	1	Сапрофітний мікобактерій, рекомендований для скринінгу антимікобактеріальних препаратів
	<i>Mycobacterium avium</i> ATCC 25291	1	Умовно патогенний вид, асоційований із хронічними інфекціями; використовується в тестах на МАК-комплекс
	Клінічні ізоляти		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	83	Клінічні ізоляти з гнійно-запальних процесів (музей кафедри ВНМУ, НМУ)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	36	Клінічні ізоляти з гнійно-запальних процесів (музей кафедри ВНМУ, НМУ)
	<i>Enterococcus faecalis</i>	19	Клінічні ізоляти з гнійно-запальних процесів (музей кафедри ВНМУ, НМУ)
	Екологічні ізоляти		
	<i>Cellulosimicrobium</i> sp. strain bent-1	1	трофічний субстрат для вільноживучих аміб

продовження таблиці 2.2

Етап дослідження	Мікроорганізми	К-сть штамів	Характеристика штамів
Розширене дослідження	<i>Референтні штами</i>		
	<i>Pichia kudriavzevii</i> (C. krusei) RN 71062	1	Клінічно значущий штам, природно резистентний до флуконазолу
	<i>Candida parapsilosis</i> UKM Y-73	1	Референтний штам кандид групи non- <i>albicans</i> , що спричиняють опортуністичні інфекції
	<i>Nakaseomyces glabratus</i> (C. glabrata) №199	1	Клінічно значущий штам, стійкий до азолів
	<i>Candida tropicalis</i> UKM Y-2502	1	Референтний штам кандид групи non- <i>albicans</i> , асоційований з кандидозом
	<i>Candida utilis</i> UKM Y-1597	1	Референтний штам кандид групи non- <i>albicans</i> , що спричиняють опортуністичні інфекції
	<i>Candida kefir</i> UKM Y-60	1	Референтний штам кандид групи non- <i>albicans</i> , що спричиняють опортуністичні інфекції
	<i>Candida lusitanae</i> №168	1	Референтний штам кандид групи non- <i>albicans</i> , що спричиняють опортуністичні інфекції
	<i>Клінічні ізоляти</i>		
	<i>Candida albicans</i>	60	Клінічні ізоляти кандид з гнійно-запальних уражень та слизових оболонок людини (музей кафедри НМУ)
	<i>Pichia kudriavzevii</i> (C. krusei)	19	Клінічні ізоляти з урогенітального тракту (музей кафедри НМУ)
	<i>Nakaseomyces glabratus</i> (C. glabrata)	17	Клінічні ізоляти (музей кафедри НМУ)
	<i>Candida auris</i>		Клінічні ізоляти (музей кафедри НМУ)
	<i>Найпростіші</i>		
	<i>Екологічні ізоляти</i>		
	<i>Acanthamoeba</i> sp. strain Krym (GenBank: MH620776.1)	1	Представник вільноживучі амеб

2.4 Дослідження антимікробної активності похідних арил ациклічних аміноспиртів

Первинний скринінг антимікробного ефекту четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію здійснювався методом дифузії в агар (метод «лунок») щодо музейних штамів. У стерильні чашки Петрі розливали 7 мл «голодного» агару, після охолодження нижнього шару агару на ньому встановлювали на однаковій відстані (2,0-2,5 см) один від одного циліндр (внутрішній діаметр – $6,0 \pm 0,1$ мм). Навколо циліндрів заливали верхній шар – 10 мл розтопленого та охолодженого до 45-50 °С агару Мюллера-Хінтона (ТОВ «Фармактив», Україна), змішаного з мікроорганізмами. Інокулят добової культури бактерій відповідав щільності 0,5 за стандартом МакФарланд (приблизно $1,5 \times 10^8$ КУО/мл) та вносився в об'ємі 1 мл. Після охолодження верхнього шару циліндри виймали та підсушували середовище. Досліджуванні речовини вносили у лунки в об'ємі 20 мкл з вихідною концентрацією 1 мкг/мл, з подальшою інкубацією в термостаті впродовж 24 год за температури 36 °С. Оцінку антибактеріальної активності синтезованих сполук оцінювали за розміром зони затримки росту (у мм), з точністю до 1 мм, речовини, які не продемонстрували ознак антимікробної дії, були вилученні в подальших дослідженнях щодо мікроорганізмів [154].

Наступний етап скринінгу та визначення антимікробної дії досліджуваних сполук щодо клінічних ізолятів передбачав визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК). Дослідження проводилось згідно стандартів та критеріїв рекомендованих Європейським комітетом по тестуванню антимікробної чутливості 2024 року (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)). З цією метою використовувався мікрометод серійних розведень у рідкому поживному середовищі (бульйон Мюллера-Хінтона (ТОВ «Фармактив», Україна)). Інокулят мікроорганізмів, щільністю 0,5 за стандартом мутності МакФарланд, було приготовлено з добової культури мікроорганізмів та відповідав $1-2 \times 10^8$ КУО. Сполуки розчиняли у стерильній дистильованій воді згідно характеристик. Розчини титрували у стерильних

полістиролових планшетах (Greiner Bio-One GmbH, Німеччина) з метою двукратного зменшення концентрації у кожному наступному розведенні від 500 мкг/мл у першому до 0,24 в дванадцятому. Облік результатів проводився візуально через 24 години інкубації ($t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$), з метою контролю росту з лунки відбиралось 10 мкл середовища з розведенням в 90 мкл та наступним висівом на тверде поживне середовище. Відсутність ознак росту через добу культивування приймалось за позитивний результат [155, 156].

Антифунгальна активність сполук вивчалась за раніше описаними методиками з внесенням необхідних коректив. Інокулят мікроорганізмів стандартизували до концентрації $1,5 \times 10^6$ КУО/мл. Для проведення дифузійного методу в агарі використовували середовище Сабуро (ТОВ «Фармактив», Україна), тоді як для дискодифузійного методу застосовували середовище RPMI 1640 з L-глютаміном (BIOWEST, Франція). Важливою особливістю було культивування пліснявих грибів, що потребували температури інкубації $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 48 годин [157].

2.5 Визначення чутливості тест-мікроорганізмів до антибіотиків

Дослідження чутливості мікроорганізмів до антибіотиків здійснювалось класичним дискодифузійним методом. Суспензію досліджуваного мікроорганізму (стандарту 0,5 за МакФарландом) скляним шпателем втирали в стерильний агар Мюллера-Гінтона, який розливали в чашки Петрі шаром товщиною $4,0 \pm 0,5$ мм. Після чого чашки підсушували у термостаті при $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 10–20 хвилин для видалення надлишкової вологи. Диски з антибіотиками стерильним пінцетом розміщували на відстані не менше 15–20 мм від краю чашки; на одну чашку розміщували не більше 6 дисків. Чашки інкубували при температурі $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 24 годин, після чого вимірювали діаметри зон пригнічення росту навколо кожного диска в міліметрах. Результати інтерпретували згідно з граничними значеннями (*breakpoints*), рекомендованими EUCAST (2024) [158].

У дослідженні застосовували диски з антибіотиками (бензилпеніцилін

(6 ОД), ампіцилін (10 мкг), цефазолін (30 мкг), ванкоміцин (30 мкг) та тетрациклін (30 мкг)) виробництва ТОВ «Фармактив» (Україна), що відповідають стандартам, рекомендованим EUCAST для диско-дифузійного методу.

З метою отримання надійних даних щодо чутливості клінічних штамів мікроорганізмів до досліджуваних антибіотиків, контрольовано проводилось визначення МІК препаратів методом серійних розведень. Методика не підпадала модифікаціям, детальний опис методу серійних розведень у рідкому поживному середовищі було надано раніше [155, 156].

У дослідженні з метою ідентифікації метицилінрезистентності клінічних ізолятів стафілококів застосовували фенотиповий метод скринінгу чутливості до цефокситину згідно з рекомендаціями EUCAST (2024). Метод ґрунтувався на диско-дифузійному підході з використанням стандартних паперових дисків, просочених цефокситином у концентрації 30 мкг (HiMedia, Індія), який вважається високочутливим індуктором синтезу пеніцилінзв'язуючого білка PBP2a, що кодується геном *mecA*.

Після завершення інкубації проводили вимірювання діаметру зони пригнічення росту навколо диска. Згідно з інтерпретаційними критеріями EUCAST (2024), значення зони інгібування ≤ 22 мм свідчить про наявність фенотипової резистентності до метициліну та корелює з присутністю гена *mecA*, тоді як значення ≥ 23 мм вказує на чутливість до бета-лактамних антибіотиків [159].

2.6 Дослідження фармакодинамічних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію

Для дослідження фармакодинамічних властивостей новосинтезованих четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію було застосовано комплекс експериментальних підходів, що дозволяють охарактеризувати як пряму антимікробну дію, так і залишкову активність після короткочасної експозиції. Зокрема, для кількісної оцінки динаміки антимікробної дії сполук

використовували метод кривих «*time-kill*», який дає змогу визначити не лише наявність бактерицидного або бактеріостатичного ефекту, але й його характер (часозалежний, концентраційнозалежний або транзиторний) упродовж інкубації.

Доповненням до цього підходу стало вивчення постантибіотичного (для грибів – фунгіцидного) ефекту (РА(F)E), що дозволяє оцінити тривалість пригнічення росту мікроорганізмів після видалення препарату з середовища. Сукупне застосування цих методик забезпечує комплексну оцінку фармакодинамічного профілю досліджуваних сполук.

Методика дослідження антимікробної активності методом *time-kill*.

Мікроорганізми культивували у рідкому середовищі (бульйон Мюллера-Хінтона – для бактерій, RPMI – для кандид). Інокулят стандартизували до концентрації 1×10^6 КУО/мл (для бактеріальної суспензії) та 1×10^6 КУО/мл (для суспензії з дріжджеподібних грибів).

До кожної пробірки з інокулятом додавали досліджувану сполуку у трьох концентраціях: $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$, $1 \times \text{МІК}$ та $2 \times \text{МІК}$. Контрольний зразок містив мікроорганізми без додавання препарату. Інкубацію проводили при 37 °С упродовж 24 годин (бактерії) або 48 годин (кандиди). Визначення кількості життєздатних клітин проводили у часових точках 0, 1, 2, 4, 8 та 24 години методом посіву серійних розведень на щільне середовище з підрахунком колонієутворюючих одиниць (КУО/мл) [160].

Для кожного зразка здійснювали серію десятикратних послідовних розведень у стерильному фізіологічному розчині, після чого 10 мкл кожного розведення висівали краплинним методом з модифікацією Майлза і Мізра (Miles & Misra method) на відповідне щільне середовище (МПА (ТОВ «Фармактив» (Україна) – для бактерій та середовище Сабуро – для кандид). Після інкубації при 37 °С протягом 24-48 годин підраховували кількість колоній у зонах з підрахунковим рівнем росту (10-200 КУО) і обчислювали кількість життєздатних клітин [161].

Для оцінки ефективності антимікробної дії у кожному часовому інтервалі

обчислювали логарифмічне зниження мікробного навантаження за формулою:

$$\log_{10} (\text{CFU/ml}) = \log_{10} \left(\frac{\text{Кількість колоній} \times \text{розведення} \times 1000}{\text{об'єм, що висівали (мкл)}} \right)$$

Результати інтерпретували згідно з наступними критеріями [162–164]:

- **Бактерицидна (фунгіцидна) дія:** зниження на $\geq 3 \log_{10}(\text{CFU/мл})$ у порівнянні з вихідним рівнем (тобто $\geq 99,9\%$ загибелі).
- **Бактеріостатична (фунгістатична) дія:** відсутність значного зниження бактеріального навантаження (менше $3 \log_{10}$).
- **Транзиторна дія:** початкове пригнічення росту з подальшим відновленням.
- **Концентраційно-залежна дія:** ефект значно вираженіший при збільшенні концентрації препарату.
- **Часозалежна дія:** ефективність зростає з часом, незалежно від концентрації.

Інтерпретацію характеру антимікробної дії здійснювали візуально за конфігурацією кривих порівняно з контролем, з урахуванням тенденції до зниження або відновлення росту мікроорганізмів залежно від концентрації досліджуваної сполуки [165–170].

Методика визначення постантибіотичного ефекту (PAE). PA(F)E визначали для бактерій після попередньої інкубації мікроорганізмів з досліджуваними сполуками у концентраціях $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$, $1 \times \text{МІК}$ та $2 \times \text{МІК}$ протягом 30 хвилин та 1 години при температурі 37°C . Після завершення експозиції клітини видаляли шляхом центрифугування (15 хв, 3500 об./хв), відмивали у фізіологічному розчині з подальшим повторним центрифугуванням. Процедуру повторювали тричі. Отриманий осад ресуспендували у 10,0 мл стерильного середовища. У фіксовані часові точки (0, 2, 4, 6, 8, 10 та 24 години) відбирали проби та визначали кількість життєздатних клітин методом посіву на тверде поживне середовище з подальшим підрахунком КУО. Аналогічну процедуру

проводили і для контрольної проби без попередньої обробки препаратом [171].

Для обчислення (РА(F)E) використовували формулу:

$$PA(F)E = T - C$$

де,

РА(F)E – постантимікробний (антифунгальний) ефект, Т – час, необхідний для досягнення зростання чисельності мікроорганізмів на $1 \log_{10}$ КУО/мл у дослідному зразку після видалення антимікробного агента, С – аналогічний час для контрольного зразка без впливу препарату.

Тривалий (РА(F)E) свідчить про пролонгований інгібуючий ефект досліджуваної речовини та може бути підґрунтям для зменшення частоти її введення. Його значення залежать як від виду мікроорганізму, так і від механізму дії препарату [172–174].

2.7 Дослідження антипротозойного ефекту похідних арил ациклічних аміноспиртів

У вивчені антипротозойної активності досліджуваних сполук використовувались вільноживучі амеби роду *Acanthamoeba*, які були отримані зі зразків бентонітових глин родовищ, розташованих у Сімферопольському районі (АР Крим). Виділення здійснено співробітниками кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології НМУ імені О.О. Богомольця під керівництвом академіка НАН та НАМН України В.П. Широбокова шляхом культивування на поживному середовищі з попередньою інокуляцією *Escherichia coli*, з подальшим удосконаленням методики шляхом використання бактерій роду *Cellulosimicrobium* [175]. Ідентифікацію амеб здійснювали за морфологічними критеріями та шляхом ампліфікації і секвенування фрагментів гена 18S рРНК. Усі ізоляти віднесено до морфологічної групи II за класифікацією Pussard і Pons (1977) та до генотипу Т4, що підтверджено послідовностями у базі GenBank (штам *krym* – MH620776.1) [176].

Як трофічний субстрат застосовували бактерію *Cellulosimicrobium sp.* strain bent-1 (GenBank: MH517543.1), яка була виділена з тих самих зразків, що й

амеби. Бактерії культивували на триптон-соевому або м'ясо-пептонному агарі за температури 36 ± 1 °C [175].

Для оцінки антипротозойної активності досліджуваних сполук застосовано модифіковану методику бляшкоутворення, розроблену академіком НАН та НАМН України В.П. Ширококовим. Суть методу полягає у кількісному визначенні життєздатності амеб за здатністю формувати локалізовані прозорі зони (бляшки) у товщі агару, інокульованого *Cellulosimicrobium sp.* У стерильні чашки Петрі вносили 10 мл розплавленого і охолодженого до 45 °C глюкозовмісного поживного агару з додаванням 100 мкл суспензії амеб (приблизно 100-200 бляшкоутворювальних одиниць) та 400 мкл культури бактерій. Після застигання агару формували лунки, у які через 24 години інкубації додавали розчини досліджуваних сполук у об'ємі 50 мкл. За наявності амебоцидної активності через 72 години навколо лунки формувалася зона редукції бляшок (ЗРБ), що свідчило про інгібування активності амеб. З метою оцінки ефективності досліджуваних сполук проводився попередній скринінг з подальшим визначенням мінімальної бляшкоінгібуючої концентрації (МБІК). Для цього досліджувані речовини попередньо розводили шляхом дворазового серійного розведення. На поверхні агару формували стандартні лунки, у які вносили по 50 мкл кожного з розведень досліджуваної сполуки. Після інкубації за температури 36,5 °C протягом 72 годин визначали найменшу концентрацію речовини, при якій спостерігалось пригнічення бляшкоутворення діаметром до 10 мм [177].

2.8 Визначення цитотоксичного профілю четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію з вираженою антимікробною активністю

У даному дослідженні для оцінки цитотоксичності новосинтезованих сполук було застосовано МТТ-тест (від англ. *methylthiazol tetrazolium*), який залишається одним з найбільш чутливих, відтворюваних та широко визнаних методів кількісної оцінки життєздатності клітин *in vitro*. Метод заснований на здатності мітохондріальних сукцинатдегідрогеназ життєздатних клітин

відновлювати жовтий водорозчинний тетразолій – МТТ (3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифенілтетразолію бромід) – до нерозчинного фіолетового формазану, який можна кількісно оцінити спектрофотометрично. Важливо, що тільки метаболічно активні клітини продукують формазан, що дозволяє чітко розмежувати життєздатну та некротизовану/апоптотичну популяцію [178].

У якості клітинної моделі було обрано лінію НЕр-2, яка походить від плоскоклітинної карциноми гортані людини (рис. 2.1). Клітини НЕр-2 широко використовуються в експериментальній онкології, вірусології, цитотоксикології та фармакології як чутлива модель для дослідження ефекту протипухлинних, протизапальних, антимікробних та біоактивних сполук. Їх перевага полягає у високій проліферативній активності, однорідності популяції, чутливості до змін мікрооточення та хорошій адгезивності до пластичних поверхонь, що забезпечує надійність при мікропланшетному культивуванні [179].



Рис. 2.1. Морфологія культури клітин плоскоклітинної карциноми гортані людини НЕр-2

Клітини культивували у середовищі RPMI-1640, збагаченому 10 % фетальною телячою сироваткою (FBS), 100 U/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину, за стандартних умов (37 °C, 5 % CO₂, 95 % вологість). Клітини висівали у 96-лункові планшети по 1×10^4 клітин/лунку, інкубували протягом 24 год для адгезії, після чого додавали тестовані сполуки в титрі 500-0,98 мкг/мл

у потрійних повторях. Експозицію проводили протягом 24 год [180].

Після завершення експозиції досліджуваних сполук до кожної лунки додавали 10 мкл розчину МТТ та інкубували планшети протягом 3–4 годин при температурі 37 °С. Після інкубації до кожної лунки додавали 100 мкл диметилсульфоксиду (DMSO) для повного розчинення формагану. Інтенсивність забарвлення вимірювали спектрофотометрично на мікропланшетному рідері при довжині хвилі 492 нм, що є прийнятним альтернативним параметром для оцінки метаболічної активності згідно з публікаціями [181]. Для всіх зразків, включаючи контролю, використовувалася однакова довжина хвилі. Кількість утвореного формагану є прямо пропорційною до кількості метаболічно активних (життєздатних) клітин, частку яких визначали за допомогою наступної формули:

$$\text{Життєздатність(\%)} = \left(\frac{OD_{\text{дослідження}}}{OD_{\text{контроль}}} \right) \times 100\%$$

де,

OD дослідження – оптична щільність дослідного зразка (із додаванням тестованої сполуки),

OD контроль – оптична щільність контрольного зразка (без впливу сполуки),

Життєздатність (%) – відсоткове співвідношення метаболічно активних клітин у дослідному зразку відносно контролю.

З отриманих даних будували графік дозозалежної кривої життєздатності, за яким обчислювали IC₅₀ – концентрацію речовини, що викликає 50% зниження життєздатності клітин порівняно з контролем [182–184].

2.9 Методика статистичної обробки результатів

Статистичну обробку результатів біомедичних досліджень здійснювали з використанням ліцензійних програмних пакетів Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США), Microsoft Excel 365 (США) та середовища для статистичного аналізу

RStudio (Posit, США).

Первинна обробка кількісних даних включала розрахунок середнього арифметичного (M), середнє квадратичне відхилення (SD), медіани, а також визначення достовірності різниць (p) між досліджуваними показниками. Статистично значущими вважали результати при $p \leq 0,05$.

Для виявлення достовірних відмінностей між групами застосовували дисперсійний аналіз ANOVA, критерій Тьюкі, а також t-критерій Стюдента для малих вибірок [185].

РОЗДІЛ 3

АНТИБАКТЕРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ЧЕТВЕРТИННИХ СОЛЕЙ АРИЛОКСИЕТОКСИ ДИАЛКІЛ АМОНІЮ

3.1 Скринінг антибактеріальної активності сполук щодо референтних штамів мікроорганізмів

Антибіотикорезистентність є однією з найсерйозніших загроз сучасній медицині, що несе значні ризики для здоров'я населення, збільшує тривалість і вартість лікування, а також підвищує рівень смертності від бактеріальних інфекцій [186]. За даними ВООЗ, у 2019 році стійкість до антибіотиків стала причиною приблизно 1,27 мільйона летальних випадків у світі, а ще 4,95 мільйона смертей були пов'язані з ускладненнями, викликаними мультирезистентними бактеріями [187]. Прогнози свідчать, що до 2050 року ця цифра може зрости до 10 мільйонів смертей на рік, якщо не будуть розроблені нові ефективні антимікробні агенти [188].

Особливо загрозливим є поширення мультирезистентних штамів таких збудників, як *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* та *A. baumannii*, які спричиняють тяжкі внутрішньолікарняні інфекції, сепсис та пневмонію [59]. За статистикою Європейського центру профілактики та контролю захворювань (ECDC), у країнах ЄС близько 33 000 смертей щорічно спричинені інфекціями, резистентними до антибіотиків [189]. У США понад 2,8 мільйона людей щороку інфікуються стійкими бактеріями, що призводить до більш ніж 35 000 летальних випадків [190].

У зв'язку з цим дослідження нових антимікробних сполук є пріоритетним напрямом сучасної фармацевтичної науки. Четвертинні амонієві сполуки вже давно відомі своєю антисептичною та дезінфекційною активністю, однак їхня бактерицидна дія щодо широкого спектра патогенних мікроорганізмів потребує подальшого вивчення [191]. Доведено, що модифікація структури четвертинних амонієвих солей шляхом введення арилоксиетоксифрагментів підвищує їхню

антимікробну ефективність завдяки взаємодії з клітинними мембранами бактерій та порушенню їхнього життєвого циклу [143].

На першому етапі дослідження нових антимікробних агентів важливим є скринінг їхньої активності щодо референтних штамів мікроорганізмів, що дозволяє оцінити спектр дії та виявити перспективні молекули для подальших досліджень. Відповідно до міжнародних стандартів, референтними вважаються мікроорганізми, які стабільно зберігають свої біологічні властивості та використовуються для стандартизації методів тестування [192].

Скринінг антимікробних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію методом дифузії в агар. Методом дифузії в агар (рис. 3.1) було здійснено скринінг ефективності 52 досліджуваних сполук щодо музейних штамів бактерій. У результаті виключено речовини, які не проявили жодного антимікробного ефекту. Антистафілококову активність виявили 45 похідних арил-ациклічних аміноспиртів. Зведені результати скринінгу антибактеріальних властивостей новосинтезованих арил ациклічних аміноспиртів відображено на рисунку 3.2.

Найбільші зони затримки росту *S. aureus* продемонстрували такі сполуки: Кр12 – $18,33 \pm 0,33$ мм, Кр13 – $18,00 \pm 0,58$ мм, Кс20 – $17,33 \pm 0,88$ мм, Кс29 – $17,00 \pm 1,00$ мм, Кс6 та Кс28 – $16,67 \pm 0,88$ мм, Кс17 – $16,33 \pm 0,33$ мм, Кс15 та Кс27 – $15,67 \pm 0,67$ мм і $15,67 \pm 0,33$ мм відповідно, Кс7 – $15,33 \pm 0,67$ мм. Загалом затримку росту з діаметром понад 15 мм спричинили 13 сполук, зокрема Кс21, Кр11 та Кс18.

Антистафілококова активність із утворенням зон затримки росту діаметром від 10 до 15 мм спостерігалась у 32 сполуки з 52 досліджуваних. Сполуки Кс24, Кс25, Кс26, Кс30, Кс31, Кр6 та Кр14 не продемонстрували іїнуїнгібуючого ефекту щодо референтного штаму або діаметр зон затримки росту становив до 10 мм.

Щодо *Ent. faecalis* ATCC 29212, досліджувані сполуки мали менш виражений ефект дії. Найбільш виражену антимікробну активність

продемонстрували п'ять сполук, які індукували зони пригнічення росту діаметром понад 14 мм. Лідером за активністю стала речовина Кс21, яка спричинила найбільшу зону інгібування – 15,00 мм. Також до цієї групи увійшли сполуки Кс14 ($14,67 \pm 0,67$), Кс28 ($14,67 \pm 0,67$), Кс13 ($14,33 \pm 0,67$) та Кр13 ($14,00 \pm 1,15$).



Рис. 3.1. Антибактеріальна дія четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 у твердому поживному середовищі (метод «колодізів»).

Значна частина вивчених четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію формувала зони пригнічення росту в межах 10-14 мм. Вісім сполук утворювали зони затримки росту від 13 мм, ще 25 похідних арил ациклічних аміноспиртів спричинили забезпечували стримування росту бактерій із зонами діаметром від 10 мм. Для шести сполук спостерігалися зони затримки росту, діаметр яких не перевищував 10 мм. При цьому сполуки, що не виявляли антимікробної активності щодо стафілококів, були також неактивними відносно референтного штаму ентерококів.

Протимікробна дія щодо *B. subtilis* ATCC 6633 з утворенням зон затримки росту, діаметр яких перевищував понад 15 мм, характерна сполукам Кс18

(16,00±0,58), Kc21 (16,00±1,00), які показали найвищий результат, Kp13 (15,33±1,45) та Kc17 (15,00±1,15).

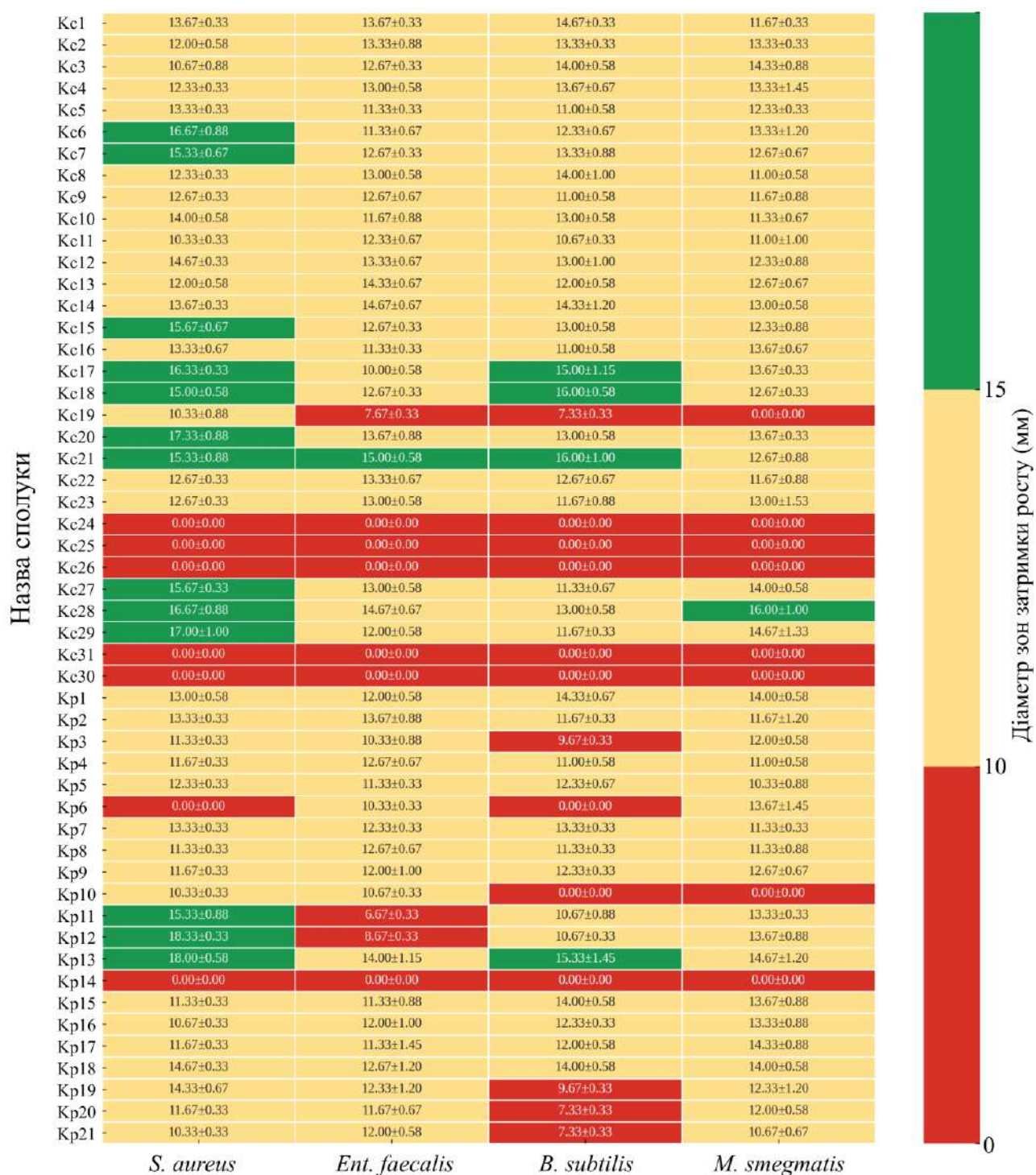


Рис. 3.2. Результати скринінгу антибактеріальних властивостей ($M \pm SD$, $n=3$) похідних четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо референтних штамів у твердому поживному середовищі (метод «колодіязів»).

Активність із зонами затримки росту, діаметр яких варіює в межах від 10 до 15 мм спостерігався для 16 сполук. Низька антибактеріальна активність, з утворенням зон затримку росту до 10 мм, визначено у п'яти досліджуваних арил ациклічних аміноспиртів. Вісім сполук, не показали жодного ефекту щодо референтного штаму бацил.

Серед усіх протестованих сполук найбільший антимікобактеріальну активність виявлено у Кс28, яка забезпечила найбільшу зону затримки росту мікобактерій – $16,00 \pm 1,00$ мм. Помірну активність сполук з зонами затримки росту понад 14 мм спостерігали у Кс29 ($14,67 \pm 1,33$ мм), Кр13 ($14,67 \pm 1,20$), Кс3 ($14,33 \pm 0,88$) та Кр17 ($14,33 \pm 0,88$), Кс27, Кр1 та Кр18 ($14,00 \pm 0,58$).

Активність щодо *M. smegmatis* з утворенням зон пригнічення росту розміром від 10 до 14 мм визначено у 12 сполук. Разом із тим, вісім досліджуваних речовин не проявили антимікобактеріальної дії або розмір зон затримки росту становив менше 10 мм.

У ході дослідження встановлено, що похідні четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію не виявляли значної активності щодо референтних штамів грамнегативних мікроорганізмів. Отримані результати стали підґрунтям і стимулом для подальшого вивчення антимікробної дії сполук стосовно грампозитивних бактерій, з огляду на потенційні перспективи їх застосування у цьому напрямі.

Скринінг антимікробних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію методом серійних розведень. Вивчення ефективності сполук щодо референтних штамів методом серійних розведень (рис. 3.3) дозволило визначити МІК та відібрати 10 найбільш активних похідних арил ациклічних аміноспиртів. Протимікробна активність щодо референтного штаму золотистого стафілококу з МІК від 1 до 20 мкг/мл було визначено для 29 сполук (рис. 3.4). Найвища антистафілококова активність зафіксована у сполуки Кс22, МІК становила $1,17 \pm 0,20$ мкг/мл. Речовини Кс1 та Кс3 продемонстрували другий результат. МІК мала ідентичне значення і дорівнювала $1,56 \pm 0,24$ мкг/мл.

Активність десяти найбільш ефективних сполук визначалась в межах 1-4 мкг/мл. До цієї групи увійшли такі речовини: Кс2 (МІК – $2,14 \pm 0,48$ мкг/мл), Кс15 ($2,34 \pm 0,39$), Кр18 ($2,73 \pm 0,48$), Кс4 ($2,73 \pm 0,48$), Кр16 ($2,73 \pm 0,48$), Кр19 ($3,12 \pm 0,48$) та Кр10 ($3,51 \pm 0,39$).

Серед досліджуваних похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію МІК до 10 мкг/мл щодо референтного штаму визначено сім досліджуваних сполук. Інгібувальний ефект у концентрації в діапазоні 10–20 мкг/мл продемонстрували ще сім речовин. Усі інші сполуки мали МІК понад 20 мкг/мл і не становлять наукового інтересу для подальшої оцінки антимікробної активності щодо стафілококів.

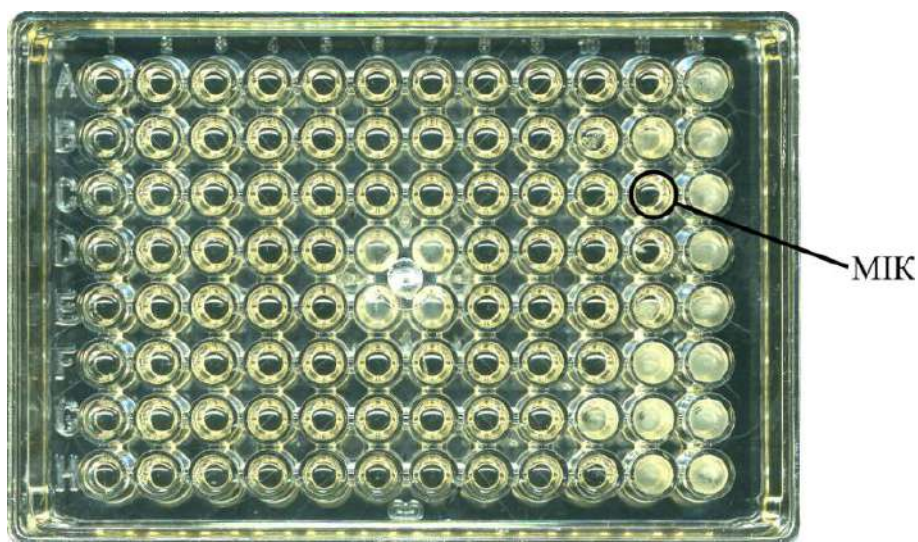


Рис. 3.3. Антимікробна дія четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 мікрометодом серійних розведень у рідкому поживному середовищі.

Протимікробна активність арил ациклічних аміноспиртів щодо референтного штаму ентерококів із МІК у діапазоні від 0,5 до 20 мкг/мл була визначена для 26 сполук. Найвищу активність продемонструвала Кр10, для якої значення МІК становило $0,58 \pm 0,10$ мкг/мл. Наступною за рівнем ефективності визначено Кр19 з МІК $1,76 \pm 0,19$ мкг/мл. До найперспективніших 10 сполук, крім уже згаданих, віднесено Кр8 (МІК – $2,15 \pm 0,48$ мкг/мл), Кс2 ($2,34 \pm 0,39$), Кр18 ($2,54 \pm 0,58$), Кс23 ($2,72 \pm 1,29$), Кс1 ($3,12 \pm 0,48$), Кс3 ($3,12 \pm 0,48$), Кс4 ($3,12 \pm 0,48$) та Кс22 ($3,90 \pm 1,07$), сполуки продемонстрували стабільну активність проти

ентерококів. Крім них, 16 сполук продемонстрували МІК до 10 мкг/мл, що свідчить про їхню помірну ефективність. Значення МІК у межах 10–20 мкг/мл отримано для п'яти сполук. Решта сполук продемонструвала МІК понад 20 мкг/мл, що свідчить про їхню низьку ефективність у цьому дослідженні.

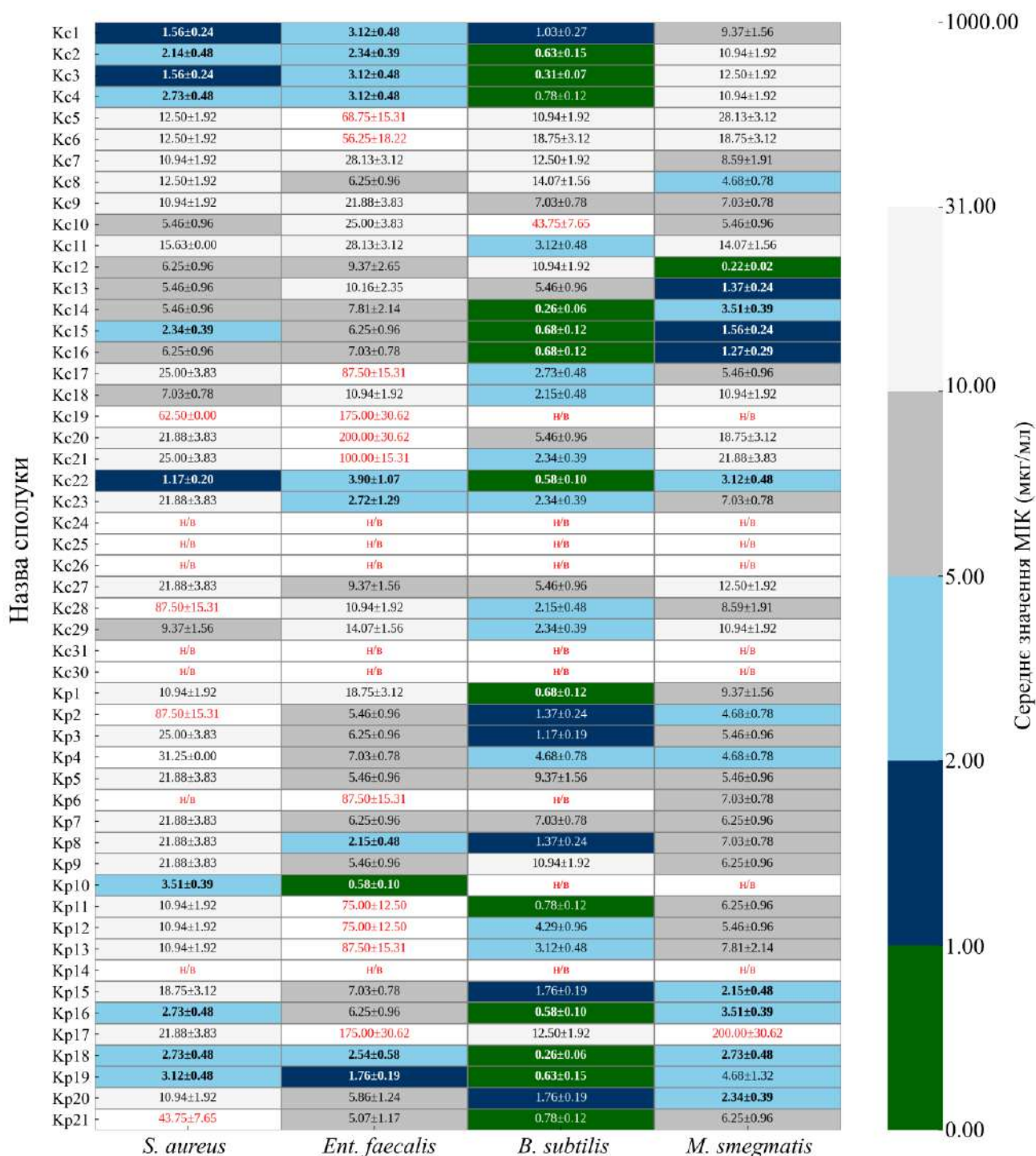


Рис. 3.4. Результати методу серійних розведень ($M \pm SD$, $n=5$) похідних четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо референтних штамів

бактерій. Жирним шрифтом виділено десять сполук з найбільш вираженим антимікробним ефектом щодо бактерій.

Похідні четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію продемонстрували високу активність щодо референтного штаму *B. subtilis* ATCC 6633, визначено 28 сполук із протимікробною дією у межах 1-20 мкг/мл. МІК десяти найактивніших сполук знаходились у межах 0,26-1,00 мкг/мл. Найвищий рівень інгібуючого ефекту щодо грампозитивних спороутворюючих аеробних паличок продемонстрували Кс14 та Кр18, значення МІК яких становило $0,26 \pm 0,06$ мкг/мл. Дещо нижчу ефективність показала Кс3, МІК сполуки визначено в межах $0,31 \pm 0,07$ мкг/мл. До групи найактивніших сполук також увійшли речовини Кр16 (МІК становила $0,58 \pm 0,10$ мкг/мл), Кс22 ($0,58 \pm 0,10$), Кс2 ($0,63 \pm 0,15$), Кр19 ($0,63 \pm 0,15$), Кс15 ($0,68 \pm 0,12$), Кс16 ($0,68 \pm 0,12$), Кр1 ($0,68 \pm 0,12$). Важливо підкреслити високу ефективність сполук щодо референтного штаму бацил.

Крім виділеної групи, інгібуючий ефект із МІК до 1 мкг/мл продемонстрували ще три сполуки, тоді як значення МІК у межах від 1 до 2 мкг/мл було характерним для шести інших похідних арил ациклічних аміноспиртів. Серед досліджуваних похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію сполуки з МІК щодо референтного штаму до 10 мкг/мл включають 10 арил ациклічних аміноспиртів. Група сполук із МІК у межах 10-20 мкг/мл представлена дев'ятьма сполуками. Найнижчу активність серед вибірки продемонстрували сполуки Кс7, Кр17, Кс8, Кс6 та Кс10, їхні МІК щодо бацил перевищували 20 мкг/мл, що значно поступається активності арил ациклічних аміноспиртів із найвищою антимікробною дією.

Досліджувані четвертинні солі арилоксиетокси-діалкіл-амонію продемонстрували високу активність щодо ізоляту *M. smegmatis*. Методом серійних розведень встановлено, що МІК 41 сполуки знаходиться в межах 1-20 мкг/мл. Найвищу активність серед досліджуваних речовин продемонструвала сполука Кс12, для якої МІК становила $0,22 \pm 0,02$ мкг/мл. Інгібувальний ефект у

межах 1-2 мкг/мл виявили сполуки Кс16 (МІК – $1,26 \pm 0,29$ мкг/мл), Кс13 ($1,36 \pm 0,24$) та Кс15 ($1,56 \pm 0,24$). МІК десяти найактивніших сполук не перевищила 4 мкг/мл. До цього переліку також увійшли: Кр15 ($2,14 \pm 0,48$), Кр20 ($2,34 \pm 0,39$), Кр18 ($2,73 \pm 0,48$), Кс22 ($3,12 \pm 0,48$), Кс14 та Кр16 ($3,51 \pm 0,39$).

Серед похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію 22 сполуки продемонстрували МІК від 4 до 10 мкг/мл. Дев'ять речовин продемонстрували помітно нижчу антимікробну активність щодо тестового мікроорганізму, при цьому їх МІК не перевищувала 10 мкг/мл. З огляду на рівень антимікобактеріальної активності, ці сполуки, а також речовини з МІК понад 20 мкг/мл, не становлять наукового інтересу для подальшого вивчення антимікробних властивостей щодо мікобактерій.

Визначення активності сполук дозволило виокремити групи в десять найбільш ефективних сполук за напрямком чутливих до них мікроорганізмів:

- *антистафілококова активність* – Кс22, Кс1, Кс3, Кс2, Кс15, Кр18, Кс4, Кр16, Кр19 та Кр10;
- *антиентерококова дія* – Кр10, Кр19, Кр8, Кс2, Кр18, Кс23, Кс1, Кс3, Кс4 та Кс22;
- *протибациллярний ефект* – Кс14, Кр18, Кс3, Кр16, Кс22, Кс2, Кр19, Кс15, Кс16 та Кр1;
- *антимікобактеріальні сполуки* – Кс12, Кс16, Кс13, Кс15, Кр15, Кр20, Кр18, Кс22, Кс14 та Кр16.

З усіх представлених груп, варто виокремити сполуки Кс22, Кр18 та Кр16, які продемонстрували високу антимікробну активність щодо усіх референтних мікроорганізмів на етапі скринінгу і представляють значний науковий інтерес.

3.2 Визначення чутливості тест-мікроорганізмів до антибіотиків

Поширення резистентності до антимікробних препаратів становить серйозну загрозу для глобальної охорони здоров'я. Важливим аспектом у боротьбі з антибіотикорезистентністю є розуміння того, як резистентні штами

мікроорганізмів реагують на нові терапевтичні препарати. Дослідження показують, що резистентні штами демонструють знижену чутливість до нових препаратів порівняно з їхніми чутливими аналогами [193], що може значно ускладнити лікування інфекцій. Зокрема, штами *Klebsiella pneumoniae*, що продукують карбапенемази, демонструють значно вищу стійкість до цефтазидиму/авібактаму, ніж їхні чутливі аналоги [194]. Крім того, у MRSA часто спостерігається знижена чутливість до нових антимікробних препаратів, порівняно з чутливими штамами MSSA, що ускладнює майбутнє лікування [195]. З метою диференціації клінічних штамів на групи чутливості до антибіотиків, визначення чутливості тест-мікроорганізмів до препаратів порівняння є критично важливим етапом у розробці нових антимікробних стратегій та оцінці їхньої потенційної ефективності.

Визначення чутливості референтних штамів до антибіотиків.

Граничні значення EUCAST для *S. aureus* ATCC 25923 вказані для бензилпеніциліну та тетрацикліну й становлять 26 мм і 22 мм відповідно. Дискодифузійним методом встановлено, що ампіцилін спричиняв зони затримки росту золотистого стафілококу діаметром $31,33 \pm 0,33$ мм. Для цефазоліну спостерігалось пригнічення росту з діаметром зони $22,67 \pm 0,33$ мм. Ванкоміцин спричинив найменшу зону затримки росту – $17,00 \pm 0,58$ мм.

Граничні значення МІК бензилпеніциліну відповідно до EUCAST для золотистого стафілококу становить 0,125 мкг/мл, для тетрацикліну – 1 мкг/мл, а для ванкоміцину – 2 мкг/мл. Методом серійних розведень встановлено, що МІК ампіциліну щодо референтного штаму становить $1,56 \pm 0,24$ мкг/мл. МІК цефазоліну була значно вищою – $4,68 \pm 1,32$ мкг/мл.

Референтний мікроорганізм *S. aureus* ATCC 29213 характеризується здатністю до продукції β -лактамаз, тому визначення антимікробних препаратів щодо β -лактамних антибіотиків не проводилось.

Щодо *S. epidermidis* граничні значення EUCAST наявні лише для тетрацикліну та є ідентичними для всіх стафілококів. Зони затримки росту

S. epidermidis ATCC 12228, що спостерігались під дією бензилпеніциліну, становили $37,00 \pm 0,58$ мм. Значний діаметр зони затримки росту також відзначено для ампіциліну ($32,33 \pm 0,33$ мм). Цефазолін спричиняв зони затримки росту діаметром $22,67 \pm 0,88$ мм, а ванкоміцин – $16,00 \pm 0,58$ мм.

Відмінність граничних значень МІК між *S. epidermidis* та *S. aureus* полягає у відсутності встановлених показників для бензилпеніциліну, тоді як для ванкоміцину ці рівні є вдвічі вищими – 4 мкг/мл. Гранична концентрація мінімальної інгібувальної дії тетрацикліну є уніфікованою для всіх бактерій роду *Staphylococcus*.

За результатами визначення МІК, референтний штам показав найвищу чутливість до бензилпеніциліну, середнє значення мінімальної інгібувальної концентрації (МІК) становило $0,23 \pm 0,03$ мкг/мл. Середня МІК для ампіциліну становила $0,35 \pm 0,16$ мкг/мл. Цефазолін спричиняв інгібування росту при концентрації $1,56 \pm 0,24$ мкг/мл.

Згідно з EUCAST, зони затримки росту ентерококів під впливом ванкоміцину, що не перевищують 12 мм або мають нечіткий край, свідчать про їхню резистентність до цього антибіотику. Музейний штам *Ent. faecalis* ATCC 29212 продемонстрував найбільшу чутливість до ампіциліну, середній діаметр зони затримки росту становив $29,33 \pm 0,67$ мм, а під дією тетрацикліну зона пригнічення росту досягала $21,67 \pm 0,33$ мм. Ентерококи мають видову резистентність до бензилпеніциліну та цефазоліну, тому визначення чутливості до цих антибіотиків не проводилося.

Гранична концентрація МІК для ванкоміцину становить 4 мкг/мл, тоді як для всіх інших антибіотиків МІК визначався щодо референтного штам. Інгібувальний ефект тетрацикліну спостерігався при середньому значенні МІК $0,48 \pm 0,14$ мкг/мл. Для ампіциліну це значення становило $1,27 \pm 0,29$ мкг/мл. Ентерококам характерна природна резистентність до цефазоліну та бензилпеніциліну, тому їхню чутливість до цих препаратів не визначали.

Визначення чутливості клінічних ізолятів до антибіотиків. Розподіл чутливості до бензилпеніциліну серед клінічних ізолятів *S. aureus* показав, що 51% штамів мали зони затримки росту в межах 0-15 мм, у 4% штамів зони були 16-20 мм, у 6% – 21-25 мм, у 14% – 26-30 мм. Зони затримки росту 31-40 мм спостерігались у 25% штамів. Відповідно до рекомендацій EUCAST, 61% штамів є резистентними до бензилпеніциліну (рис. 3.5).



Рис. 3.5. Чутливість клінічних ізолятів *S.aureus* (n=83) до антибіотиків (диско-дифузійний метод)

Щодо ампіциліну, ситуація подібна: 42% штамів характеризувалися зонами 0-15 мм, 6% штамів утворювали зони діаметром 16-20 мм, 11% – 21-25 мм, 19% – 26-30 мм, 20% – 31-40 мм. Лише в 1% штамів зафіксовано зони понад 40 мм. Через відсутність граничних значень EUCAST для ампіциліну порівнювалась чутливість з референтним штамом *S. aureus* ATCC 25923, зона якого становила 31 мм. На основі цього показника, 59% клінічних штамів продемонстрували меншу чутливість, ніж референтний штам.

У контрасті до пеніцилінів, профіль чутливості до цефазоліну характеризується більш стабільним розподілом показників. Так, 33% штамів мали зони пригнічення росту 0-15 мм, 13% – 16-20 мм, 24% – 21-25 мм, 18% – 26-30 мм, і 12% – 31-40 мм. Як і у випадку з ампіциліном, граничні значення для цефазоліну щодо стафілококів відсутні. У порівнянні зі значенням чутливості

референтного штаму (22 мм), 46% клінічних штамів характеризувалися меншою чутливістю.

Результати чутливості стафілококів до ванкоміцину підтверджують ефективність цього препарату, адже більшість (82%) штамів характеризувались зонами затримки росту діаметром 16-20 мм, 10% – 11-15 мм і лише 8% штамів мали зони 21-25 мм. Зона затримки росту референтного штаму становила 17 мм, тому всі штами (100%) відповідали критеріям чутливості до ванкоміцину.

Щодо тетрацикліну, більшість штамів (71%) мали зони затримки росту в діапазоні 21-30 мм (31% – 21-25 мм та 39% – 26-30 мм). Зони діаметром 31-40 мм спостерігались під дією цього антибіотика у 6% штамів. Пригнічення росту у вигляді зон діаметром 16–20 мм спостерігалось у 5% штамів. Мінімальна антимікробна активність тетрацикліну або її відсутність (зони 0-15 мм) фіксувалася у 19% ізолятів. Відповідно до рекомендацій EUCAST, граничний поріг чутливості для тетрацикліну становить 22 мм, що дозволило класифікувати 55% досліджених штамів як чутливі, а 45% – як резистентні до цього антибіотика.

Під час визначення МІК для клінічних штамів *S. aureus* бензилпеніцилін продемонстрував обмежену антибактеріальну активність. При концентрації (0,12 мкг/мл) він пригнічував лише 4% штамів, а подвоєння концентрації до 0,24 мкг/мл підвищувало ефективність до 26%. Подальше підвищення концентрації до 0,48 мкг/мл дозволило пригнічувати ріст лише додаткових 6% штамів (загалом 31%). Застосування концентрацій від 0,98 до 7,81 мкг/мл мали незначний ефект, інгібуючи 46% мікроорганізмів. У той же час, медіана значень МІК для бензилпеніциліну склала 15,63 мкг/мл, МІК₅₀ – 15,63 мкг/мл, а МІК₉₀ – не визначено, що свідчить про значну варіабельність чутливості серед ізолятів. Згідно з EUCAST, граничне значення МІК бензилпеніциліну для *S. aureus* становить 0,125 мкг/мл, що свідчить про чутливість до препарату лише близько 4%-26% досліджених клінічних штамів (рис. 3.6).

Ампіцилін, як і бензилпеніцилін, мав низьку антибактеріальну активність щодо досліджених штамів. При концентрації 0,48 мкг/мл препарат пригнічував

лише 8% мікроорганізмів, а при підвищенні концентрації до 0,98 мкг/мл частка чутливих штамів зросла до 28%. Для пригнічення понад 50% штамів була необхідна концентрація вища 15,63 мкг/мл. Медіана значень МІК ампіциліну серед досліджених ізолятів становила 62,50 мкг/мл. Через відсутність офіційних граничних значень EUCAST для ампіциліну, оцінку проводили відносно референтного штаму *S. aureus* ATCC 25923 з МІК $1,56 \pm 0,24$ мкг/мл. Порівняння свідчить, що 78% клінічних ізолятів демонстрували вищий рівень резистентності, ніж референтний штам.

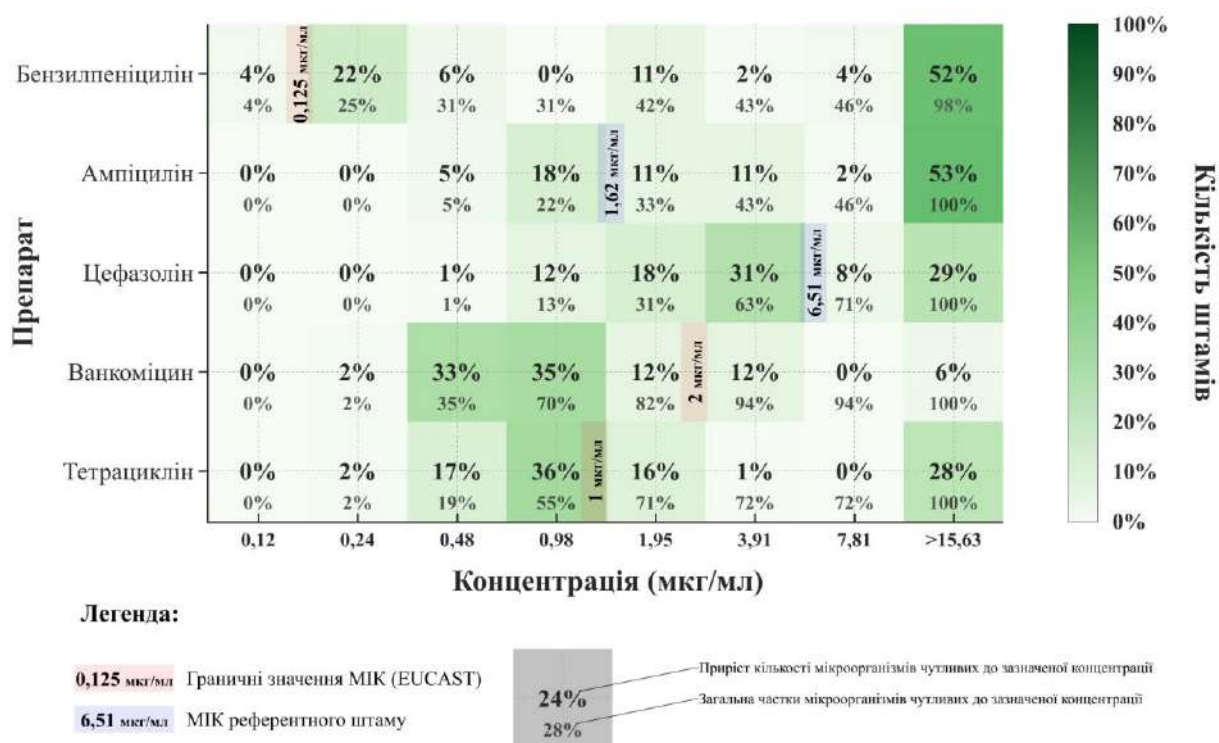


Рис. 3.6. Чутливість клінічних ізолятів *S.aureus* (n=83) до антибіотиків (метод серійних розведень)

Цефазолін мав помірну антибактеріальну активність. При концентрації 0,98 мкг/мл інгібувалося лише 12% штамів, проте вже при концентрації 3,9 мкг/мл було пригнічено ріст понад 50% штамів (63%). Вказана концентрація відповідала медіанному значенню. Концентрація, що забезпечувала пригнічення понад 90% штамів, як і у інших β -лактамних антибіотиків, була за межами концентрації 15,63 мкг/мл. З огляду на відсутність офіційно регламентованих клінічних граничних концентрацій для цефазоліну відповідно до стандартів

EUCAST, інтерпретацію антимікробної чутливості здійснювали з урахуванням показників референтного штаму *S. aureus* ATCC 25923, для якого МІК становила $4,68 \pm 1,32$ мкг/мл. Відповідно до зазначеного критерію, 48% клінічно ізольованих штамів демонстрували рівень резистентності, співставний або вищий за референтне значення, що свідчить про потенційно знижену чутливість досліджуваних ізолятів до цефазоліну.

Ванкоміцин мав найбільш виражену антистафілококову активність серед усіх досліджуваних препаратів. Уже при концентрації 0,48 мкг/мл було інгібовано 33% штамів, а при концентрації 0,98 мкг/мл – 70%, що свідчить про пригнічення понад 50% штамів в межах концентрації 0,5-1,0 мкг/мл. Пригнічення 90% штамів було досягнуто при концентрації 3,9 мкг/мл. Граничні значення EUCAST для ванкоміцину щодо *S. aureus* становлять 2 мкг/мл, відповідно більшість клінічних штамів (близько 94%) є чутливими до цього антибіотика.

Тетрациклін також продемонстрував відносно високу антибактеріальну активність, забезпечуючи пригнічення росту понад 50% штамів (55%) вже при концентрації 0,98 мкг/мл. Подальше збільшення концентрації до 3,9 мкг/мл інгібувало ріст понад 70% штамів. Медіанне значення МІК тетрацикліну серед ізолятів становило 0,98 мкг/мл, а МІК₉₀ – 3,90 мкг/мл. Граничне значення EUCAST для тетрацикліну щодо *S. aureus* становить 1 мкг/мл, що свідчить про ефективність препарату проти 55% досліджених штамів.

Аналіз результатів дослідження антибіотикочутливості клінічних штамів *S. epidermidis* продемонстрував, що до бензилпеніциліну та ампіциліну штами володіли абсолютною резистентністю, на що вказують зони затримки росту до 10 мм. Такий показник є критичним і підтверджує широке поширення серед досліджуваних штамів механізму резистентності, пов'язаного із продукцією пеніциліназ або зміною мішені дії цих антибіотиків.

Дослідження чутливості до цефазоліну, продемонструвало, що резистентними до антибіотику (діаметр зон до 15 мм) виявились 67% штамів, з яких 56% утворювали зони до 10 мм і 11% – в діапазоні 11-15 мм. У 14% штамів

були зафіксовані зони затримки росту 16-20 мм, ще у 6% – до 25 мм. Діаметри зон 26-30 мм зареєстровані у 11% штамів, тоді як 3% штамів мали зони затримки росту 31-40 мм. У зв'язку з тим, що граничні значення для цефазоліну в рекомендаціях EUCAST для стафілококів відсутні, було використане значення референтного штаму *S. epidermidis* ATCC 12228 – 23 мм. Відповідно, 83% досліджених клінічних ізолятів мали меншу чутливість до цефазоліну, ніж музейний штам (рис. 3.7).



Рис. 3.7. Чутливість клінічних ізолятів *S. epidermidis* (n=36) до антибіотиків (диско-дифузійний метод)

Дослідження чутливості до ванкоміцину виявило високу активність цього глікопептиду щодо стафілококів. Основна частина штамів (83%) мала зони затримки росту у межах 16-20 мм, тоді як 14% – 11-15 мм, і лише 3% штамів утворювали зони менше 10 мм. Отриманий результат свідчить про те, що 90% штамів характеризувались чутливістю до ванкоміцину на рівні референтного штаму.

Дані щодо тетрацикліну свідчать про варіабельність у чутливості штамів епідермального стафілококу до цього антибіотика. Найбільша кількість штамів (42%) мали зони затримки росту 21-25 мм, 36% – 26-30 мм, 17% – 11-15 мм, 8% – 31-40 мм та 3% – 16-20 мм. При цьому штамів із зонами понад 40 мм не

спостерігалось. Граничне значення EUCAST для тетрацикліну становить 22 мм, що означає резистентність 22% штамів, які мали менші зони затримки росту.

За результатами мікрометоду серійних розведень встановлено, що бензилпеніцилін при концентрації 0,24 мкг/мл інгібував ріст 19% клінічних штамів. Подальше підвищення концентрації препарату в межах 0,48–7,81 мкг/мл супроводжувалося лише незначним зростанням антимікробного ефекту, який охоплював 31% ізолятів. У межах досліджуваного концентраційного діапазону повного інгібування росту вибірки клінічних штамів зафіксовано не було. Чинні стандарти EUCAST не передбачають визначення клінічних граничних концентрацій для оцінки чутливості *S. epidermidis* до бензилпеніциліну. МІК музейного штаму становила 0,23 мкг/мл, що відповідало рівню чутливості 19% клінічно ізольованих штамів.

Ідентично результатам дискодифузійного методу, мікрометодом серійних розведень підтверджено резистентність штамів до ампіциліну. Інгібуючий ефект зафіксовано за концентрації 0,48 мкг/мл (щодо 11% штамів), подвоєння концентрації до 0,98 мкг/мл збільшувало частку чутливих штамів до 33%. Загальна картина ефективності ампіциліну співставна з бензилпеніциліном. Значення медіани, МІК₅₀ та МІК₉₀ не були встановлені у дослідженнях. У порівнянні з референтним штамом *S. epidermidis* ATCC 12228, середня МІК якого становила $0,35 \pm 0,16$ мкг/мл, усі клінічні ізоляти характеризувались меншою чутливістю до антибіотика. Отриманий результат підтверджує широку поширеність β -лактамаз серед клінічних представників епідермального стафілококу.

Цефазолін демонстрував помірну антибактеріальну активність щодо *S. epidermidis*. Початкове пригнічення спостерігалось за концентрації 0,98 мкг/мл (11% штамів). Концентрація 3,90 мкг/мл підвищувала частку чутливих штамів до 42%. Досягнення МІК₅₀ позначки не зафіксовано у дослідженому діапазоні концентрацій, а значення медіани та МІК₉₀ значно перевищує 15,63 мкг/мл. У порівнянні з референтним штамом ATCC 12228, для якого середнє значення МІК становило $1,56 \pm 0,24$ мкг/мл, встановлено, що 58%

клінічно ізолюваних штамів демонстрували рівень резистентності, співставний або вищий за референтне значення (рис. 3.8).

Ванкоміцин показав найбільш виражену антибактеріальну активність. Уже за концентрації 0,48 мкг/мл було пригнічено ріст 25% штамів. Підвищення концентрації до 0,98 мкг/мл інгібувало 44% штамів, а концентрація 1,95 мкг/мл забезпечувала пригнічення 72% досліджуваних штамів. Концентрація 3,90 мкг/мл інгібувала ще 14% штамів, досягаючи загальної частки чутливих до ванкоміцину штамів – 86%. Згідно з EUCAST, граничні значення МІК ванкоміцину для *S. epidermidis* становлять 4 мкг/мл, отже, 14% штамів продемонстрували резистентність до цього глікопептидного антибіотика.

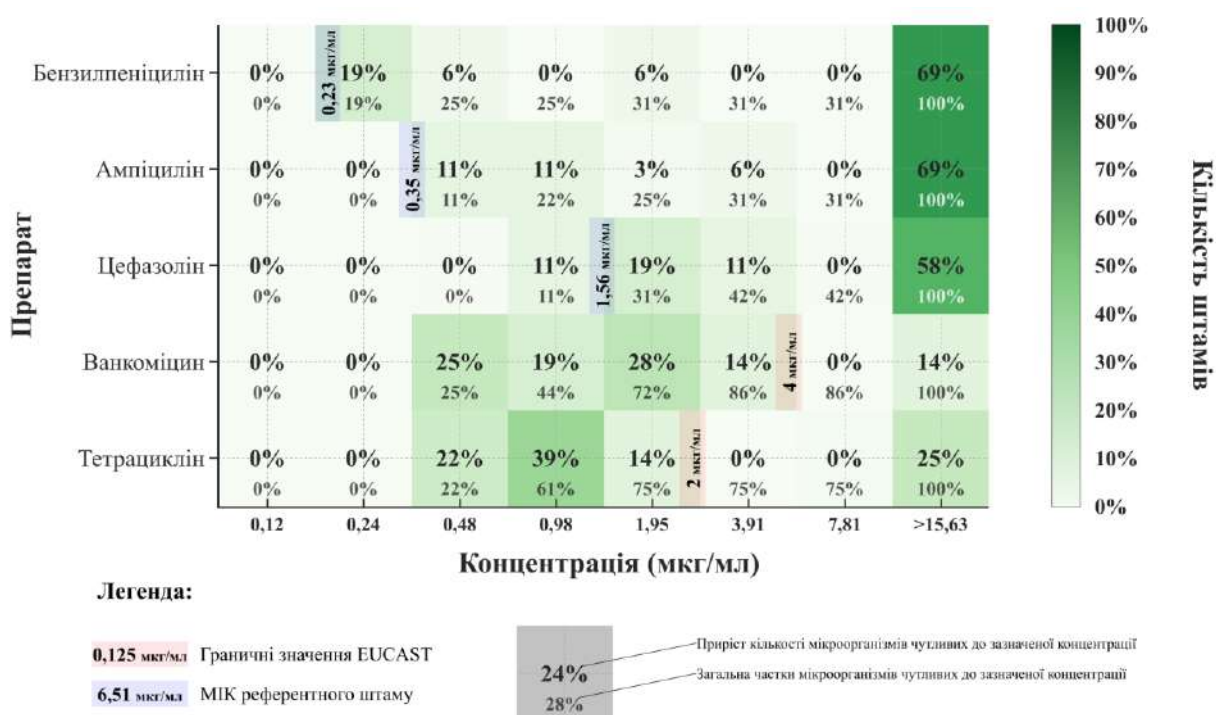


Рис. 3.8. Чутливість клінічних ізолятів *S. epidermidis* (n=36) до антибіотиків (метод серійних розведень)

Тетрациклін мав виражену антибактеріальну активність. Антистафілококовий ефект відзначався за концентрації 0,48 мкг/мл, чутливість було визначено у 22% штамів. Суттєве зростання кількості чутливих штамів (до 61%) відзначено при концентрації 0,98 мкг/мл, а 75% – при концентрації 1,95 мкг/мл. Медіана МІК та МІК₅₀ тетрацикліну щодо клінічних ізолятів становила

0,98 мкг/мг. Пригнічення всієї вибірки штамів визначено за концентраціями, що перевищували 15,63 мкг/мл. Враховуючи граничне значення МІК EUCAST для тетрацикліну (1 мкг/мл), можна зробити висновок, що більшість клінічних штамів (61%) була чутливою до препарату в межах граничних концентрацій. Решта штамів (39%) виявила резистентність, перевищуючи рекомендоване значення.

Вивчення чутливості штаму *Ent. faecalis* ATCC 29212 засвідчило, що ампіцилін індукував формування зон затримки росту діаметром 11–15 мм у 12% клінічних ізолятів, тоді як зони діаметром 16–20 мм спостерігалися у 36% досліджених штамів. Найбільшу частку становили штами з діаметром зон затримки росту в діапазоні 21–25 мм – 48%. Зони діаметром 26–30 мм спостерігались лише у 4% штамів. Відповідно до рекомендацій EUCAST, граничне значення для ампіциліну щодо ентерококів становить ≥ 17 мм, таким чином, до чутливих можна віднести 88% досліджених ізолятів, а 12% мали проміжну (знижену) чутливість (рис. 3.9).



Рис. 3.9. Чутливість клінічних ізолятів *Ent. faecalis* (n=25) до антибіотиків (диско-дифузійний метод)

До ванкоміцину 44% штамів мали зони пригнічення росту в межах 11–15 мм, тоді як решта 56% утворювали зони діаметром 16–20 мм. Відповідно до

рекомендацій EUCAST, усі штами характеризувались чутливістю до цього глікопептидного антибіотику.

Щодо тетрацикліну більшість штамів продукували зони затримки росту 16-20 мм (36%), ще 32% штамів формували зони діаметром 11-15 мм. По 16% штамів мали зони в межах 21-30 мм відповідно. Граничне значення EUCAST для тетрацикліну (≥ 19 мм) дозволяє визначити, що лише 32% штамів були чутливими до цього антибіотику, тоді як 68% мали проміжну чутливість або резистентність.

Антимікробна активність ампіциліну щодо ентерококів методом серійних розведень проявилась у концентрації 0,24 мкг/мл, при якій спостерігалось інгібування 4% штамів. При концентрації 0,48 мкг/мл суттєве пригнічення вибірки досягало 52% штамів, а в концентрації 0,97 мкг/мл – 92% штамів. Повне пригнічення вибірки визначено у концентрації, що перевищує значення 31,25 мкг/мл. Граничні значення EUCAST для ампіциліну (4 мкг/мл) свідчать про те, що 92% клінічних ізолятів були чутливими до цього препарату.

Ванкоміцин виявив найвищу антибактеріальну активність. Початкове пригнічення росту (32%) було досягнуто вже за концентрації 0,48 мкг/мл. При підвищенні концентрації до 0,97 мкг/мл сумарне пригнічення зросло до 76%, а при 1,95 мкг/мл – до 96%. Концентрація 3,9 мкг/мл забезпечила 100% інгібування всіх досліджених клінічних штамів, що є значно нижчим показником за граничні значення EUCAST для ванкоміцину щодо *Ent. faecalis* ATCC 29212 (4 мкг/мл). Це свідчить про 100% чутливість клінічних штамів до ванкоміцину. Крім того, медіана значень МІК ванкоміцину та МІК₅₀ серед досліджених ізолятів становила 0,97 мкг/мл, а МІК₉₀ – 1,95 мкг/мл, що підтверджує ефективність препарату навіть для більшості резистентних штамів.

Тетрациклін у концентрації 0,12 мкг/мл пригнічував ріст 4% штамів, а значне підвищення концентрації до 0,97 мкг/мл збільшувало сумарну вибірку до 28% штамів. При подальшому підвищенні концентрацій антибіотику (3,9–7,81 мкг/мл) чутливість була виявлена у 48% штамів. В концентрації 31,25 мкг/мл одночасно визначено медіану МІК тетрацикліну, МІК₅₀ та МІК₉₀ – 31,25 мкг/мл.

Зважаючи на відсутність офіційних граничних значень EUCAST для ампіциліну, використовувалися результати референтного штаму *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, МІК якого становить $0,48 \pm 0,14$ мкг/мл. Відповідно до цього результату, більшість клінічних штамів (96%) мали рівень чутливості нижчий або співставний із референтним штамом (рис. 3.10).

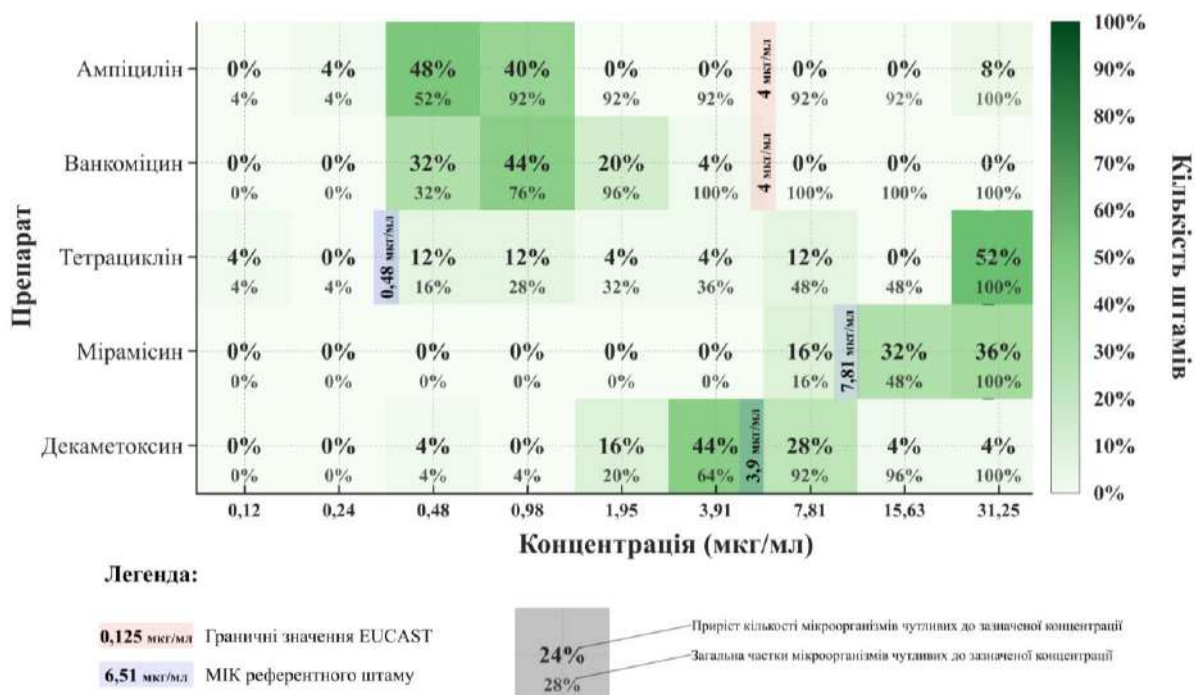


Рис. 3.10. Чутливість клінічних ізолятів *Ent. faecalis* (n=25) до антибіотиків (метод серійних розведень)

3.3 Визначення фенотипових ознак резистентності стафілококів до метициліну

Дискодифузійний метод із цефокситином є ключовим етапом фенотипового скринінгу наявності гену *tesA*, що кодує *PBP2a*, видозміненого пеніцилінзв'язуючого білка, що зумовлює стійкість до β -лактамних антибіотиків [196]. Результати візуалізовано на рисинку 3.11.

Дослідження показало, що з 83 досліджуваних штамів *S. aureus* зони затримки росту діаметром до 22 мм, спостерігались у 36 штамів. Тобто, частка MRSA складала 43%, в свою чергу, чутливість до цефокситину визначена у 57% штамів.

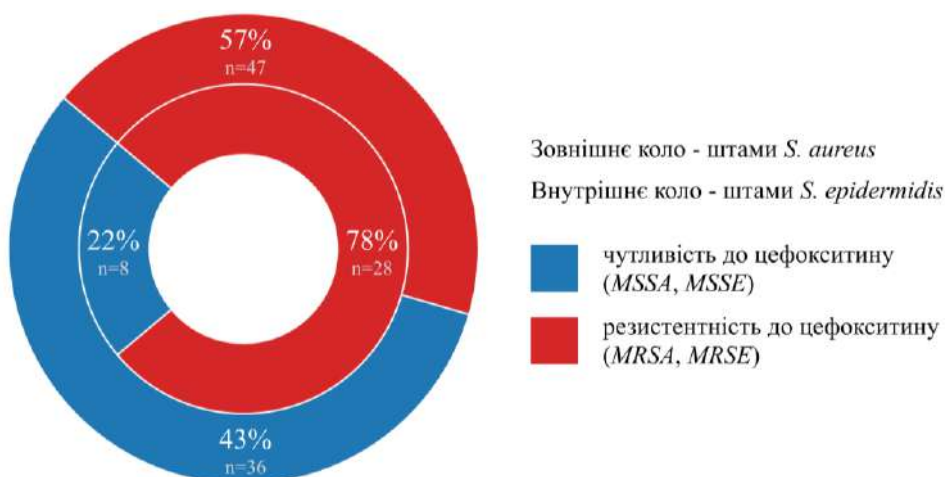


Рис. 3.11. Результати фенотипового скринінгу наявності гену *mecA* серед досліджуваної вибірки стафілококів дискодифузійним методом із цефокситином (n=119)

Серед 36 штамів *S. epidermidis* чутливість до цефокситину спостерігалась у 8 штамів (22%), що свідчить про відсутність у них гену *mecA* та належність до групи *MSSE*. Натомість 28 штамів (78%) продемонстрували резистентність до цефокситину, що вказує формування фенотипу *MRSE*.

3.4 Визначення чутливості тест-мікроорганізмів до антисептичних препаратів порівняння

У медичній практиці антисептичні засоби широко впроваджуються як ефективний елемент системи протимікробного контролю, що забезпечує профілактику та лікування інфекційних патологій [152]. Четвертинні амонієві сполуки широко застосовуються у медицині та фармації антисептиками завдяки їх вираженій антимікробній активності [197].

Антимікробний ефект антисептичних препаратів щодо референтних штамів бактерій. Отримані результати свідчать, що середнє значення МІК мірамістину щодо *S. aureus* ATCC 25923 становило $3,90 \pm 1,07$ мкг/мл. В свою чергу, для *S. aureus* ATCC 29123 значення МІК становило $12,50 \pm 1,92$ мкг/мл, що демонструє знижену чутливість даного штаму до препарату.

Середнє значення МІК мірамістину для референтного штаму

S. epidermidis ATCC 12228 становило $3,51 \pm 0,39$ мкг/мл, що свідчить про виражену антимікробну активність препарату щодо коагулазонегативних стафілококів. У випадку *Ent. faecalis* ATCC 29212 відповідний показник дорівнював $6,25 \pm 0,96$ мкг/мл, що може вказувати на відносно нижчу чутливість даного виду до мірамістину.

Активність декаметоксину щодо *S. aureus* ATCC 25923 спостерігалась у концентрації $0,78 \pm 0,32$ мкг/мл, проте МІК щодо *S. aureus* ATCC 29123 зростала до $5,46 \pm 0,96$ мкг/мл, що відображає неоднотипний ефект препарату на різні штами стафілококів. Для *S. epidermidis* ATCC 12228 середнє значення МІК декаметоксину становило $0,68 \pm 0,12$ мкг/мл, що вказує на його високу активність щодо коагулазонегативних стафілококів. Ентерококи продемонстрували меншу чутливість до антисептичного засобу, середнє значення МІК для *Ent. faecalis* ATCC 29212 дорівнювало $3,90 \pm 1,07$ мкг/мл.

Антимікробний ефект антисептичних препаратів щодо клінічних штамів бактерій. Відповідно до результатів методу серійних розведень мірамістин проявив помірну антибактеріальну активність. Інгібувальний ефект щодо золотистого стафілококу спостерігався при 3,9 мкг/мл, коли чутливими були 7% штамів, при 7,81 мкг/мл – 20%. Повне пригнічення всіх штамів спостерігалось лише при концентрації $\geq 15,63$ мкг/мл (рис.3.12).

Декаметоксин проявив вищу активність щодо ізолятів *S. aureus*. Початкове пригнічення (5%) спостерігалось вже при концентрації 1,95 мкг/мл. Значне зростання активності спостерігалось при 3,9 мкг/мл, коли інгібувалось 41% штамів. При концентрації 7,81 мкг/мл чутливими були 87% ізолятів, а при 15,63 мкг/мл досягалось 100% пригнічення. Медіанне значення МІК декаметоксину відповідало концентрації 7,81 мкг/мл, що збігалось з показником МІК₅₀. Значення МІК₉₀ було зафіксовано при підвищенні концентрації препарату вдвічі – до 15,63 мкг/мл.

Результати дослідження антимікробної активності мірамістину щодо клінічних ізолятів епідермального стафілококу свідчать, що при концентрації 3,9

мкг/мл частка чутливих штамів становила 8%. Підвищення концентрації декаметоксину до 7,81 мкг/мл супроводжувалося зростанням антимікробної ефективності до 36% ізолятів. Значення МІК₅₀ та МІК₉₀ були зафіксовані при концентраціях, що перевищували 15,63 мкг/мл. Дані свідчать про необхідність високих концентрацій мірамістину для досягнення антимікробного ефекту, тоді як у низьких концентраціях його активність була мінімальною.

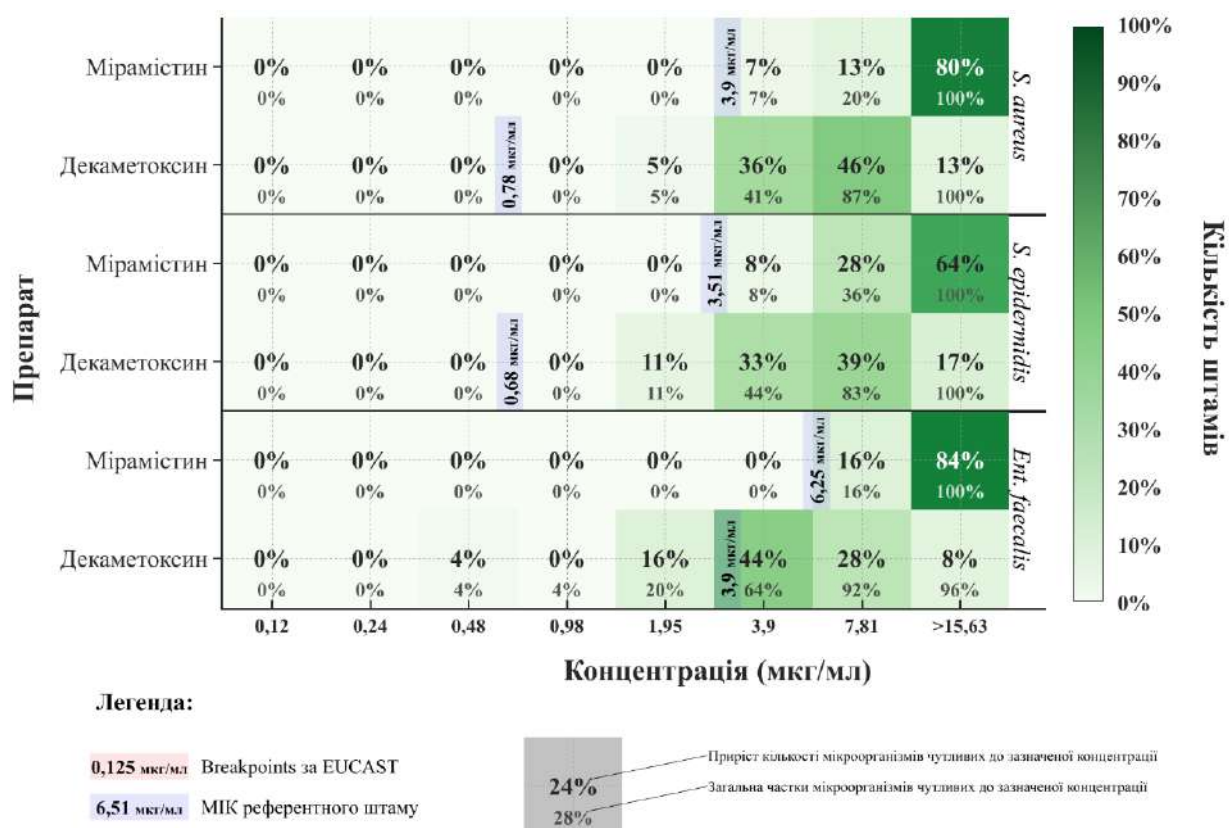


Рис. 3.12. Антимікробні властивості антисептичних препаратів (мірамістину та декаметоксину) щодо клінічних штамів (*S. aureus* (n=83), *S. epidermidis* (n=36), *Ent. faecalis* (n=25))

Інгібувальний ефект декаметоксину спостерігався при концентрації 1,95 мкг/мл щодо 11% ізолятів. Збільшення концентрації до 3,9 мкг/мл сприяло підвищенню кількості чутливих штамів до 44%, а концентрація 7,81 мкг/мл інгібувала 83% ізолятів і відповідала медіанному значенню МІК декаметоксину, а також показникам МІК₅₀ та МІК₉₀.

Протимікробна дія мірамістину щодо клінічних штамів ентерококів спостерігалась при концентрації 7,81 мкг/мл інгібуючи 16% штамів, а при 15,63

мкг/мл чутливими виявилися 32% ізолятів. Медіанне значення та MIK_{50} відповідали концентрації 31,25 мкг/мл, а MIK_{90} – 62,50 мкг/мл.

Декаметоксин виявив антимікробну активність при нижчих концентраціях, порівняно з мірамістином. Уже при 0,48 мкг/мл спостерігалось пригнічення 4% штамів. При підвищенні концентрації до 1,95 мкг/мл чутливими були 20% ізолятів, а при 3,9 мкг/мл цей показник зріс до 64%, визначаючи значення медіани та MIK_{50} . Пригнічення 90% штамів спостерігалось за концентрації 10,94 мкг/мл.

3.5 Вивчення ступеню антибактеріальних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо клінічних штамів

Протимікробні властивості четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо клінічних ізолятів S. aureus. Результати вивчення арил аміноспиртів продемонструвано на рисунку 3.13. Сполука Кс1 (1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-бензил діетиламіно)-2-пропанол хлорид) виявила високу антистафілококову активність. Інгібуючий ефект спостерігався у концентрації 0,12 мкг/мл. Подвоєння концентрації інгібувало ще 5% штамів, доводячи загальну ефективність до 6%. У концентрації 0,98 мкг/мл пригнічувалось 40% клінічних ізолятів. Частка чутливих штамів при концентрації 1,95 мкг/мл становила 66%, а при 3,9 мкг/мл – 86%. За концентрації 7,81 мкг/мл ефективність становила 96%, а 100% чутливість спостерігалася при концентрації 15,63 мкг/мл, що значно перевершувало результати ампіциліну та бензилпеніциліну, наближаючись до ефективності ванкоміцину. Медіана MIK була на рівні 1,95 мкг/мл, що відповідало ефективності тетрацикліну (MIK_{50} – 1,95 мкг/мл) і суттєво перевищувало β -лактамі антибіотики. Важливо зазначити, що досліджувані клінічні штами продемонстрували подібний рівень чутливості з референтним *S. aureus* ATCC 25923, у якого середнє значення MIK становило $1,56 \pm 0,24$ мкг/мл. Порівняно з мірамістином, Кс1 проявляла значно кращу активність, оскільки мірамістин демонстрував лише 16% інгібування при

7,81 мкг/мл. Декаметоксин починав діяти лише з 0,48 мкг/мл, що також суттєво поступалося активності Кс1.

Для речовини Кс2 (1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-бензил 4-метилпіперидиній)-2-пропанол хлорид) антимікробну активність зафіксовано у 1% ізолятів при концентрації 0,24 мкг/мл, зі зростанням до 12% при підвищенні концентрації до 0,48 мкг/мл. Наступне розведення сполуки пригнічувало 39% штамів. Частка чутливих до досліджуваного арилациклічного аміноспирту штамів у концентрації 1,95 мкг/мл становила 75%, а при 3,9 мкг/мл – 89%. При концентрації 7,81 мкг/мл знищувалось 98% штамів, повне пригнічення вибірки спостерігалось при концентрації 15,63 мкг/мл. Медіана МІК для Кс2 становила 1,95 мкг/мл, що перевищувало показники ампіциліну, бензилпеніциліну та було близьке до тетрацикліну, але поступалося ванкоміцину. Порівнюючи отримані результати з антисептиками, можна відзначити суттєву перевагу Кс2 над мірамістином, оскільки останній демонстрував пригнічення лише 16% штамів при 7,81 мкг/мл і 32% при 15,63 мкг/мл. Декаметоксин поступався Кс2 в концентраційному діапазоні 0,48–7,81 мкг/мл, оскільки його максимальна активність досягала 96% лише при 31,25 мкг/мл. У порівнянні з референтним штамом *S. aureus* ATCC 25923, у якого середнє значення МІК становило $2,14 \pm 0,48$ мкг/мл, сполука проявила схожий рівень ефективності.

Речовина Кс3 (1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-бензил N-метил циклогексаламіно)-2-пропанол хлорид) продемонструвала високу антибактеріальну ефективність, зокрема, при концентрації 0,98 мкг/мл чутливими виявились 47% штамів. При концентрації 1,95 мкг/мл цей показник становив 81%, а при 3,9 мкг/мл – 88%. 95% штамів пригнічувалося при концентрації 7,81 мкг/мл, досягаючи 100% при концентрації 15,63 мкг/мл. Ефективність Кс3 була значно вищою за бензилпеніцилін, ампіцилін та цефазолін і на рівні або навіть вище тетрацикліну. Узагальнена ефективна концентрація становила 1,95 мкг/мл, що відповідає чутливості референтного штаму. У порівнянні з антисептиками, Кс3 значно перевершувала мірамістин,

оскільки останній показував лише 52% інгібування при 31,25 мкг/мл. Декаметоксин мав слабший ефект у концентраціях 1,95–7,81 мкг/мл, не перевищуючи 92% інгібування, тоді як Кс3 при 7,81 мкг/мл вже забезпечувала 95% ефективність.

Речовина Кс4 (1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-бензил гексаметиленіміній)-2-пропанол хлорид) характеризувалась високим рівнем активності. У концентрації 0,24 мкг/мл сполука інгібувала одразу 8% тест-мікроорганізмів. При концентрації 0,98 мкг/мл було пригнічено 53% штамів, а при 1,95 мкг/мл – 67%. При концентрації 3,9 мкг/мл чутливість становила вже 89%, а при 7,81 мкг/мл – 95%. Сполука мала суттєво вищу активність порівняно з ампіциліном, бензилпеніциліном та цефазоліном, наближаючись за активністю до ванкоміцину та перевищуючи показники тетрацикліну. Узагальнена ефективна концентрація становила 0,98 мкг/мл, що відповідало і значенню МІК₅₀. Порівнюючи Кс4 з мірамістином, слід зазначити, що останній демонстрував активність лише при 15,63 мкг/мл, пригнічуючи 32% ізолятів, а декаметоксин поступався Кс4 у діапазоні 1,95–3,9 мкг/мл, оскільки його активність у цих концентраціях не перевищувала 64%, тоді як Кс4 демонструвала значно вищі показники пригнічення.

Речовина Кс15 (КС-15. 1-(2,4-дитретбутилфенокси-1-етокси)-3-(N-бензил піролідиній)-2-пропанол хлорид) продемонструвала стабільну антибактеріальну дію, інгібуючи 4% мікроорганізмів в концентрації 0,24 мкг/мл. Концентрація 0,98 мкг/мл була ефективною щодо 51% штамів, дане розведення відповідало значенню медіани МІК. Підвищення концентрації до 1,95 мкг/мл збільшувало кількість чутливих штамів до 69%, а при 3,9 мкг/мл спостерігалось 93% інгібування. Отримані результати свідчать, що ця сполука значно перевищувала ефективність β-лактамних антибіотиків (ампіциліну, бензилпеніциліну, цефазоліну), поступаючись лише ванкоміцину. Порівняно з антисептиками, дана речовина мала суттєву перевагу над мірамістином, який демонстрував лише 16% інгібування при 7,81 мкг/мл та 32% при 15,63 мкг/мл.

Декаметоксин мав порівнянну ефективність лише у концентраціях $\geq 7,81$ мкг/мл, тоді як Кс15 інгібувала більшість штамів вже при 1,95 мкг/мл.

Речовина Кс22 (1-(2,4-дитретбутилфенокси-1-етокси)-3-(N-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанол хлорид) продемонструвала найвищу антибактеріальну активність серед усіх досліджених речовин. У концентрації 0,98 мкг/мл чутливими були 35% штамів, при 1,95 мкг/мл ефективність зростала до 64%, а при 3,9 мкг/мл – 88%. Концентрація 7,81 мкг/мл інгібувала 96% ізолятів. Антистафілококова активність цієї речовини суттєво перевищувала бензилпеніцилін, ампіцилін і цефазолін та була порівняною з тетрацикліном і ванкоміцином. При співставленні результатів з антисептиками, можна відзначити, що дана сполука мала суттєву перевагу над мірамістином, який досягав лише 52% інгібування при 31,25 мкг/мл. Декаметоксин у концентраціях 1,95–3,9 мкг/мл показував нижчу активність (максимум 64%), тоді як Кс22 при цих концентраціях уже пригнічувала 88% ізолятів.

Речовина Кр10 (1-(2,4-дитретбутил фенокси)-3-N-(4-CH₃-бензил)-піролідиній)-2-пропанол хлорид) мала помірну антибактеріальну активність. У концентрації 0,98 мкг/мл вона пригнічувала 23% штамів, а при 1,95 мкг/мл – 60%. Концентрація 3,9 мкг/мл продемонструвала інгібуючий ефект щодо 82% ізолятів, що значно перевершувало активність бензилпеніциліну та ампіциліну. Мірамістин демонстрував значно нижчі показники, оскільки лише при 15,63 мкг/мл забезпечував 32% інгібування. Декаметоксин показував схожу активність лише у концентраціях $\geq 7,81$ мкг/мл, що свідчить про кращу ефективність Кр10 у низьких розведеннях.

Речовина Кр16 (1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-бензилгексаметиленіміній)-2-пропанол хлорид) виявила високу антимікробну активність, інгібуючи 2% ізолятів вже при концентрації 0,12 мкг/мл. Значення MIK_{50} становило 1,95 мкг/мл, за якого було пригнічено ріст 63% штамів, тоді як при концентрації 3,9 мкг/мл інгібування сягало 88%. Отримані результати свідчать про те, що ефективність даної сполуки істотно перевищувала активність традиційних β -лактамних антибіотиків. У порівнянні з мірамістином, Кр16

демонструвала значно вищу антимікробну активність у концентраційному діапазоні 1,95–3,9 мкг/мл, тоді як для мірамістину пригнічення росту спостерігалось лише при 7,81 мкг/мл. Декаметоксин, у свою чергу, в зазначеному діапазоні концентрацій забезпечував інгібування лише 64% штамів, що було нижчим порівняно з 88% для Кр16.

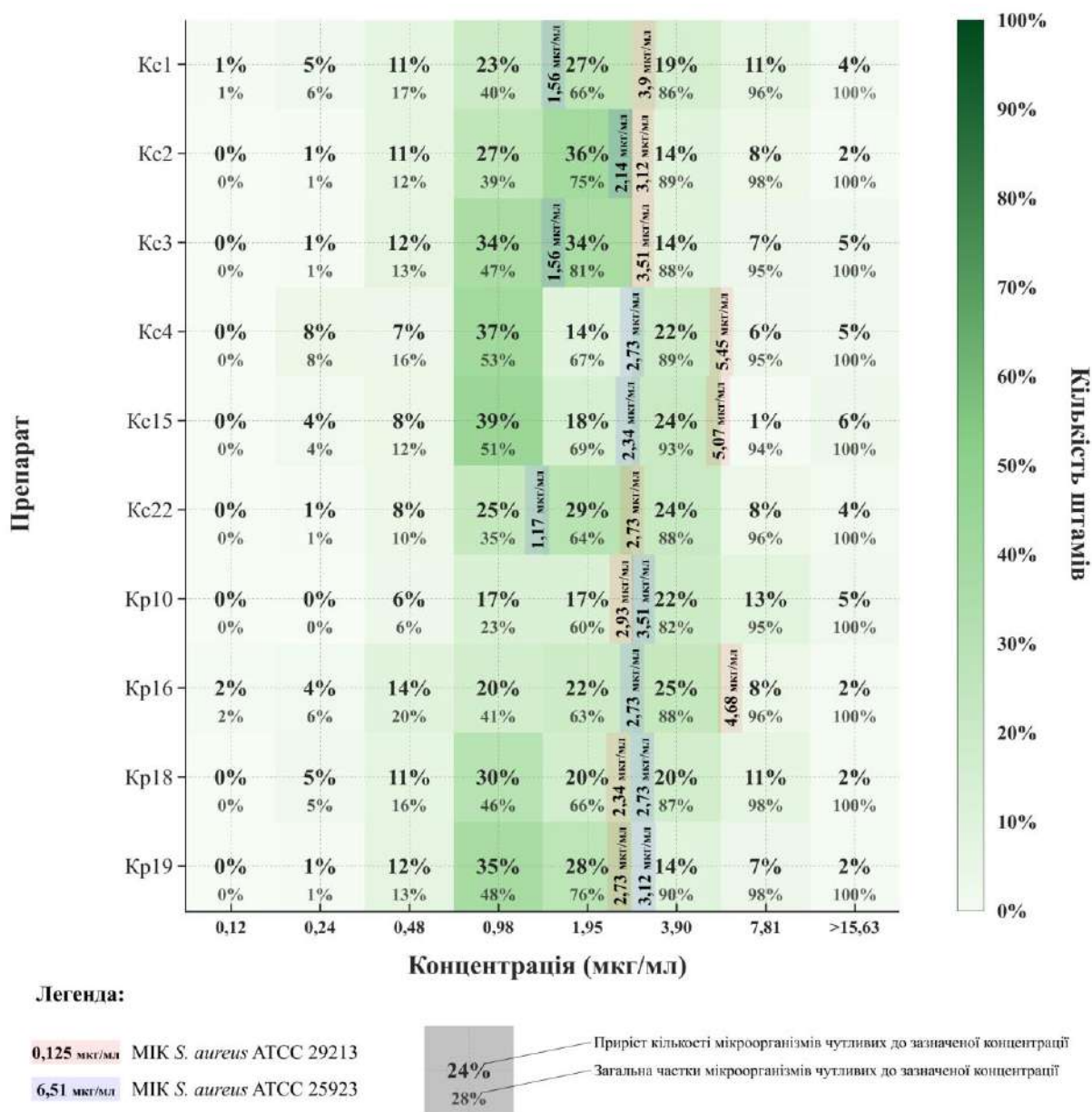


Рис. 3.13. Чутливість клінічних ізолятів *S. aureus* (n=83) до похідних четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію (метод серійних розведень)

Речовина Кр18 (1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-(N-(4-Ф бензил)диметиламіно)-2-пропанол хлорид) продемонструвала високу антибактеріальну активність. Антистафілококовий ефект зафіксовано щодо 5%

штамів у концентрації 0,24 мкг/мл. При 0,98 мкг/мл чутливими були 46% штамів, при 1,95 мкг/мл – 66%, а при 3,9 мкг/мл – 87%. Активність цієї сполуки перевищувала ефективність β -лактамних антибіотиків і була наближеною до тетрацикліну. Порівнюючи з антисептиками, слід зазначити, що дана речовина мала суттєву перевагу над мірамістином, оскільки останній демонстрував лише 52% інгібування при 31,25 мкг/мл. Декаметоксин мав нижчу активність у концентраціях 1,95–3,9 мкг/мл, не перевищуючи 64% інгібування, тоді як Кр18 при цих концентраціях вже демонструвала 87% ефективність.

Протистафілококова активність сполуки Кр19 (1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-(4-метил бензил)диметиламіно)-2-пропанол хлорид) зафіксовано в 12 розведенні (0,24 мкг/мл). У концентрації 0,98 мкг/мл антимікробна активність визначена ще для 35% штамів, доводячи загальний рівень чутливості до 48%. Концентрація 1,95 мкг/мл була ефективною уже проти 76%, а при 3,9 мкг/мл – 90%, що перевищувало ефективність усіх антибіотиків, крім ванкоміцину. Порівняно з мірамістином, дана речовина показувала значно кращу ефективність, оскільки мірамістин лише при 31,25 мкг/мл демонстрував 52% інгібування. Декаметоксин поступався Кр19 у концентраціях 1,95–3,9 мкг/мл, оскільки його активність не перевищувала 64%, тоді як Кр19 інгібувала 90% мікроорганізмів у цьому діапазоні.

Протимікробні властивості четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо клінічних ізолятів S. epidermidis. Досліджувані арил ациклічні аміноспирти продемонстрували високу ефективність щодо клінічних ізолятів *S. epidermidis*. Протимікробний ефект зафіксовано при концентрації 0,24 мкг/мл для 6% штамів. У концентрації 0,98 мкг/мл кількість чутливих ізолятів зросла до 53%, а при 1,95 мкг/мл – до 83%. Концентрації 3,9 мкг/мл і вище забезпечували пригнічення понад 94% штамів. Медіана МІК та МІК₅₀ відповідали концентрації 0,98 мкг/мл, а МІК₉₀ – 3,90 мкг/мл, що значно перевищувало результати ампіциліну, бензилпеніциліну та цефазоліну і було співставним з ванкоміцином та тетрацикліном. Важливо, що медіанне значення

МІК та МІК₅₀ була нижчим за значення МІК *S. aureus* ATCC 25923 (1,56±0,24 мкг/мл). Порівняно з антисептиками, Кс1 мала значно кращу активність, ніж мірамістин, який при концентрації 7,81 мкг/мл демонстрував пригнічення лише 28% ізолятів. Декаметоксин поступався у концентраційному діапазоні 0,48–3,9 мкг/мл, забезпечуючи інгібування менше половини штамів.

Сполука Кс2 продемонструвала високу антибактеріальну активність. Концентрації 0,24 та 0,48 мкг/мл інгібували 6 та 22% штамів відповідно. У концентрації 0,98 мкг/мл спостерігалось пригнічення 61% штамів, а при підвищенні концентрації до 7,81 мкг/мл цей показник зростав до 81%. Медіана МІК для Кс2 становила 0,98 мкг/мл, що відповідає значенню МІК₅₀ (0,98 мкг/мл), а МІК₉₀ складала 15,63 мкг/мл. За своїми показниками речовина була значно ефективнішою за бензилпеніцилін, ампіцилін і цефазолін та відповідала показникам тетрацикліну. Порівнюючи активність цієї сполуки з антисептиками, можна констатувати її перевагу над мірамістином, оскільки останній мав низьку активність при концентраціях до 7,81 мкг/мл та досягав 100% інгібування лише при концентрації $\geq 31,25$ мкг/мл. Декаметоксин поступався Кс2 у діапазоні 0,48–7,81 мкг/мл, оскільки максимальне інгібування не перевищувало 44%.

Сполука Кс3 показала високу ефективність щодо клінічних ізолятів *S. epidermidis*, забезпечуючи пригнічення 53% штамів уже за концентрації 0,98 мкг/мл, а при 1,95 мкг/мл – 69%. Повна ефективність досягалася при концентрації $\geq 15,63$ мкг/мл. Узагальнена ефективна концентрація (медіана) складала 0,98 мкг/мл, що співпадало з МІК₅₀ (0,98 мкг/мл), тоді як МІК₉₀ дорівнювала 15,63 мкг/мл. Порівняно з антибіотиками, сполука мала суттєво вищу активність, ніж β -лактамі антибіотики та була співставною з тетрацикліном і ванкоміцином. У порівнянні з мірамістином, Кс3 значно перевершувала його, оскільки останній демонстрував лише 32% інгібування при концентрації 15,63 мкг/мл. Декаметоксин мав слабший ефект у концентраціях 1,95–7,81 мкг/мл, інгібуючи лише до 44%.

Сполука Кс4 мала високий рівень антибактеріальної активності, вже у концентрації 0,48 мкг/мл пригнічуючи 36% штамів. При концентрації 0,98

мкг/мл ефективність зростала до 61%, а при 3,9 мкг/мл – до 83%. Узагальнена ефективна концентрація та MIK_{50} становили 0,98 мкг/мл, а MIK_{90} – 7,81 мкг/мл. За антибактеріальними характеристиками дана сполука була значно ефективніша за бензилпеніцилін, ампіцилін і цефазолін, демонструючи співставну активність із ванкоміцином та тетрацикліном. Сполука значно перевершувала мірамістин та декаметоксин в аналогічних концентраціях.

Речовина Кс15 у концентрації 0,24 мкг/мл інгібувала 8% штамів, а концентрація 0,48 мкг/мл була визначена як MIK для 17% штамів, доводячи сумарне значення чутливих мікроорганізмів до 25%. Зростання до позначки в 44% спостерігалось при концентрації 0,98 мкг/мл, а при концентрації 3,9 мкг/мл чутливими до 1-(2,4-дитретбутилфенокси-1-етокси)-3-(N-бензил піролідиній)-2-пропанол хлориду було 89% штамів. Медіана та MIK_{50} становили 1,95 мкг/мл, MIK_{90} – 7,81 мкг/мл. За цими показниками сполука суттєво перевершувала β -лактамі антибіотики і була співставною з тетрацикліном. Порівняно з антисептиками, Кс15 мала суттєво кращі результати в нижчих концентраціях, ніж мірамістин та декаметоксин.

Сполука Кс22 продемонструвала помірну антибактеріальну активність. При концентрації 0,98 мкг/мл чутливими були 31% ізолятів, при збільшенні концентрації до 1,95 мкг/мл частка чутливих штамів зростала до 56%. Подальше підвищення концентрації до 7,81 мкг/мл забезпечувало чутливість 89%. Медіана становила 1,95 мкг/мл і відповідала значенню MIK_{50} , MIK_{90} визначено за концентрації 15,63 мкг/мл. Активність Кс22 була значно вищою порівняно з бензилпеніциліном, ампіциліном та цефазоліном, водночас знаходячись на рівні активності тетрацикліну і поступаючись лише ванкоміцину. Порівнюючи Кс22 з антисептиками, необхідно зазначити її перевагу над мірамістином, активність якого спостерігалась лише з 7,81 мкг/мл, а декаметоксин у цьому концентраційному діапазоні не поступався досліджуваній сполуці.

Речовина Кр10 при концентрації 0,24 продемонструвала ефективність щодо 11% штамів, покращуючи показники до 36% при подвоєнні концентрації. Антимікробний ефект щодо 47% ізолятів спостерігався при концентрації 0,98

мкг/мл. Підвищення концентрації до 1,95 мкг/мл спричиняло загибель 58% мікроорганізмів, а до 3,9 мкг/мл – 81%. Узагальнені значення для цієї сполуки становили: медіана та MIK_{50} – 1,95 мкг/мл, MIK_{90} – 15,63 мкг/мл. Порівняно з антибіотиками, ця речовина мала вищу ефективність, ніж бензилпеніцилін, ампіцилін і цефазолін. При порівнянні з антисептиками сполука показувала кращу активність, оскільки мірамістин забезпечував інгібування лише 32% ізолятів при 15,63 мкг/мл, а декаметоксин поступався ефективністю в концентраціях 0,98–3,9 мкг/мл (максимум 44% при 3,9 мкг/мл).

Речовина Кр16 характеризувалася помірною антибактеріальною дією, демонструючи ефективність при концентрації 0,24 мкг/мл (11% штамів). При підвищенні концентрації до 0,98 мкг/мл пригнічувалося 42% ізолятів, а при концентрації 1,95 мкг/мл – 64%. Ця концентрація була визначена як значення медіани та MIK_{50} . За концентрації 3,9 мкг/мл чутливими виявлялися вже 81%.. Речовина мала суттєво вищу активність, ніж бензилпеніцилін, ампіцилін і цефазолін, наближаючись за рівнем активності до ванкоміцину і тетрацикліну. У порівнянні з антисептиками, Кр16 мала суттєву перевагу, оскільки мірамістин та декаметоксин в аналогічних концентраціях продемонстрували значно нижчі показники інгібування (мірамістин 36% при 7,81 мкг/мл, декаметоксин – 44% при 3,9 мкг/мл).

Сполука Кр18 характеризувалася високою антибактеріальною активністю. При концентрації 0,98 мкг/мл було пригнічено 47% штамів, а при концентрації 1,95 мкг/мл кількість зростала до 69%. Подальше підвищення концентрації до 3,9 мкг/мл забезпечувало інгібування вже 75% ізолятів, а 7,81 мкг/мл – 92%. Медіана MIK для Кр18 становила 1,95 мкг/мл, таке ж значення було визначене для MIK_{50} , тоді як MIK_{90} досягала 10,16 мкг/мл. Отримані результати свідчать про значно вищу ефективність цієї сполуки порівняно з ампіциліном, бензилпеніциліном і цефазоліном. Порівнюючи з антисептиками, слід зазначити, що Кр18 мала суттєву перевагу над мірамістином, оскільки останній демонстрував лише 36% інгібування при концентрації 7,81 мкг/мл, а декаметоксин поступався у концентраціях 1,95–7,81 мкг/мл (рис. 3.14).

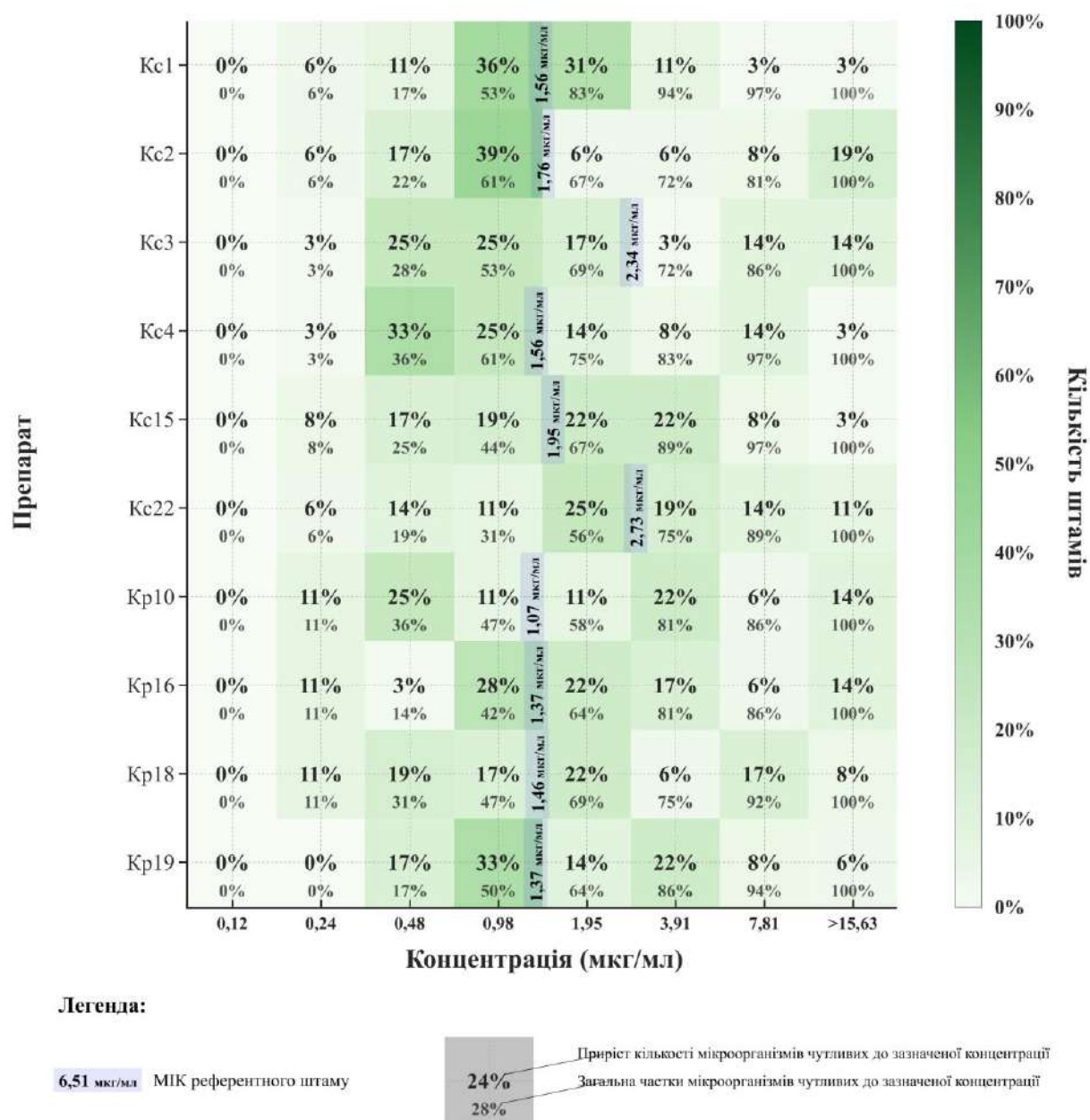


Рис. 3.14. Чутливість клінічних ізолятів *S. epidermidis* (n=36) до похідних четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію (метод серійних розведень)

Сполука Kp19 продемонструвала антимікробний ефект щодо 17% штамів при концентрації 0,48 мкг/мл. МІК для половина вибірки тест мікроорганізмів зафіксована уже при концентрації 0,98 мкг/мл, а концентрація 1,95 мкг/мл інгібувала 64% штамів. Концентрація 3,9 мкг/мл визначалась як МІК для 22% ізолятів, узагальнюючи значення чутливості до 86%. Параметри активності Kp19 характеризувалися медіанним значенням МІК 1,47 мкг/мл, яке збігалось з МІК₅₀, тоді як МІК₉₀ становила 7,81 мкг/мл. Отримані результати перевищували

показники β -лактамних антибіотиків і були співставні з активністю ванкоміцину та тетрацикліну. У порівнянні з іншими антисептиками ця сполука демонструвала суттєво вищі показники пригнічення росту, ніж мірамистин, і була зіставною з декаметоксином, перевершуючи його активністю в низьких концентраціях.

Протимікробні властивості четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо клінічних ізолятів *Ent. faecalis*. Протиентерококова властивість четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію поступалась за рівнем протистафілококовій і подано на рисунку 3.15.

Сполука Кс1 продемонструвала помірну антибактеріальну дію щодо ентерококів. Перші ознаки активності зафіксовано при концентрації 0,97 мкг/мл, пригнічуючи 4% штамів. Підвищення концентрації до 3,9 мкг/мл збільшувало частку чутливих штамів до 56%, а концентрація 15,63 мкг/мл забезпечувала чутливість 88% ізолятів, що відповідало ефективності декаметоксину (96%) і перевищувало активність тетрацикліну (48%). При цьому Кс1 поступалася ампіциліну й ванкоміцину, хоча деякі резистентні до ампіциліну штами були чутливими до сполуки. Узагальнене значення активності становило 3,9 мкг/мл, що було співставно з декаметоксином. MIK_{50} визначена при концентрації 3,9 мкг/мл, тоді як для пригнічення 90% мікроорганізмів фіксувалось при 31,25 мкг/мл.

Сполука Кс2 виявила вищу антибактеріальну ефективність, ніж Кс1. Вже при концентрації 0,97 мкг/мл пригнічувалося 8% штамів, а при 1,95 мкг/мл активність поширювалася на 48% ізолятів. Подальше збільшення концентрації до 3,9 мкг/мл призводило до пригнічення 60% штамів, а 15,63 мкг/мл забезпечувало ефективність на рівні 96%, що відповідало декаметоксину і переважало ефективність тетрацикліну та мірамистину.

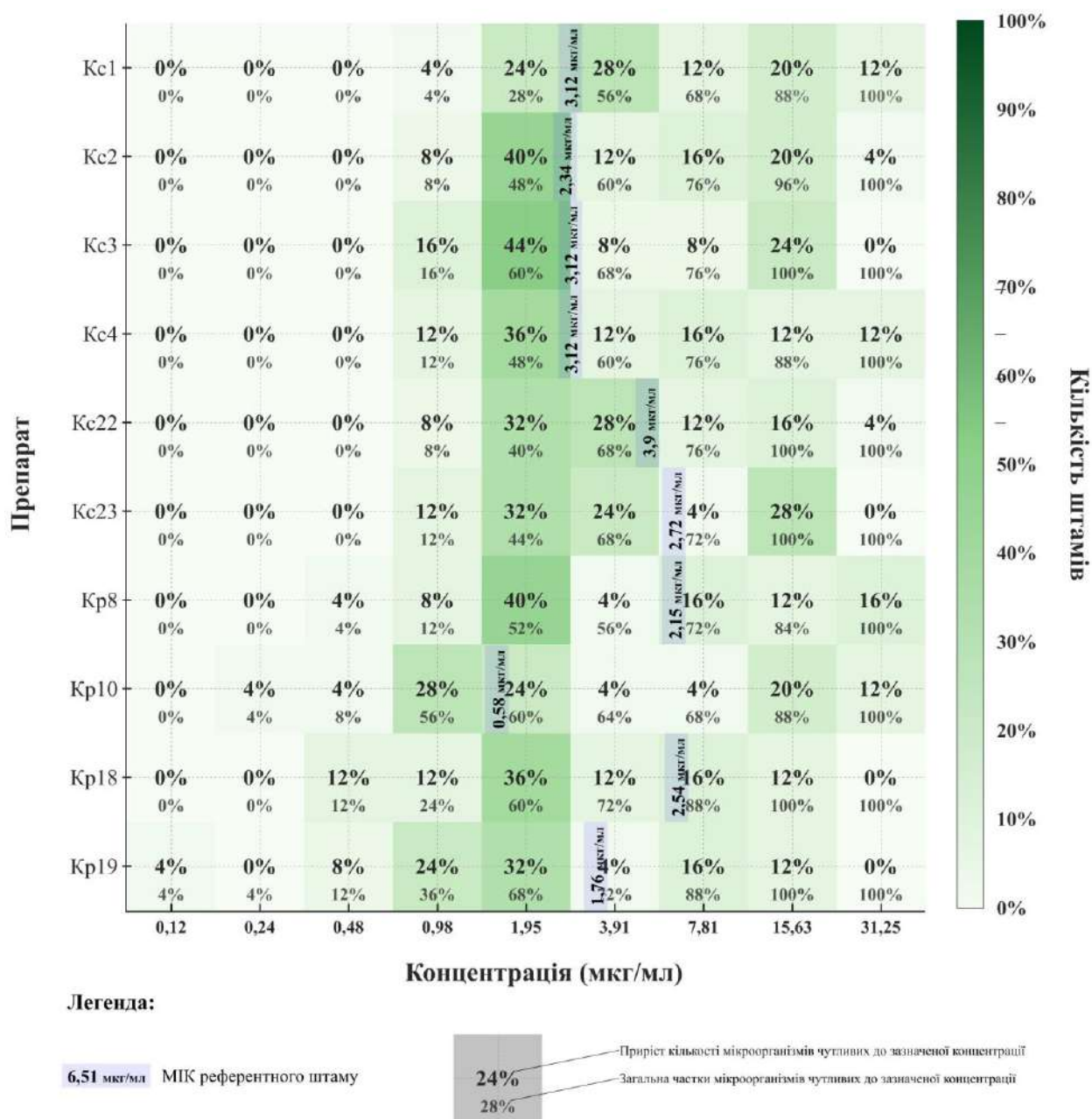


Рис. 3.15. Чутливість клінічних ізолятів *Ent. faecalis* (n=25) до похідних четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію (метод серійних розведень)

Сполука Kc3 показала високий рівень ефективності, пригнічуючи 16% штамів уже при 0,97 мкг/мл. Підвищення концентрації до 1,95 мкг/мл забезпечувало чутливість 60% ізолятів, а при 3,9 мкг/мл – 68%. Повне пригнічення досягалося при 15,63 мкг/мл, що значно перевершувало антисептики. Сполука проявила ефективність і щодо резистентних до ампіциліну та тетрацикліну.

Сполука Кс4 мала рівень активності, подібний до Кс3, демонструючи пригнічення 12% штамів при 0,97 мкг/мл. За концентрації 1,95 мкг/мл активність охоплювала 48% ізолятів, а при 3,9 мкг/мл – 60%. Остання концентрація визначила значення MIK_{50} та медіани. Концентрація 15,63 мкг/мл була ефективною для 88% штамів, що співставно з декаметоксином.

Сполука Кс22 проявила помірну антимікробну дію, пригнічуючи 8% штамів при 0,97 мкг/мл. При збільшенні концентрації до 1,95 мкг/мл активність зростала до 40% штамів, а при 3,9 мкг/мл досягала 68%, що відповідало активності декаметоксину і перевершувало показники тетрацикліну. Концентрація 15,63 мкг/мл забезпечувала 96% інгібування вибірки визначаючи значення MIK_{90} .

Речовина Кс23 (1-(2,4-дитретбутилфенокси-1-етокси)-3-(N-бензил N-метил циклогексиламино)-2-пропанол хлорид) при концентрації 0,97 мкг/мл інгібувала 12% штамів, а підвищення концентрації до 1,95 мкг/мл забезпечувало чутливість 44% ізолятів. При 3,9 мкг/мл цей показник зростав до 68%, що було співставним з декаметоксином і перевищувало тетрациклін. Повне пригнічення відзначалося при 15,63 мкг/мл, що свідчить про високу ефективність сполуки.

Сполука Кр8 виявила значну активність вже при концентрації 0,48 мкг/мл щодо 4% ентерококів. Підвищення концентрації до 1,95 мкг/мл забезпечувало пригнічення 52% штамів, а при 15,63 мкг/мл – 84%. За активністю вона перевершувала тетрациклін, декаметоксин та мірамістин у діапазоні 3,9–7,81 мкг/мл. Пригнічення 90% вибірки досягалось при концентрації 31,25 мкг/мл.

Речовина Кр10 продемонструвала високу ефективність серед досліджуваних сполук. Уже при концентрації 0,24 мкг/мл спостерігався антимікробний ефект щодо 4% штамів. При концентрації 0,97 мкг/мл пригнічувалось 36% штамів, а 1,95 мкг/мл - 60%, що відповідало значенням медіани MIK та MIK_{50} . При концентрації 15,63 мкг/мл ефективність зростала до 88% демонструючи кращі показники ніж тетрациклін та мірамістин.

Сполука Кр18 також виявила високу активність, пригнічуючи вже 24% штамів при концентрації 0,97 мкг/мл. Подальше зростання концентрації до 1,95

мкг/мл забезпечувало активність щодо 60% ізолятів, а MIK_{90} визначено при концентрації 15,63 мкг/мл. Антибактеріальний ефект щодо більшості клінічних ізолятів був співставний із ванкомицином та ампіциліном, перевищуючи показники інших промікробних препаратів.

Речовина Кр19 демонструвала високу антибактеріальну активність, пригнічуючи 4% штамів уже при 0,12 мкг/мл. У концентрації 0,97 мкг/мл кількість чутливих ізолятів зростала до 36%, а при 1,95 мкг/мл – до 68%, визначаючи таким чином MIK_{50} та медіану MIK . При подальшому збільшенні концентрації до 15,63 мкг/мл забезпечувалося пригнічення, що відповідало MIK_{90} . За активністю ця сполука суттєво перевершувала мірамістин, декаметоксин та тетрациклін.

3.6 Порівняльна характеристика антистафілокової активності четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо представників *MSSA* та *MRSA*

У рамках даного дослідження проведено порівняльну оцінку антистафілокової активності низки четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо представників чутливих та стійких до метициліну стафілококів. Аналіз результатів дозволяє виявити закономірності дії сполук залежно від фенотипу резистентності, що має важливе значення для подальшого спрямованого синтезу протимікробних агентів (рис. 3.16, 3.17).

Препарат Кс1 демонстрував вищу ефективність щодо *MSSA* порівняно з *MRSA*. Значення MIK_{50}/MIK_{90} для *MSSA* становили 1,95/3,91 мкг/мл відповідно, тоді як для *MRSA* – 1,95/7,81 мкг/мл. Крива кумулятивної чутливості для *MRSA* зростала повільніше, що свідчить про потребу у вищих концентраціях для досягнення повного інгібування. Різниця між групами була статистично значущою ($p < 0,05$), що підтверджує переважну активність Кс1 проти метицилін-чутливих *S. aureus*. Щодо епідермального стафілококу, сполука також виявив вищу активність проти *MSSE*. MIK_{50}/MIK_{90} для *MSSE* становили 0,98/1,95 мкг/мл, тоді як для *MRSE* – 1,95/3,91 мкг/мл. Таким чином, препарат

продemonстрував стабільну протимікробну дію на *S. epidermidis*, однак з переважною активністю щодо чутливих до метициліну штамів ($p < 0,05$).

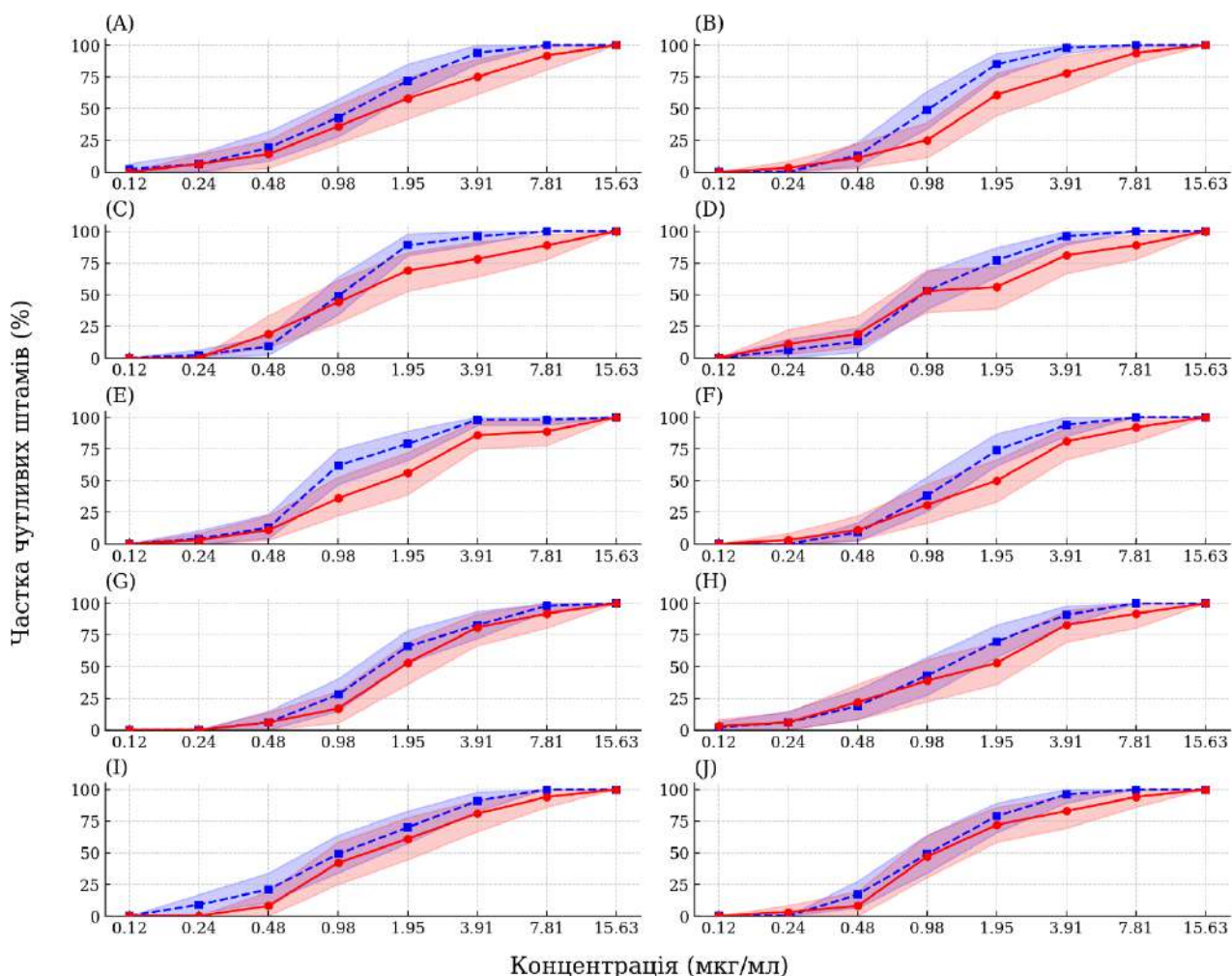


Рис. 3.16. Кумулятивні профілі чутливості штамів *MRSA* ($n=36$) та *MSSA* ($n=47$) до досліджуваних сполук. (A) – Кс1, (B) – Кс2, (C) – Кс3, (D) – Кс4, (E) – Кс15, (F) – Кс22, (G) – Кр10, (H) – Кр16, (I) – Кр18, (J) – Кр19. Червоні лінії – частка чутливих *MRSA*, сині – *MSSA*. Заштриховані зони відображають 95% довірчі інтервали, розраховані для кожної точки за біноміальним розподілом.

Сполука Кс2 мала ідентичні значення MIK_{50} (1,95 мкг/мл) для *MRSA* і *MSSA*, однак MIK_{90} для *MRSA* досягала 7,81 мкг/мл, у той час як для *MSSA* – лише 3,91 мкг/мл. Ці дані вказують на знижений профіль ефективності препарату щодо резистентних ізолятів, підтверджений статистично ($p < 0,05$). Аналогічна ситуація спостерігалася серед ізолятів *S. epidermidis*. Для *MRSE* MIK_{50}/MIK_{90} становили 0,98/15,63 мкг/мл, тоді як для *MSSE* – 0,98/3,91 мкг/мл. Різниця між

кумулятивними кривими чутливості була значною ($p < 0,01$), що підтверджує критично нижчу активність препарату проти *MRSE*

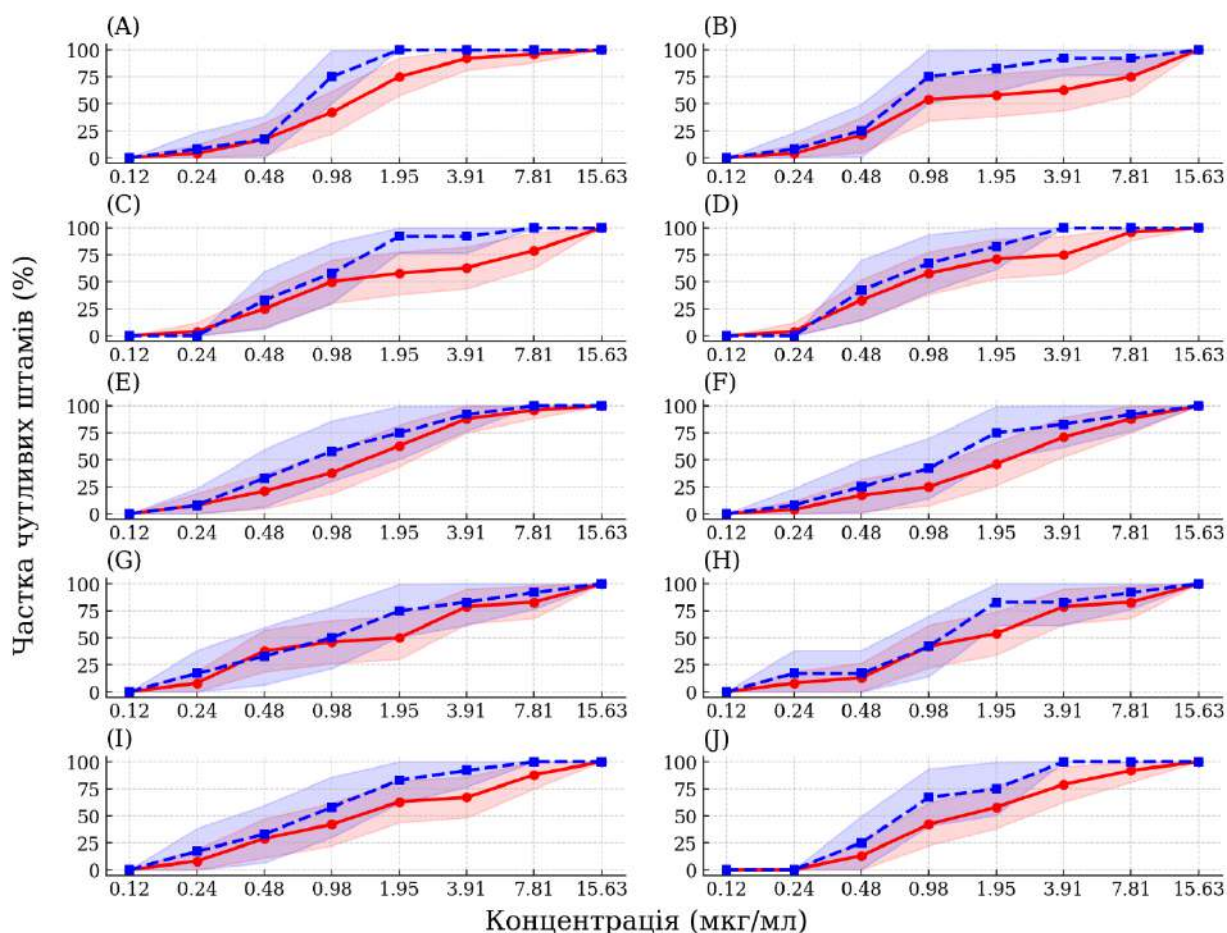


Рис. 3.17. Кумулятивні профілі чутливості штамів *MRSE* ($n=24$) та *MSSA* ($n=12$) до досліджуваних сполук. (A) – Кс1, (B) – Кс2, (C) – Кс3, (D) – Кс4, (E) – Кс15, (F) – Кс22, (G) – Кр10, (H) – Кр16, (I) – Кр18, (J) – Кр19. Червоні лінії – частка чутливих *MRSE*, сині – *MSSA*. Заштриховані зони відображають 95% довірчі інтервали, розраховані для кожної точки за біноміальним розподілом.

Речовина Кс3 демонстрував однакові MIK_{50} (1,95 мкг/мл) для *MRSA* та *MSSA*, однак MIK_{90} для *MRSA* сягав 15,63 мкг/мл, у той час як для *MSSA* – лише 3,91 мкг/мл. Більшість ізолятів *MSSA* (>80%) було інгібовано вже при 1,95 мкг/мл, тоді як для *MRSA* було потрібно майже в чотири рази вищу концентрацію ($p < 0,01$). Схожий патерн спостерігався для *S. epidermidis*. MIK_{50} для обох груп становив 0,98 мкг/мл, але MIK_{90} *MRSE* був значно вищим (15,63 мкг/мл) порівняно з *MSSE* (1,95 мкг/мл). Це підкреслює різко знижений

потенціал препарату проти метицилін-резистентних ізолятів *S. epidermidis* ($p < 0,01$).

Значення MIK_{50} для Кс4 було однаковим (0,98 мкг/мл) для обох груп *S. aureus*, проте MIK_{90} для *MRSA* становив 15,63 мкг/мл, а для *MSSA* – 3,91 мкг/мл. Препарат проявляв швидке інгібування чутливих штамів, у той час як резистентні залишалися менш уразливими на клінічно релевантних рівнях ($p < 0,05$). У *S. epidermidis* динаміка була менш різко виражена, однак тенденція зберігалась. Для *MRSE* MIK_{90} становив 7,81 мкг/мл, тоді як для *MSSE* – 3,91 мкг/мл. Відмінність між розподілами інгібування також була статистично підтверджена ($p < 0,05$).

Для *MRSA* препарат Кс15 показав MIK_{50}/MIK_{90} 1,95/15,63 мкг/мл, що значно перевищувало відповідні значення для *MSSA* – 0,98/3,91 мкг/мл. Різниця в розподілах чутливості була суттєвою ($p < 0,01$), що свідчить про кращу ефективність у *MSSA*. У *S. epidermidis* аналогічні показники спостерігались. Так, *MRSE* – 1,95/7,81 мкг/мл, *MSSE* – 0,98/3,91 мкг/мл. Таким чином, Кс15 демонстрував кращу дію проти метицилін-чутливих штамів обох видів стафілококів ($p < 0,05$).

Для препарату Кс22 було зафіксовано однакові значення MIK_{50} у всіх групах досліджуваних ізолятів, включаючи *MSSA*, *MRSA*, *MSSE* та *MRSE*, на рівні 1,95 мкг/мл. Проте показники MIK_{90} демонстрували виражену різницю між метицилін-чутливими і резистентними штамами. Так, для *MSSA* та *MSSE* MIK_{90} становив 3,91 мкг/мл, у той час як для *MRSA* та *MRSE* – 7,81 мкг/мл. Така відмінність свідчить про меншу ефективність сполуки Кс22 щодо метицилін-резистентних ізолатів ($p < 0,05$).

На відміну від попередніх сполук, препарат Кр10 продемонстрував однаковий профіль MIK_{50} (1,95 мкг/мл) для всіх чотирьох типів ізолятів, а також ідентичне значення MIK_{90} для *MRSA* і *MRSE* – 7,81 мкг/мл. Водночас, у чутливих до метициліну штамів обох видів (*MSSA* та *MSSE*) MIK_{90} був нижчим і становив 3,91 мкг/мл. Таким чином, хоча базовий рівень інгібування був однаковим, повне інгібування резистентних штамів вимагало вищих концентрацій. Статистично

значуща різниця виявлена лише у випадку *S. epidermidis* ($p < 0,05$), тоді як розподіли для *S. aureus* не показали достовірної відмінності ($p > 0,05$), що свідчить про відносну збалансованість активності Кр10 щодо цієї групи.

Препарат Кр16 характеризувався стабільними значеннями MIK_{50} для всіх чотирьох підгруп стафілокока – 1,95 мкг/мл. Проте аналіз показників MIK_{90} засвідчив подібну тенденцію до зниження ефективності в резистентних штаммах. У *MSSA* та *MSSE* MIK_{90} не перевищував 3,91 мкг/мл, тоді як у *MRSA* і *MRSE* він становив 7,81 мкг/мл ($p = 0,07$).

У випадку Кр18 значення MIK_{50} для всіх штамів були ідентичними – 1,95 мкг/мл, однак розподіли MIK_{90} виявилися істотно різними. Для чутливих до метициліну штамів обох видів – *MSSA* і *MSSE* – показник не перевищував 3,91 мкг/мл (для *MSSA* зафіксовано 4,68 мкг/мл, що лежить у межах допустимої похибки інтерпретації), тоді як для *MRSA* і *MRSE* він досягав 7,81 мкг/мл. Це вказує на потребу у вищих концентраціях препарату для подолання резистентності, особливо в умовах формування біоплівки або підвищеної щільності колоній ($p < 0,05$).

Для Кр19 спостерігався симетричний профіль щодо MIK_{50} для всіх чотирьох груп ізолятів (1,95 мкг/мл). Однак MIK_{90} для *MRSA* і *MRSE* становив 7,81 мкг/мл, тоді як для *MSSA* та *MSSE* – лише 3,91 мкг/мл. Незважаючи на наявність дворазової різниці у концентрації, Кр19 можна розглядати як сполуку з помірною ефективністю, незалежно від чутливості штамів до метициліну ($p > 0,05$).

3.7 Вивчення ступеню антибактеріальних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси дигалогенамонію щодо мікобактерій

Нетуберкульозні мікобактеріози (НТМ) набувають все більшої актуальності через природну резистентність до багатьох антибіотиків та зростання набутої стійкості до антибіотиків. Ця тенденція частково пов'язана зі старінням населення, зростанням числа пацієнтів з хронічними захворюваннями легень та збільшенням числа людей з імунodefіцитними станами, включаючи

ВІЛ/СНІД та тих, хто отримує імуносупресивну терапію [198]. Однак, навіть серед імунокомпетентних осіб, інфекції НТМ стають все більш поширеними, викликаючи занепокоєння щодо факторів навколишнього середовища та змін в імунній відповіді [199].

Дослідження антимікобактеріальних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію методом пропорцій. Дослідження антимікобактеріальної активності нових арил ациклічні аміноспиртів методом пропорцій на середовищі Левенштейна-Єнсена (рис. 3.18) продемонструвало їхню ефективність щодо *M. terrae*, *M. B₅* та *M. avium* у трьох концентраціях: К-I (МІК *M. smegmatis*), К-II (10×МІК) та К-III (100×МІК). Отримані результати показали, що більшість досліджених сполук мають виражений бактерицидний ефект у високих концентраціях, хоча чутливість різних штамів значно відрізнялася (рис. 3.19).

Антимікобактеріальна активність Кс12 (1-(2,4-дитретбутилфенокси-1-етокси)-3-(N-бензил диметиламіно)-2-пропанол хлорид), К-I якої становила $0,22 \pm 0,02$ мкг/мл, свідчить про 50% ефективність щодо *M. terrae*. Збільшення концентрації в 10 разів призводило до значного зниження виживаності – до 16%. Лише К-III забезпечувала майже повне пригнічення мікобактерій ($p < 0,001$). Штам *M. B₅* виявився більш чутливим: вже при К-I виживало лише 6% бактерій, а К-II забезпечувала майже повне пригнічення (1%) ($p < 0,001$). У свою чергу, *M. avium* продемонстрував значно нижчу чутливість до сполуки. Зокрема, при К-I життєздатність зберігалася на рівні 70 %, при К-II навіть незначно зростала (71%), тоді як лише К-III спричиняла істотне зниження виживаності до 1 % ($p < 0,001$). У порівнянні з контрольними антибіотиками, Кс12 поступається рифампіцину, який повністю знищував бактерії, однак перевищувала за активністю стрептоміцин, ефективність якого щодо *M. avium* була значно нижчою.

Сполука Кс13 (1-(2,4-дитретбутилфенокси-1-етокси)-3-(N-метил морфоліній)-2-пропанол йодид) виявила помірну активність щодо *M. terrae*: на

рівні К-I виживаність складала 53%. Підвищення концентрації до К-II призвело до різкого зниження популяції (5%), а К-III забезпечила повне пригнічення культури ($p < 0,001$). Для *M. B5* ця сполука продемонструвала високу ефективність, оскільки вже К-I зменшила виживаність до 5%, а К-II та К-III повністю знищували бактерії ($p < 0,001$). *M. avium* характеризувалася резистентністю до концентрацій К-I (71%) та К-II (65%), що свідчить про природну стійкість. Лише К-III забезпечила помітне пригнічення (3%), але повне знищення культури не відбулося ($p < 0,001$). У порівнянні з рифампіцином, Кс13 поступалась за ефективністю, але перевищувала стрептоміцин, який мав 14% залишкової популяції для *M. avium*.

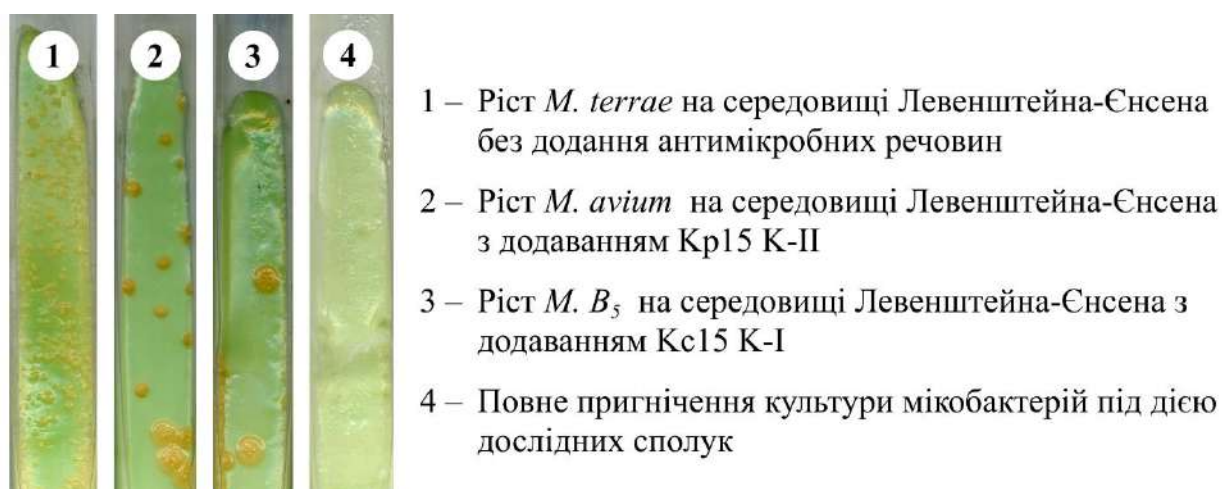


Рис. 3.18. Особливості росту мікобактерій при дослідженні антибактеріальних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію методом пропорцій.

Сполука Кс14 виявила середню активність щодо *M. terrae*, оскільки при К-I зберігалось 50 % життєздатних клітин, тоді як К-II знижувала цей показник до 8 %, а К-III – до 2 % ($p < 0,001$). *M. B5* виявила високу чутливість до цієї сполуки, вже К-I забезпечувала зниження виживаності до 7 %, а концентрації К-II та К-III повністю пригнічували бактерії ($p < 0,001$). *M. avium* залишався резистентним на концентраціях К-I (54 %) та К-II (16 %), при цьому навіть на К-III життєздатність залишалася на рівні 16 % ($p = 0,396$).

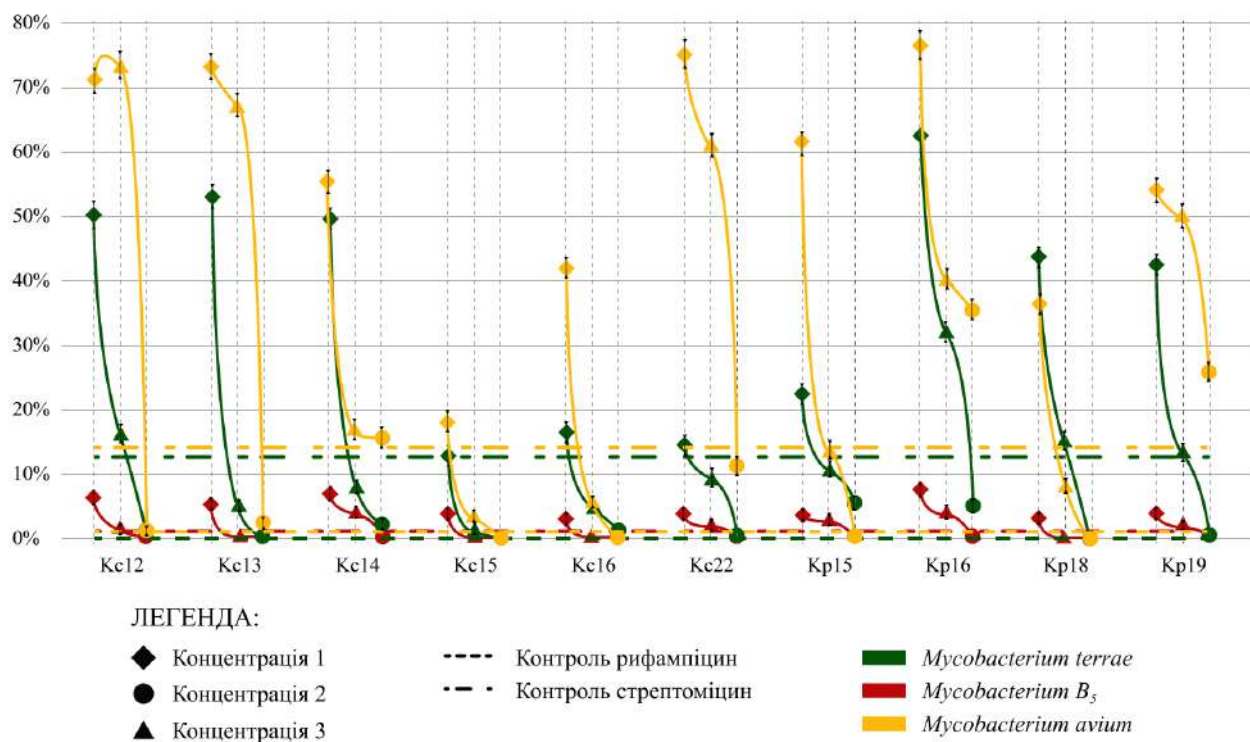


Рис. 3.19. Результати визначення антимікобактеріальної активності нових арил ациклічних аміноспиртів методом пропорцій ($n=3$, $\pm 95\%$ CI)

Сполука Kc15 проявила високу антимікобактеріальну активність, особливо щодо *M. terrae* та *M. B5*. Вже на К-I частка виживання штаму знижувалася до 13%, при К-II – до 1%, а К-III повністю інгібувала культуру ($p < 0,001$). Подібна картина спостерігалася і для *M. B5* ($p < 0,001$). Щодо *M. avium* – на К-I виживаність становила 18%, на К-II – 3%, а при К-III відбувалося повне знищення ($p < 0,001$). Сполука Kc15 показала ефективність, аналогічну рифампіцину, перевершуючи стрептоміцин.

Сполука Kc16 продемонструвала помітну антимікобактеріальну дію, насамперед щодо *M. terrae* та *M. B5*. Для *M. terrae* початкова концентрація К-I знижувала виживаність до 17%, а подальше підвищення дозування до К-II і К-III забезпечувало ще інтенсивніше пригнічення – 5% і 1% відповідно ($p < 0,001$). У випадку *M. B5* ефективність була ще вищою: вже при К-I життєздатність становила 3%, а при К-II і К-III спостерігалася повне знищення ($p < 0,001$). *M. avium* виявився менш чутливим: при К-I зберігалася 41% клітин, однак на К-II виживаність знижувалася до 5%, а на К-III – до 0% ($p = 0,226$).

Сполука Кс22 виявила схожий рівень активності щодо *M. terrae* – 15% виживаності при К-I, 9% на К-II, 1% на К-III ($p < 0,001$). Для *M. B-5* ефект був помітний – поступове зниження життєздатності до 4%, 2% та повного інгібування ($p < 0,001$). Натомість у випадку з *M. avium* навіть на найвищій концентрації виживаність залишалась відносно високою – 74% (К-I), 60% (К-II), і лише К-III спричиняла помірне зниження до 11% ($p < 0,001$).

Сполука Кр15 (КР-15. 1-(2,4-дитретбутилфенокси)-3-(N-(4-метилбензил)-гексаметиленіміній)-2-пропанол хлорид) виявила помірну активність щодо *M. terrae*, оскільки навіть при К-I залишкове виживання бактерій становило 23%, що є недостатнім для вираженого бактерицидного ефекту. При К-II виживаність знизилася до 11%, а К-III забезпечувала більш виражене пригнічення (6%) ($p < 0,001$). *M. B5* виявив значно вищу чутливість до цієї сполуки – вже при К-I залишкове виживання становило 3%, що свідчить про достатньо потужний антимікобактеріальний ефект навіть у низьких концентраціях. К-II не спричиняла додаткового покращення (3%), але К-III повністю знищувала бактерії ($p < 0,001$). *M. avium* демонстрував підвищену резистентність, оскільки при К-I залишкове виживання становило 61%, що лише частково знижувалося при К-II (13%). Підвищення концентрації до К-III забезпечувало повну загибель вибірки ($p < 0,001$). У порівнянні з контрольними препаратами Кр15 поступалася рифампіцину, але перевершувала стрептоміцин за ефективністю щодо *M. terrae* та *M. B5*.

Кр16 демонструвала обмежену ефективність щодо *M. terrae*, оскільки навіть при К-I залишкове виживання становило 63%, що значно перевищувало поріг ефективності. При К-II спостерігалось зниження до 32%, а К-III забезпечувала значний бактерицидний ефект (5%), проте залишкова популяція все ще спостерігалася ($p < 0,001$). *M. B5* був значно чутливішим – виживаність на К-I становила 7%, що свідчить про сильний початковий антимікобактеріальний ефект. К-II знижувала популяцію до 3%, а К-III забезпечувала повне знищення вибірки ($p < 0,001$). *M. avium* демонстрував високу резистентність, оскільки навіть при К-I залишкове виживання складало

76%, що лише частково знижувалося при К-II (40%). Навіть К-III не забезпечувала повного знищення культури (36%) ($p < 0,001$). У порівнянні з контрольними антибіотиками Кр16 значно поступалася рифампіцину та навіть стрептоміцину у впливі на *M. avium*.

Кр18 проявила високу ефективність, особливо щодо *M. terrae* та *M. B5*. Частка виживання *M. terrae* при К-I становила 44%. При К-II вона різко знижувалася до 15%, а при К-III забезпечувалося повне пригнічення росту ($p < 0,001$). *M. B5* демонстрував надзвичайну чутливість до цієї сполуки – вже при К-I виживаність становила 3%, що свідчить про значний бактерицидний ефект. При К-II та К-III культура повністю інгібувалась ($p < 0,001$), що робить Кр18 одним із найперспективніших кандидатів для подальших досліджень. *M. avium* демонстрував стійкість при К-I (36%), але при К-II життєздатність різко зменшувалася до 8%, а при К-III культура була повністю пригнічена (0%) ($p < 0,001$). У порівнянні з контрольними антибіотиками Кр18 була аналогічною за ефективністю рифампіцину, перевершуючи стрептоміцин за всіма показниками.

Кр20 продемонструвала низьку ефективність щодо *M. terrae*. Навіть К-I залишала 43% життєздатних клітин. При К-II показник виживання мікобактерій зменшувався до 13%, а при К-III – до 1%, що вказує на можливість застосування лише у високих дозах ($p < 0,001$). *M. B5* був чутливішим до цієї сполуки, оскільки вже К-I забезпечувала зниження популяції до 4%, К-II – до 2%, а К-III повністю знищувала бактерії ($p < 0,001$). *M. avium* демонстрував значну резистентність, оскільки К-I залишала 53% життєздатних бактерій, а К-II не спричиняла суттєвого покращення (48%). Частка живих клітин у концентрації К-III становила 25% ($p < 0,001$). У порівнянні з контрольними антибіотиками Кр20 значно поступалася рифампіцину та була менш ефективною за стрептоміцин.

Висновки до розділу 3

1. На етапі первинного скринінгу, проведеного методом дифузії в агар, встановлено високу антимікробну активність четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо грампозитивних референтних

мікроорганізмів. Результати дозволили виокремити низку біологічно активних сполук та виключити неактивні з подальших досліджень.

2. У дослідженні МІК методом серійних розведень ідентифіковано 10 найбільш активних сполук для кожного тест-організму:

- Для *S. aureus* визначено діапазон МІК ефективних сполук на рівні 1–4 мкг/мл. До найактивніших віднесено Кс22, Кс1, Кс3, Кс2, Кс15, Кр18, Кс4, Кр16, Кр19, Кр10.
- Відносно *Ent. faecalis* лідерами за антибактеріальною дією стали сполуки Кр10, Кр19, Кр8, Кс2, Кр18, Кс23, Кс1, Кс3, Кс4, Кс22, з мінімальними інгібуючими концентраціями у межах 2–4 мкг/мл.
- Проти *B. subtilis* найвищу активність продемонстрували Кс14, Кр18, Кс3, Кр16, Кс22, Кс2, Кр19, Кс15, Кс16, Кр1, з рівнем МІК у діапазоні 0,26–1,00 мкг/мл, що свідчить про виняткову чутливість виду до досліджуваних сполук.
- У дослідах щодо *M. smegmatis* найефективнішою виявилася сполука Кс12 (МІК – 0,22 мкг/мл), а також інші сполуки, включаючи Кс16, Кс13, Кс15, Кр15, Кр20, Кр18, Кс22, Кс14 та Кр16, які демонстрували активність при концентраціях до 4 мкг/мл.

3. У дослідженні клінічних ізолятів *Staphylococcus spp.* (n=83) встановлено широкий діапазон активності сполук – від 0,12 до 15,63 мкг/мл. Кс1 виявила найнижчу МІК (0,12 мкг/мл), повністю інгібуючи ріст при 15,63 мкг/мл, що перевищує ефективність ампіциліну та бензилпеніциліну й наближається до рівня ванкоміцину. Аналогічну активність продемонстрували Кс2, Кс3, Кс4, а також Кс15 і Кс22, які забезпечили 96–100% інгібування при 7,81–15,63 мкг/мл.

Сполуки Кр10, Кр16, Кр18 і Кр19 проявили виражену антистафілококову активність, пригнічуючи ріст 80-90% клінічних ізолятів у концентраціях 3,9-7,81 мкг/мл. Зокрема, Кр18 і Кр19 значно перевищували ефективність таких антисептиків, як мірамістин і декаметоксин.

4. Усі досліджувані четвертинні солі арилоксиетокси діалкіламонію продемонстрували вищу антимікробну активність щодо метицилін-чутливих

ізолятів порівняно з резистентними стафілококами. Для більшості сполук значення МІК₉₀ були нижчими у групах *MSSA* та *MSSE*, а криві кумулятивної чутливості стрімко зростали вже при 0,98-1,95 мкг/мл, тоді як для *MRSA* та *MRSE* повне інгібування фіксувалось при 7,81-15,63 мкг/мл. Сполуки Кр10 і Кр19 мали найменшу різницю між чутливими й резистентними штамми, що може вказувати на їх ширший спектр дії. Водночас для таких сполук як Кс2, Кс3 і Кс15 було відзначено найпомітніший розрив між кривими чутливості, особливо щодо *S. epidermidis*. Отримані дані вказують на перспективність цих сполук як протимікробних засобів, ефективність яких тісно пов'язана з метициліновим фенотипом збудника.

5. У межах дослідження щодо *Ent. faecalis* встановлено, що сполуки Кс1 та Кс2 мали помірну активність, тоді як Кс3 та Кс4 забезпечили повне інгібування при 15,63 мкг/мл. Найвищу ефективність показали Кс22 і Кс23 (96% інгібування при 15,63 мкг/мл), а також Кр8, Кр10, Кр18 і Кр19, які продемонстрували понад 80% активності при 7,81 мкг/мл.

Особливу увагу привернули Кр10 та Кр18, які інгібували 60% ентерококових ізолятів при 1,95 мкг/мл та понад 90% при 7,81 мкг/мл, що свідчить про їхню виняткову антиентерокову потенцію.

6. У дослідженнях щодо нетуберкульозних мікобактерій (*M. terrae*, *M. B5*, *M. avium*) сполуки Кс15, Кс16 і Кр18 забезпечували повне пригнічення перших двох штамів при концентрації К-III (100×МІК до *M. smegmatis*) та істотне зниження життєздатності *M. avium*. Зокрема, Кс16 інгібувала 99% мікобактерій при К-III, перевершуючи активність стрептоміцину щодо *M. avium*.

Сполуки Кс12 та Кс13 показали добру активність проти *M. terrae* та *M. B5*, але були менш ефективними щодо *M. avium*, що узгоджується з високою природною резистентністю останнього. Аналогічна тенденція спостерігалася для Кс14, ефективність якої проти *M. avium* залишалась обмеженою навіть при високих концентраціях.

Серед досліджених речовин найбільш широким спектром дії вирізнялася Кр18, яка демонструвала активність проти всіх трьох видів мікобактерій,

включаючи суттєве зниження життєздатності *M. avium* до 8% при К-II, що свідчить про її потенціал як майбутнього антимікобактеріального препарату.

7. Узагальнюючи результати, можна виокремити сполуки з найбільш перспективними властивостями:

- Кс22 – високоактивна проти *S. aureus* та *Ent. faecalis*.
- Кс16 – перспективна для застосування у протимікобактеріальній терапії.
- Кр18 – універсальний антимікробний агент з дією на стафілококи, ентерококи та мікобактерії.
- Кр10 – потенційний кандидат для розробки антиентерококових засобів.

8. Отримані дані підтверджують доцільність подальших доклінічних досліджень відібраних сполук з метою розробки нових ефективних антимікробних препаратів із широким спектром дії, у тому числі проти резистентних клінічних штамів бактерій та умовно-патогенних мікобактерій.

Результати досліджень представлені в даному розділі викладені в публікаціях [200-209].

РОЗДІЛ 4

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ЧЕТВЕРТИННИХ СОЛЕЙ АРИЛОКСИЕТОКСИ ДІАЛКІЛ АМОНІЮ З ЕУКАРІОТИЧНИМИ МІРООРГАНІЗМАМИ

4.1 Протигрибкові властивості досліджуваних похідних арил ациклічних аміноспиртів

Резистентність грибів до протигрибкових препаратів є зростаючою проблемою сучасної медицини, що ускладнює лікування грибкових інфекцій та підвищує рівень смертності. Основними факторами розвитку резистентності є надмірне та нераціональне використання антимікробних препаратів, а також недостатній контроль інфекцій у медичних закладах.

Candida auris активно поширюється спричиняючи спалахи в лікарнях та інших медичних установах. Цей вид кандид входить до переліку критичних патогенів Всесвітньої організації охорони здоров'я через високу смертність та стійкість до кількох класів протигрибкових препаратів [79].

Candida albicans є одним з найпоширеніших збудників грибкових інфекцій у людей. Він може викликати як поверхневі, так і інвазивні інфекції, включаючи кандидемію, яка асоціюється з високою смертністю, особливо серед пацієнтів з ослабленим імунітетом [210].

Аспергіли є поширеним збудником інвазивного аспергільозу, особливо серед пацієнтів з ослабленим імунітетом, таких як реципієнти органів або пацієнти, які проходять хіміотерапію. За останні 20 років резистентність *A. fumigatus* до протигрибкових препаратів значно зросла; наприклад, у Нідерландах 15% ізолятів цього грибка є стійкими до одного з трьох класів антимікотиків [211].

4.1.1 Скринінг антифунгальних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію

Визначення ознак протигрибкових властивостей четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію проводилось щодо музейних штамів

дріжджеподібних грибів *C. albicans* ATCC 10231 та представника пліснявих грибів *A. niger* ATCC 704 (рис. 4.1). Результати скринінгу методом дифузії в агар представлено на рисунку 4.2.

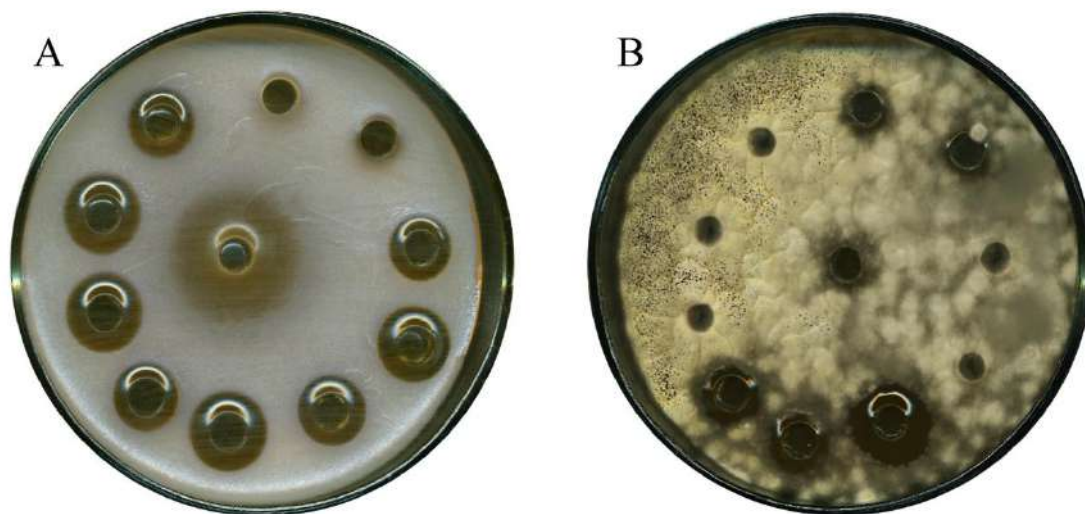


Рис. 4.1. Протигрибкова дія четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо *Candida albicans* ATCC 10231* (А) та *Aspergillus niger* ATCC 704** (В) у твердому поживному середовищі (метод «колодіязів») через 48* та 72** години.

Антимікотичну активність продемонстрували 44 із 52 досліджених четвертинних похідних арил-ациклічних аміноспиртів. Високу активність проти *C. albicans* мали 17 сполук, які сформували зони затримки росту діаметром понад 15 мм. До групи з десяти найбільш ефективних увійшли: Кс20 ($21,67 \pm 0,33$ мм), Кс5 і Кс6 (по $20,33 \pm 0,33$ мм), Кс7 ($20,00 \pm 0,33$ мм), Кс10 ($19,00 \pm 0,33$ мм), Кс12 і Кс14 (по $17,67 \pm 0,33$ мм), Кс15 ($16,33 \pm 0,33$ мм), Кс17 ($16,00 \pm 0,33$ мм), Кс18 ($15,67 \pm 0,33$ мм). Помірну активність щодо *C. albicans* з утворенням зон інгібування в межах 10-15 мм продемонстрували 29 сполук. Повну відсутність активності або низький інгібуючий ефект (зони затримки <10 мм) зафіксовано у семи сполук; варто зазначити, що ця група представлена речовинами з найменшою активністю щодо бактерій.

Проти *A. niger* ефективність сполук була значно нижчою. Активність встановлено у 17 досліджуваних похідних арил ациклічних аміноспиртів. Лише 4 зразки перевищили позначку 12 мм у діаметрі інгібування: Кс29 (15,00 мм),

Кс22 (14,33 мм), Кс28 (12,33 мм) і Кс27 (12,00 мм). Інші активні сполуки утворили зони в межах 8-11 мм. З досліджуваної групи відсутність протигрибкового ефекту щодо аспергіл визначено в 13 сполук.

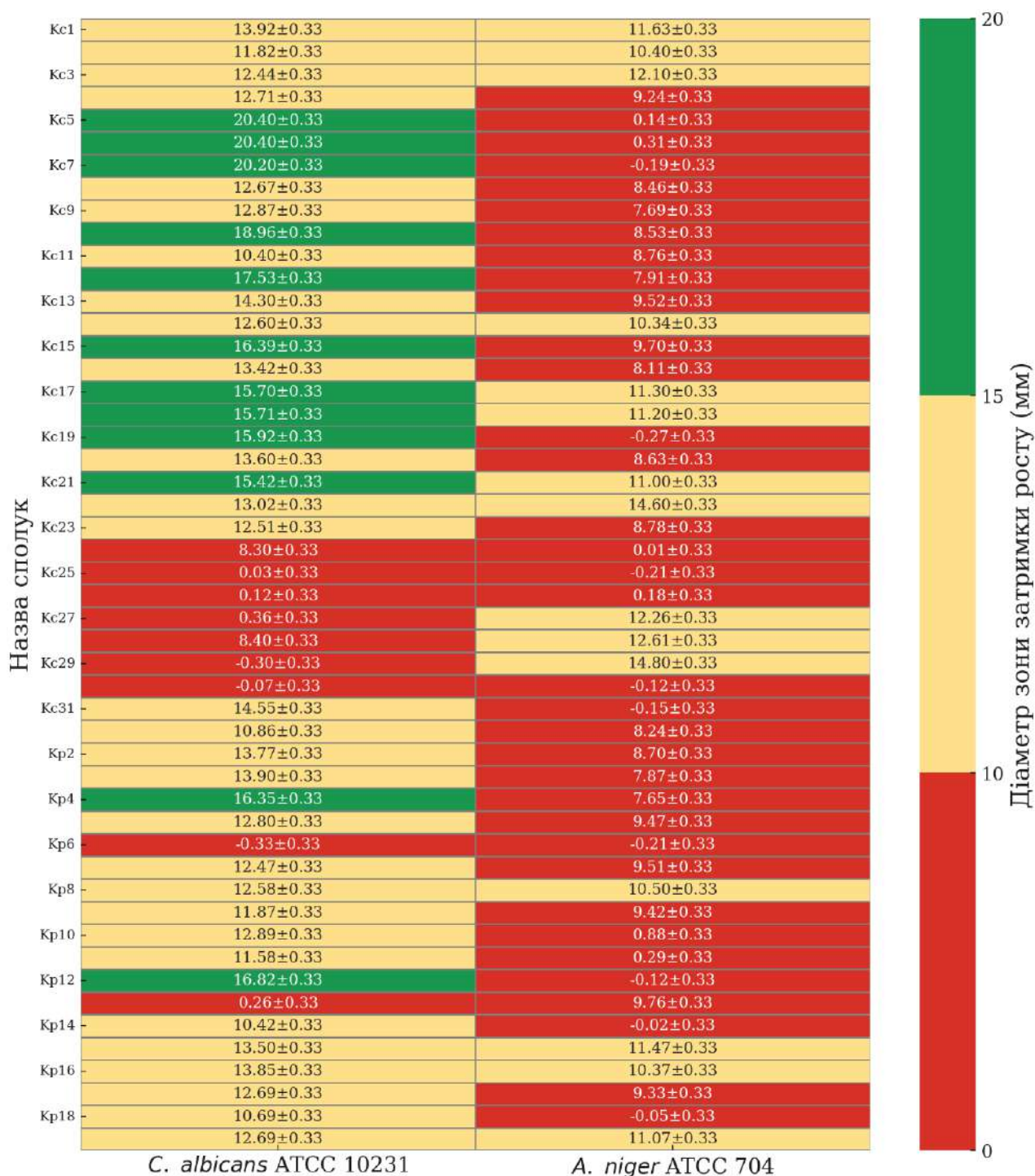


Рис. 4.2. Результати скринінгу протигрибкових властивостей (M±SD, n=3) похідних четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо референтних штамів у твердому поживному середовищі (метод «колодізів»).

Другий етап скринінгу антимікотичних властивостей арил-ациклічних аміноспиртів проводився щодо референтних штамів у рідкому середовищі RPMI 1640 (рис.4.3.).

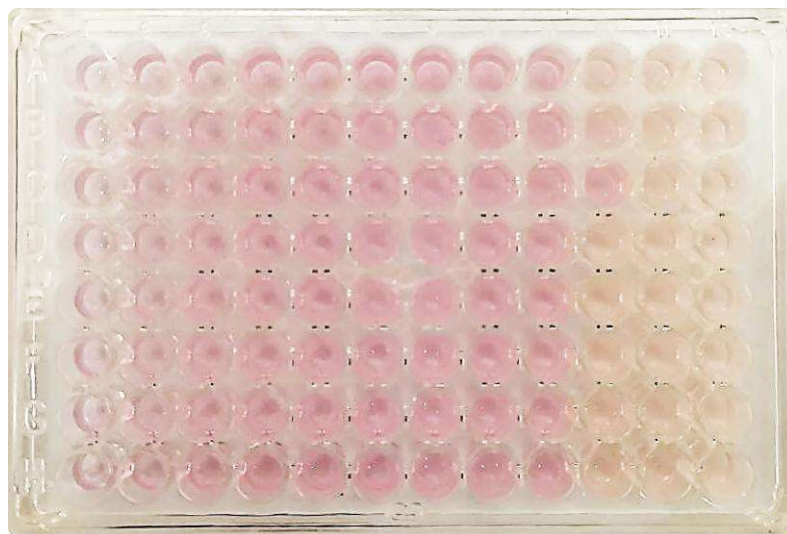


Рис. 4.3. Антимікробна дія четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо *Candida albicans* ATCC 10231 мікрометодом серійних розведень у рідкому поживному середовищі RPMI-1640.

Активність у межах від 1 до 20 мкг/мл щодо *C. albicans* було зафіксовано для 36 сполук (рис. 4.4). Найвищу антикандидозну активність виявила сполука Кс15, значення МІК якої становило $1,36 \pm 0,31$ мкг/мл. Високий інгібувальний ефект також було виявлено у Кс2 та Кс16, які продемонстрували активність на рівні $1,56 \pm 0,31$ та $1,94 \pm 0,70$ мкг/мл відповідно.

Значення МІК десяти найбільш активних похідних визначено у діапазоні 1,3-3,1 мкг/м. Зокрема, окрім уже зазначених сполук, до цієї групи увійшли Кс14 (МІК – $2,73 \pm 0,93$ мкг/мл), Кс22 ($2,34 \pm 0,86$), Кр4, Кр8, Кр18 ($2,73 \pm 0,93$), Кр19 та Кс3 ($3,12 \pm 0,62$).

У межах 4-10 мкг/мл було зафіксовано активність у 9 похідних. Значення МІК в межах 10-20 мкг/мл визначено для 12 сполук. Водночас 14 дослідних речовин продемонстрували значення МІК понад 20 мкг/мл, що свідчить про недостатню ефективність та обмежену перспективність для подальших досліджень як протикандидозних агентів.

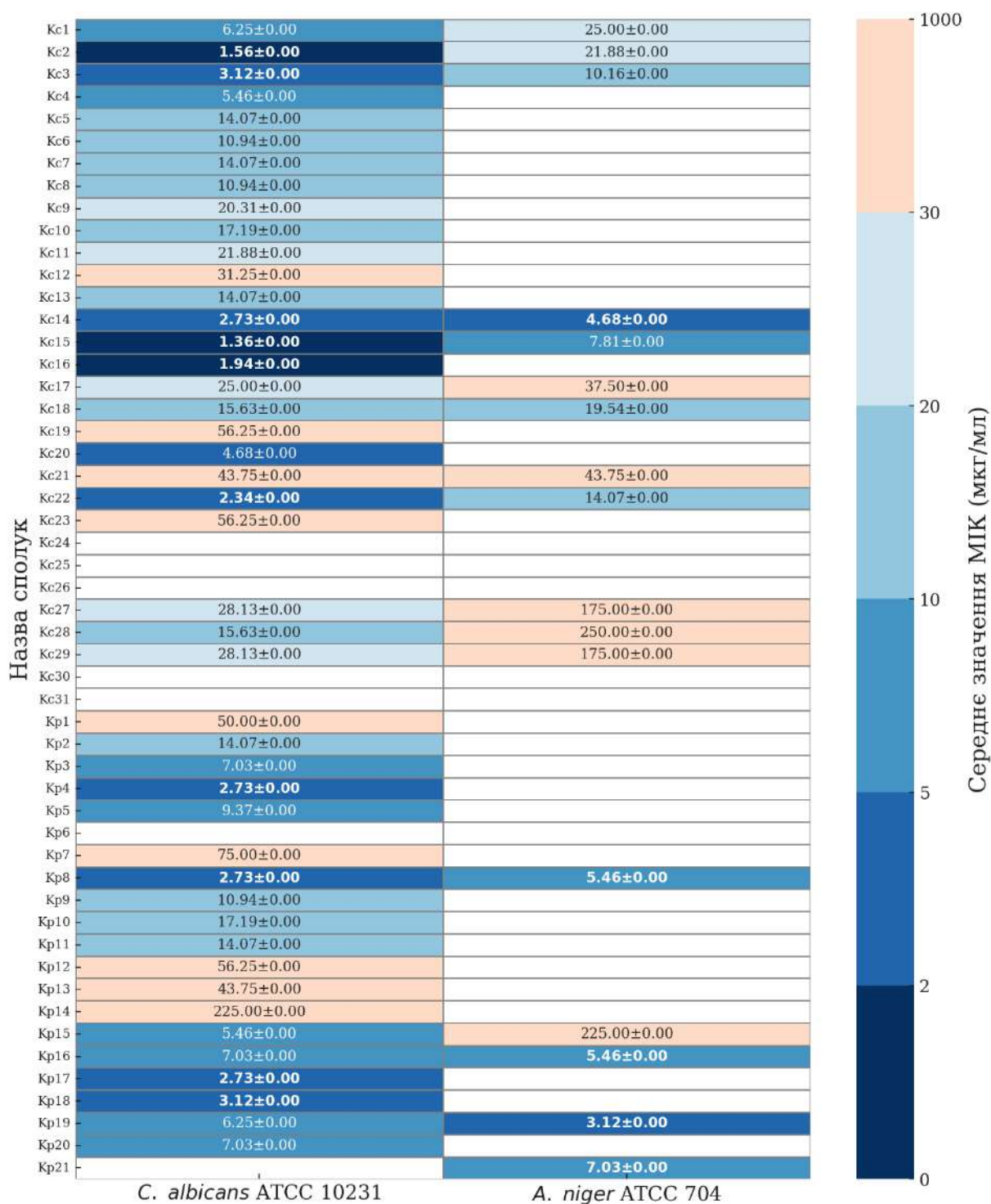


Рис. 4.4. Результати методу серійних розведень ($M \pm SD$, $n=5$) похідних четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо референтних штамів мікроскопічних грибів. Жирним шрифтом виділено десять сполук з найбільш вираженим антимікробним ефектом щодо бактерій.

Щодо *A. niger*, найвищу ефективність продемонструвала сполука Kp19, значення МІК якої становило $3,12 \pm 0,62$ мкг/мл. Високу антимікотичну

активність також виявили такі похідні арил ациклічних аміноспиртів: Кс14 ($4,68 \pm 1,01$ мкг/мл), Кр8 ($5,46 \pm 1,24$), Кр16 ($5,46 \pm 1,24$), Кр21 ($7,03 \pm 1,0$) та Кс15 ($7,81 \pm 2,7$). У межах 10-30 мкг/мл активність зберігали п'ять сполук, хоча рівень їхньої ефективності був помітно нижчим. Водночас вісім речовин мали значення МІК понад 30 мкг/мл, що свідчить про їхню слабку активність щодо *A. niger*. У висвітленому діапазоні не відображено шість сполук, МІК яких перевищили ці значення, що вказує на їх низьку ефективність щодо пліснявих грибів і унеможливорює подальший інтерес до них як до протиаспергільозних агентів.

4.1.2 Визначення чутливості музейних штамів дріжджеподібних грибів роду *Candida* до антибіотиків і антисептичних засобів.

Упродовж останніх десятиліть значно зросла клінічна значущість не лише *Candida albicans*, але й інших видів кандид, зокрема *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* і *C. tropicalis* [212, 213]. Підвищена стійкість цих штамів до традиційних протигрибкових засобів створює суттєві труднощі в терапії, особливо в умовах зниженого імунітету.

Найвищу активність щодо референтного штаму *C. albicans* продемонстрував АмВ – середнє значення МІК антибіотику становила $0,38 \pm 0,08$ мкг/мл, що підтверджується рекомендаціями EUCAST. Граничні значення для препарату дорівнюють 1 мкг/мл. Інший полієновий антибіотик, ністатин, проявляє помірну ефективність щодо *C. albicans*, з МІК $2,53 \pm 0,76$ мкг/мл. Найменшу активність із протигрибкових препаратів проти *C. albicans* показав флуконазол, з МІК $10,94 \pm 2,47$ мкг/мл. Важливо зазначити, що значення EUCAST для цього препарату азольної групи становить 2-4 мкг/мл.

Серед антисептичних засобів, декаметоксин забезпечує відносно кращу інгібуючу дію ($6,25 \pm 1,24$ мкг/мл) у порівнянні з мірамістином, для якого зафіксовано найвище значення МІК ($18,75 \pm 4,03$ мкг/мл). Результати чутливості референтних штамів кандид до антибіотиків та антисептичних препаратів подано у рисунку 4.5. Отримані результати свідчать про складну і неоднорідну картину

антимікотичної активності досліджуваних хіміотерапевтичних засобів, яка суттєво варіює залежно від виду *Candida* та специфіки дії кожного препарату.

Серед препаратів порівняння найвищу загальну ефективність продемонстрували полієнові антибіотики, зокрема AmB, який проявив значну активність проти всіх досліджених видів *Candida*, незалежно від їх видової приналежності. Антимікотичний ефект препарату визначено в межах граничних значень EUCAST. Значення МІК для амфотерицину В варіювали від $0,22 \pm 0,09$ мкг/мл (для *C. utilis* УКМ У-1597) до $0,87 \pm 0,13$ мкг/мл (для *C. krusei* RN 71062), що свідчить про високу чутливість усіх протестованих штамів. Показники МІК для інших видів *Candida* становили: *C. kefir* УКМ У-60 – $0,24 \pm 0,08$ мкг/мл, *C. tropicalis* УКМ У-2502 – $0,48 \pm 0,17$ мкг/мл, *C. lusitaniae* № 168 – $0,58 \pm 0,13$ мкг/мл, *C. parapsilosis* УКМ У-73 та *C. glabrata* № 199 – $0,68 \pm 0,16$ мкг/мл.

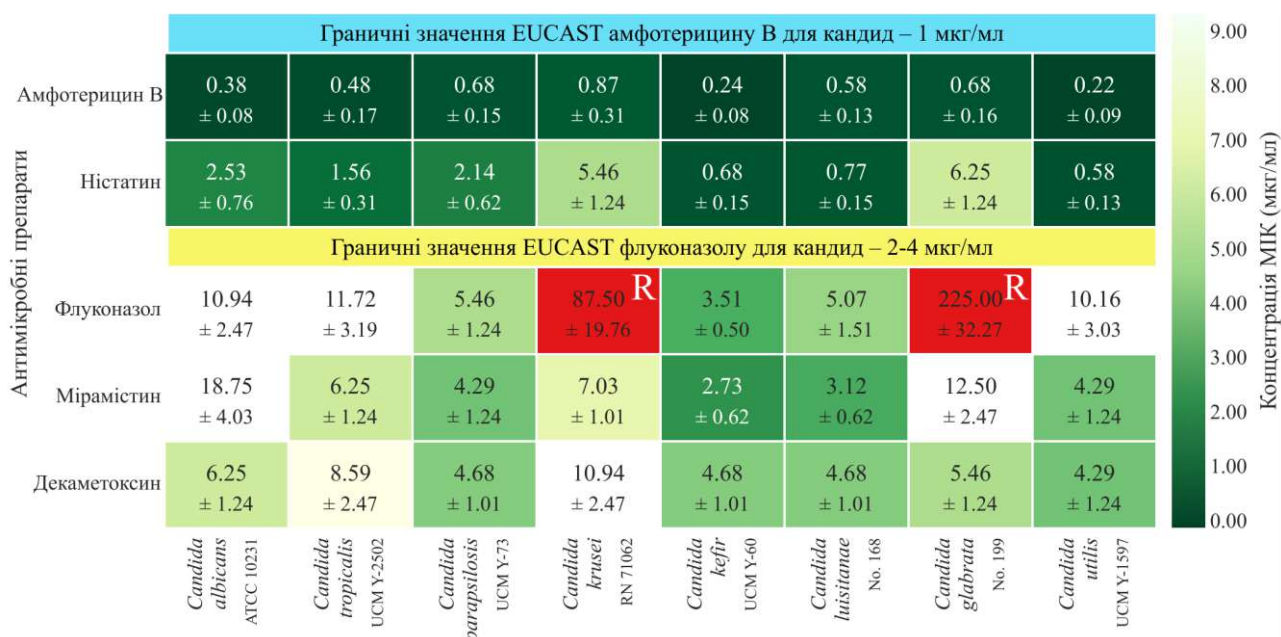


Рис. 4.5. Чутливість референтних штамів ($M \pm SD$, $n=5$) дріжджеподібних грибів роду *Candida* до антибіотиків та антисептичних препаратів (метод серійних розведень), R – вроджена резистентність.

Високий інгібуючий потенціал ністатину спостерігався щодо *C. utilis* (МІК – $0,58 \pm 0,13$ мкг/мл), *C. kefir* ($0,68 \pm 0,15$ мкг/мл) та *C. lusitaniae* ($0,77 \pm 0,15$ мкг/мл). Натомість середній рівень чутливості встановлено для *C. tropicalis* ($1,56 \pm 0,31$ мкг/мл) та *C. parapsilosis* ($2,14 \pm 0,62$ мкг/мл), тоді як *C. krusei*

($5,46 \pm 1,24$ мкг/мл) і *C. glabrata* ($6,25 \pm 1,24$ мкг/мл) продемонстрували суттєво знижену чутливість, що може свідчити про природжену або набуту резистентність до ністатину. Ганичні значення для препарату щодо кандид відсутні.

Похідні триазолу, представлені флуконазолом, виявили значно нижчу активність порівняно з полієновими сполуками. Встановлені значення МІК для *C. kefir* становили $3,51 \pm 0,50$ мкг/мл, для *C. lusitaniae* – $5,07 \pm 1,51$ мкг/мл, а для *C. parapsilosis* – $5,46 \pm 1,24$ мкг/мл. Значно вищі концентрації препарату були необхідні для пригнічення росту *C. utilis* ($10,16 \pm 3,03$ мкг/мл) та *C. tropicalis* ($11,72 \pm 3,19$), що вказує на перевищення граничних значень флуконазолу відповідно EUCAST. Видам *C. krusei* та *C. glabrata* характерна вроджена резистентність до триазольних препаратів.

Мірамістин, представник катіонних поверхнево-активних речовин, продемонстрував помірну протикандидозну активність із вираженим міжвидовим варіюванням. Найчутливішими до препарату виявилися *C. kefir* і *C. lusitaniae* (обидва зі значеннями МІК – $3,12 \pm 0,62$ мкг/мл). Помірна чутливість спостерігалась у *C. utilis* ($4,29 \pm 1,24$ мкг/мл) та *C. parapsilosis* ($4,68 \pm 1,01$ мкг/мл). Водночас інші види *Candida* характеризувалися значно вищими значеннями МІК, які перевищували 10 мкг/мл, що свідчить про обмежену ефективність мірамістину щодо цих ізолятів. Аналогічна тенденція спостерігалась і для декаметоксину. Максимальна чутливість зафіксована для *C. utilis* (МІК – $4,29 \pm 1,24$ мкг/мл). Для *C. parapsilosis*, *C. kefir* та *C. lusitaniae* значення МІК були подібними й становили $4,68 \pm 1,01$ мкг/мл. Дещо нижча чутливість встановлена для *C. glabrata* (МІК – $5,46 \pm 1,24$ мкг/мл). Натомість *C. krusei* виявилася найменш чутливою до декаметоксину: МІК перевищувала 10 мкг/мл і досягала $10,94 \pm 2,47$ мкг/мл.

4.1.3. Визначення чутливості музейних штамів *Candida non-albicans* похідних четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію

У сучасних умовах зростання частоти інфекцій, викликаних грибами роду

Candida, особливу увагу привертають штами *Candida non-albicans*, які характеризуються підвищеною резистентністю до традиційних протигрибкових препаратів. Це зумовлює необхідність розробки нових хімічних сполук із розширеним спектром дії, зокрема серед похідних четвертинних амонієвих солей [214].

Сполука Кс2 продемонструвала помірний рівень протигрибкової активності щодо протестованих референтних штамів *Candida*. Найвищу чутливість до неї виявила *C. parapsilosis*, значення МІК якої склало $0,73 \pm 0,20$ мкг/мл. Висока активність визначена щодо *C. kefir*, яка МІК сполуки становила $1,17 \pm 0,25$ мкг/мл. Щодо *C. lusitanae*, *C. glabrata* та *C. utilis* спостерігалась середня чутливість, з показниками МІК у межах $1,85 \pm 0,76$, $1,95 \pm 0,69$ та $2,14 \pm 0,62$ мкг/мл відповідно. Водночас, для *C. tropicalis* ($3,71 \pm 1,51$ мкг/мл) та *C. krusei* ($2,93 \pm 0,80$) спостерігалось значне зниження ефективності (рис. 4.6).

Кс3 виявила себе як більш активна речовина з ширшим протигрибковим профілем. Особливо помітною була її ефективність щодо *C. tropicalis* і *C. utilis*, для яких встановлено найнижчі значення МІК – по $0,53 \pm 0,15$ мкг/мл. До цієї групи чутливих також належала *C. parapsilosis*, з МІК $0,73 \pm 0,40$ мкг/мл. Висока активність була визначена щодо *C. kefir* ($1,07 \pm 0,31$ мкг/мл), *C. lusitanae* ($1,26 \pm 0,38$) та *C. glabrata* ($1,56 \pm 0,76$). Водночас, як і у випадку з Кс2, *C. krusei* продемонструвала найнижчу чутливість до цієї сполуки – $3,51 \pm 0,50$ мкг/мл.

Речовина Кс14 проявила себе як високоактивна протигрибкова сполука з вираженою дією проти окремих штамів. Зокрема, найвищу активність зафіксовано щодо *C. parapsilosis*, МІК якої становила $0,31 \pm 0,09$ мкг/мл, що є одним з найнижчих значень серед усіх сполук. Другим чутливим видом була *C. kefir*, яка інгібувалася при концентрації $0,53 \pm 0,15$ мкг/мл. Для таких видів, як *C. glabrata* ($1,17 \pm 0,43$ мкг/мл), *C. utilis* ($1,65 \pm 0,79$) та *C. lusitanae* ($2,14 \pm 0,62$), активність залишалася в межах 1-2 мкг/мл. Найнижчу чутливість до Кс14 проявили *C. tropicalis* ($2,92 \pm 0,80$ мкг/мл) і *C. krusei* ($3,12 \pm 0,62$).

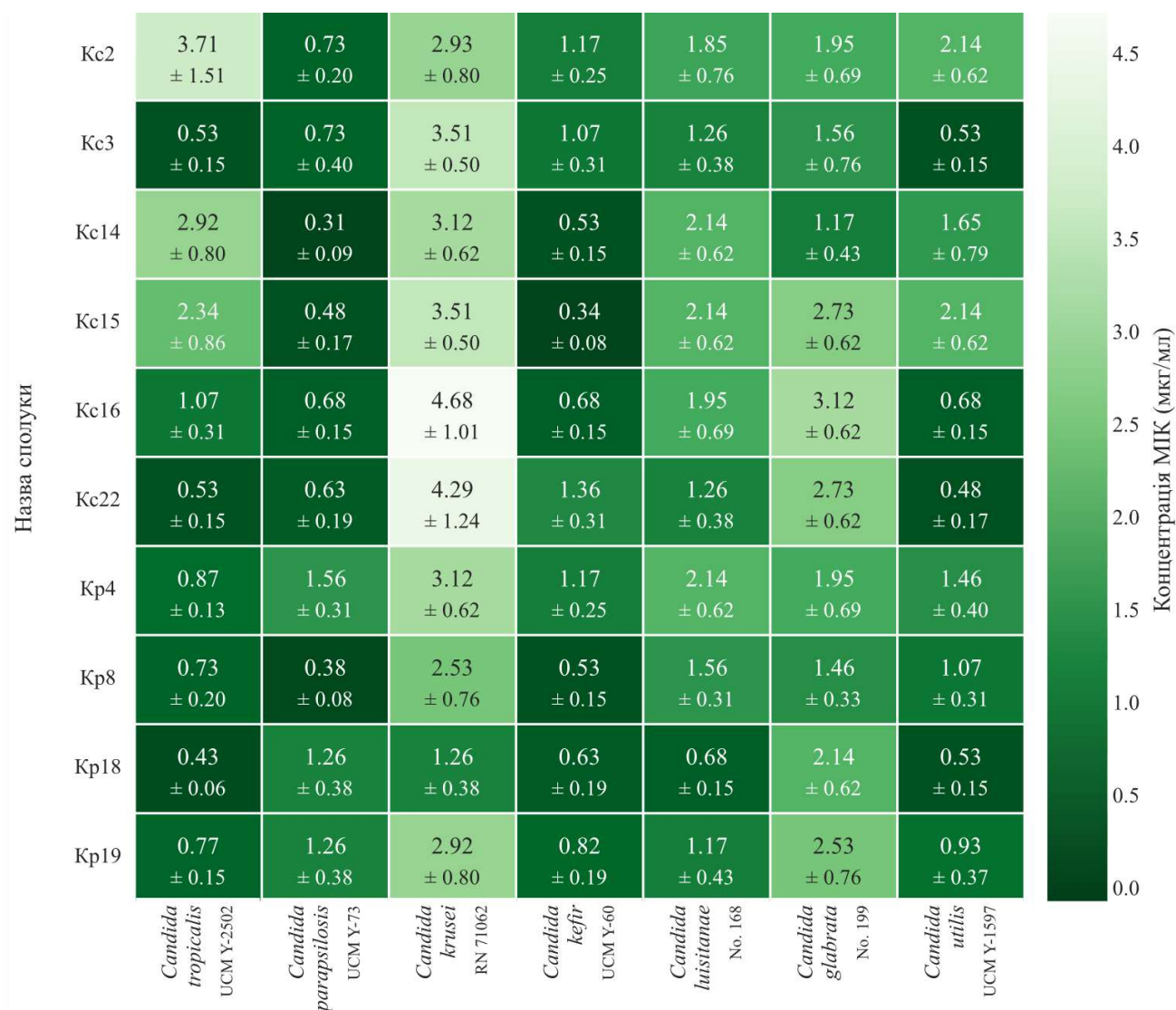


Рис. 4.6. Чутливість референтних штамів дріжджеподібних грибів роду *Candida* до четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію (метод серійних розведень), ($M \pm SD$, $n=5$).

Сполука Kc15 продемонструвала високу ефективність щодо *C. kefir* ($0,34 \pm 0,08$ мкг/мл) та *C. parapsilosis* ($0,48 \pm 0,17$). Для решти протестованих штамів значення МІК перебували в межах 2-3 мкг/мл, що відповідає помірному рівню активності. Водночас *C. krusei* знову проявила найменшу чутливість – МІК становила $3,51 \pm 0,50$ мкг/мл, демонструючи найменшу чутливість до досліджуваних арилациклічних аміноспиртів.

Речовина Kc16 була однією з найперспективніших серед протестованих сполук, музейні штами *C. kefir*, *C. parapsilosis* та *C. utilis* однаково

пригнічувались при концентрації $0,68 \pm 0,15$ мкг/мл. Активність в діапазоні простежувалась у випадках з *C. tropicalis* ($1,07 \pm 0,31$ мкг/мл) і *C. lusitanae* ($1,95 \pm 0,69$). Значно нижча чутливість була виявлена для *C. glabrata* ($3,12 \pm 0,62$) та *C. krusei* ($4,68 \pm 1,01$), остання демонструє найвищий рівень толерантності до усіх сполук.

Сполука Кс22 продемонструвала загалом високу інгібуючу здатність щодо більшості протестованих штамів *Candida*. Найкращі результати отримано для *C. utilis* ($0,48 \pm 0,17$ мкг/мл), *C. tropicalis* ($0,53 \pm 0,15$) та *C. parapsilosis* ($0,63 \pm 0,19$), що свідчить про виражену антимікотичну активність. Помірна ефективність спостерігалась у випадку *C. lusitanae* ($1,26 \pm 0,38$) та *C. kefir* ($1,36 \pm 0,31$). Для *C. glabrata* значення МІК було дещо вищим – $2,73 \pm 0,62$ мкг/мл. Найменшу ефективність Кс22 виявила щодо *C. krusei*, для якої необхідна концентрація препарату досягала $4,29 \pm 1,24$ мкг/мл.

Речовина Кр4 (1-[4-(1,1,3,3)-тетраметил бутил]-фенокси]-3-(N-(4-F-бензил)-диметиламоній)-2-пропанол хлорид) виявила помірну активність щодо ряду дріжджеподібних грибів. Найвища ефективність зафіксована проти *C. tropicalis* ($0,87 \pm 0,13$ мкг/мл), що дозволяє розглядати цю сполуку як потенційний агент для боротьби з інфекціями, викликаними цим збудником. В межах 1-2 мкг/мл визначено МІК щодо *C. kefir* ($1,17 \pm 0,25$), *C. utilis* ($1,46 \pm 0,40$), *C. parapsilosis* ($1,56 \pm 0,31$), *C. glabrata* ($1,95 \pm 0,69$) і *C. lusitanae* ($2,14 \pm 0,62$). Знову ж таки, *C. krusei* продемонструвала найнижчу чутливість із МІК $3,12 \pm 0,62$ мкг/мл.

Сполука Кр8 (1-(2,4-дитретбутил фенокси)-3-N-(4-CH₃-бензил-піролідиній)-2-пропанол хлорид) виявила виражену протигрибкову дію, особливо щодо *C. parapsilosis* ($0,38 \pm 0,08$ мкг/мл), *C. kefir* ($0,53 \pm 0,15$) та *C. tropicalis* ($0,73 \pm 0,20$), де значення МІК були серед найнижчих щодо представників поп-*albicans*. Інші представники продемонстрували активність в діапазоні 1-2 мкг/мл (*C. utilis* – $1,07 \pm 0,31$ мкг/мл, *C. glabrata* – $1,46 \pm 0,33$ та *C. lusitanae* – $1,56 \pm 0,31$). Як і в більшості випадків, *C. krusei* показала найменшу чутливість до сполуки – $2,53 \pm 0,76$ мкг/мл, проте ефективність була на відносно високому рівні в порівнянні з іншими сполуками.

Речовина Кр18 проявила високу активність одразу щодо *C. tropicalis* ($0,43 \pm 0,06$ мкг/мл), *C. kefir* ($0,63 \pm 0,19$), *C. luisitanae* ($0,68 \pm 0,15$) та *C. utilis* ($0,53 \pm 0,15$), що дозволяє оцінювати його як ефективний антимікотик проти низки non-*albicans* ізолятів. Дещо слабший ефект спостерігався при впливі на *C. parapsilosis* і *C. krusei*, які мали однакові значення МІК – $1,26 \pm 0,38$ мкг/мл. Найменш чутливою до Кр18 виявилася *C. glabrata* ($2,14 \pm 0,62$ мкг/мл).

Кр19 також демонструє стабільну та перспективну антимікотичну активність. Найчутливішими до неї були *C. tropicalis* ($0,77 \pm 0,15$ мкг/мл), *C. kefir* ($0,82 \pm 0,19$) та *C. utilis* ($0,93 \pm 0,37$). Для *C. parapsilosis* ($1,26 \pm 0,38$) і *C. luisitanae* ($1,17 \pm 0,43$) зафіксовано значення МІК, що відповідають середньому рівню активності. Найменшу чутливість продемонстрували *C. glabrata* ($2,53 \pm 0,76$) та *C. krusei* ($2,92 \pm 0,80$), що є узгодженим із загальною тенденцією, властивою для цих штамів у межах дослідження.

4.1.4 Визначення чутливості клінічних штамів дріжджеподібних грибів роду *Candida* до антибіотиків і антисептичних засобів

Вивчення чутливості до препаратів порівняння проводилось щодо клінічних ізолятів *C. albicans* (n=60), *C. krusei* (n=19), *C. glabrata* (n=17) та *C. auris* (n=5).

Визначення чутливості клінічних ізолятів *C. albicans* до антибіотиків та антисептичних засобів. Досліджувані препарати проявили високу активність щодо клінічних ізолятів *C. albicans* (рис. 4.7). Найбільш ефективним антибіотиком був АмВ. Уже при концентрації 0,48 мкг/мл чутливими були 27% ізолятів, а при 0,98 мкг/мл – 37%. За граничним значенням EUCAST (1 мкг/мл), чутливість продемонстрували 95% штамів. Усі ізоляти пригнічувалися при концентраціях 7,81 мкг/мл. Медіана МІК для клінічних ізолятів склала 0,73 мкг/мл, МІК₅₀ – 0,73 мкг/мл, МІК₉₀ – 1,95 мкг/мл, що підтверджує високу ефективність препарату. У порівнянні з референтними штамами (*C. albicans* ATCC 10231, МІК $\approx 0,38 \pm 0,08$ мкг/мл), клінічні штами демонструють порівнянний рівень чутливості.

Ністатин також виявив високу активність. Уже при 0,98 мкг/мл було чутливими 50% штамів, при 1,95 мкг/мл – 68%. Медіана МІК склала 0,98 мкг/мл, МІК₅₀ – 0,98 мкг/мл, МІК₉₀ – 3,90 мкг/мл, що відповідає ефективності проти клінічних штамів. Значення також близькі до референтного штаму (*C. albicans* ATCC 10231, МІК 2,53±0,76 мкг/мл), що підтверджує стабільну чутливість.

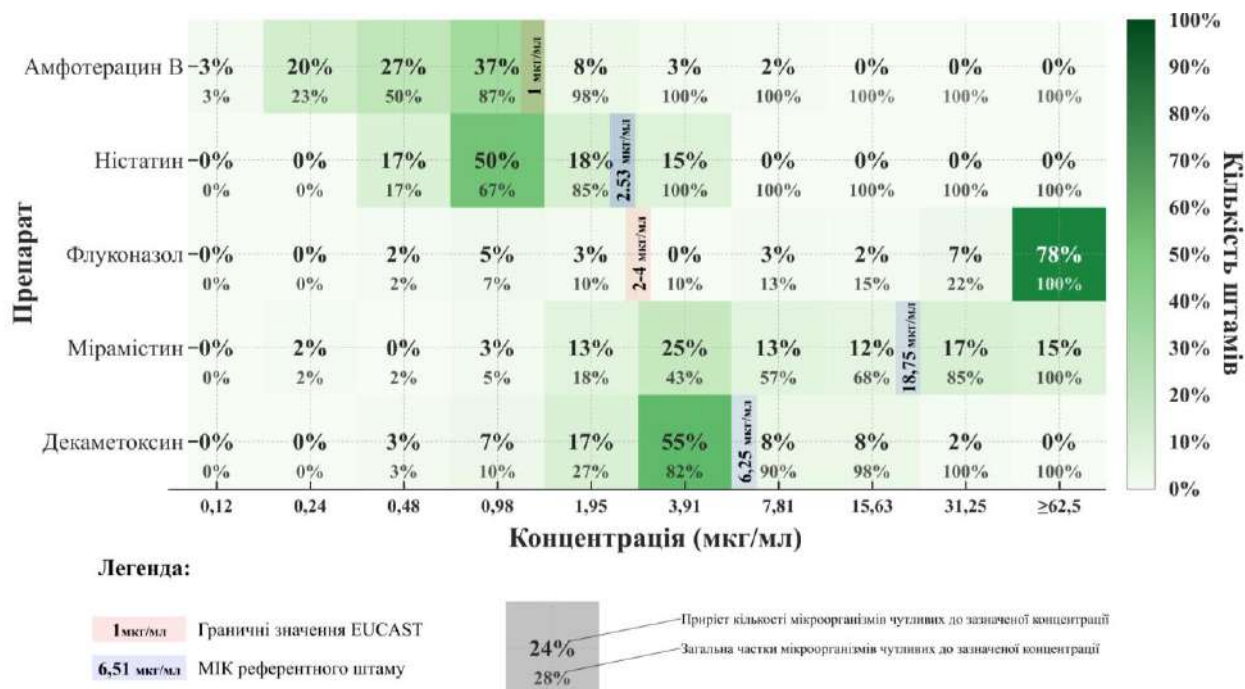


Рис. 4.7. Чутливість клінічних ізолятів *C. albicans* (n=60) до антибіотиків та антисептичних препаратів (метод серійних розведень)

Флуконазол проявив обмежену ефективність. Лише 5% штамів були чутливими при 0,98 мкг/мл і 3% при 1,95 мкг/мл, тобто лише 8% штамів потенційно чутливі за критеріями EUCAST (2-4 мкг/мл). Зростання чутливості спостерігалось лише при високих концентраціях досягаючи МІК₅₀ в діапазоні поза межами висвітлення результатів, що свідчить про надзвичайно високий рівень резистентності.

Мірамістин продемонстрував помірну активність. При концентрації 1,95 мкг/мл чутливими були 13% штамів, при 3,9 – 25%. Більша частина вибірки інгібувалось у концентрації 7,81 – 57%, що визначено як медіана МІК для сполуки.

Декаметоксин виявив високу активність, близьку до ністатину. Уже при

концентрації 1,95 мкг/мл чутливими були 17% штамів, при 3,9 – 55%, 7,81 – 90%. Що вказує, що медіана МІК склала 3,90 мкг/мл і свідчить про високу активність препарату проти клінічних ізолятів перевершуючи результати з референтним штамом (*C. albicans* ATCC 10231, МІК $\approx 6,25 \pm 1,24$ мкг/мл).

Визначення чутливості клінічних ізолятів *C. krusei* до антибіотиків та антисептичних засобів. Найвища активність щодо ізолятів *C. krusei* продемонстрував АмВ. Мінімальна антимікробна дія спостерігалась уже в концентрації 0,12 мкг/мл (11%). З подвоєнням концентрації частка чутливих зростала до 26%. Уже при концентрації 0,48 мкг/мл чутливість було визначено для 53% штамів, а при 0,98 мкг/мл – 79%. Збільшення при 1,95 мкг/мл – 89%. Застосування концентрацій 3,9-7,81 мкг/мл забезпечувало повне інгібування вибірки штамів. Медіана значень МІК визначено в концентрації 0,98 мкг/мл, що відповідало й значенню МІК₅₀, а МІК₉₀ становила 3,9 мкг/мл. Згідно з EUCAST, граничне значення для амфотерицину В становить 1 мкг/мл, отже близько 79% ізолятів *C. krusei* залишаються в межах чутливості. Порівняно з референтним штамом (МІК $0,22 \pm 0,09$ мкг/мл), клінічні штами виявляли дещо вищі, але прийнятні значення МІК.

Антифунгальна дія ністатину зафіксована при концентрації 0,98 мкг/мл, чутливими були 53% ізолятів. Концентрація 1,95 мкг/мл спричиняла загибель 84%, а 3,9 мкг/мл – 95%. Медіана МІК МІК₅₀ визначено в концентрації 0,98 мкг/мл, а МІК₉₀ – 3,9 мкг/мл. У порівнянні з референтним штамом (МІК $0,65 \pm 0,13$ мкг/мл), клінічні штами продемонстрували нижчу чутливість до антиботику.

Мірамістин продемонстрував помірну активність із широким розподілом МІК. При концентрації 1,95 мкг/мл чутливість визначено у 11% штамів. Збільшення концентрації мірамістину до 3,9 спричиняло пригнічення 37% ізолятів, а до 7,81 – 53%. Значення медіана МІК та МІК₅₀ становили 7,81 мкг/мл, а МІК₉₀ досягнуто в концентрації 62,5 мкг/мл. Порівняно з референтним штамом (МІК $12,50 \pm 2,47$ мкг/мл), клінічні ізоляти демонстрували ширшу варіабельність

та дещо нижчу чутливість.

Протигрибковий ефект декаметоксину визначено у концентрації 3,9 мкг/мл, чутливими до антисептику були 37% штамів, а 7,81 мкг/мл – 68%. Медіане значення МІК відповідало МІК₅₀ та визначено у концентрації 7,81 мкг/мл, що відповідало значенням чутливості референтного штаму.

Виду *C. krusei* характерна вроджена резистентність до флуконазолу, що підтверджують результати дослідження (рис. 4.8.).

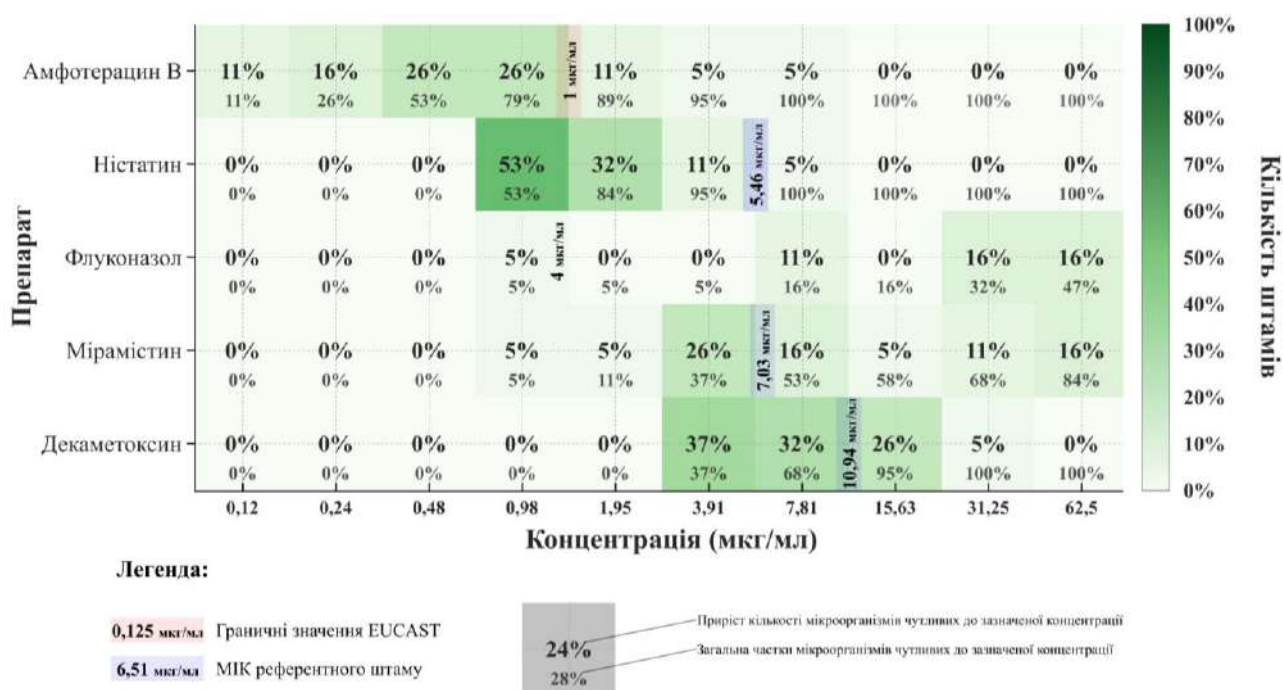


Рис. 4.8. Чутливість клінічних ізолятів *C. krusei* (n=19) до антибіотиків та антисептичних препаратів (метод серійних розведень).

Примітка*: вроджена резистентність виду до препарату

Визначення чутливості клінічних ізолятів *C. glabrata* до антибіотиків та антисептичних засобів. Антифунгальна активність АмВ щодо ізолятів *C. glabrata*. встановлено в концентрації 0,24 мкг/мл щодо 18% штамів. При концентрації 0,98 мкг/мл чутливими були 59% штамів, визначаючи значення Медіани МІК та МІК₅₀. Концентрація 1,95 мкг/мл інгібувала всю вибірку штамів, тобто до 41% штамів продемонстрували резистентність, перевищуючи граничне значення EUCAST (≤ 1 мкг/мл). У порівнянні з референтним штамом (МІК $0,22 \pm 0,09$ мкг/мл), клінічні ізоляти мають суттєво вищі значення, що вказує на

тенденцію до зниження чутливості (рис. 4.9).

Ністатин показав високу активність. При концентрації 0,98 мкг/мл чутливими були 29% штамів, при 1,95 мкг/мл – 88%, і 100% інгібіція досягалася на рівні 7,81 мкг/мл. Максимум розподілу припадає на 1,95 мкг/мл (59%), з подальшим зниженням на вищих концентраціях. Медіана МІК становила 0,98 мкг/мл, МІК₅₀ – 0,98 мкг/мл, МІК₉₀ – 1,95 мкг/мл, що збігається з даними для референтного штаму (МІК 0,65±0,13 мкг/мл), підтверджуючи стабільну ефективність препарату.

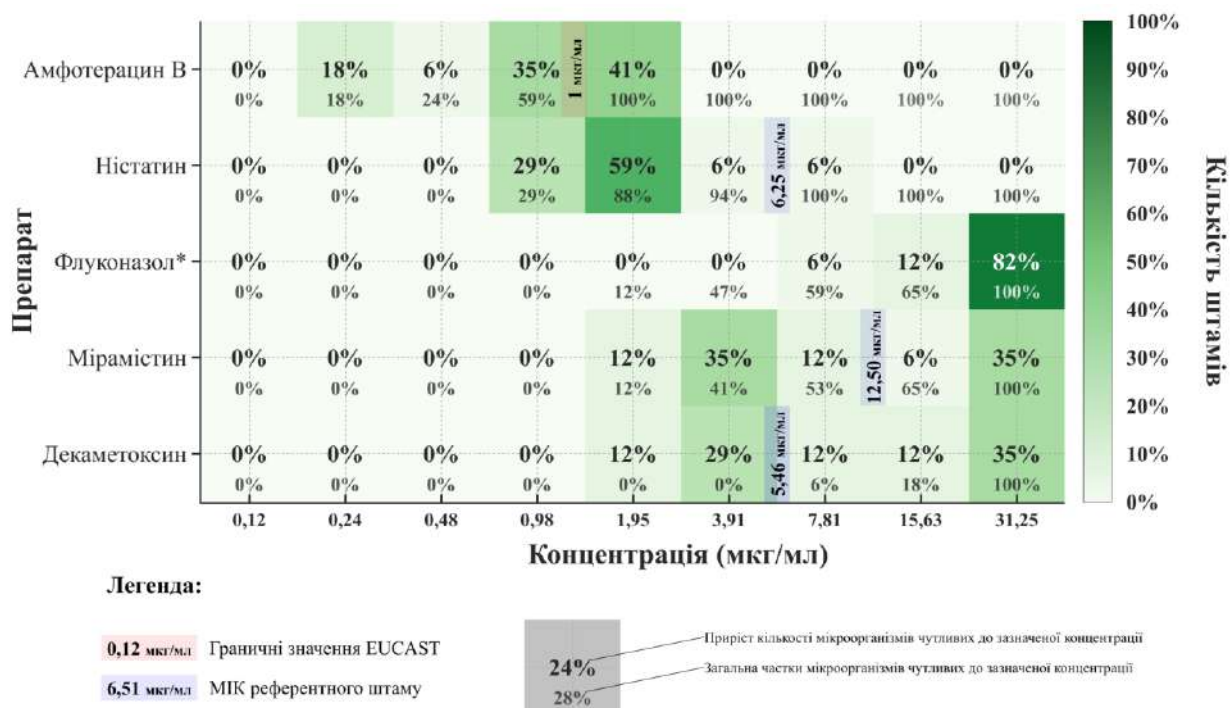


Рис. 4.9. Чутливість клінічних ізолятів *C. glabrata* (n=17) до антибіотиків та антисептичних препаратів (метод серійних розведень).

Примітка*: вроджена резистентність виду до препарату

Мірамістин виявив помірну протигрибкову активність щодо *C. glabrata*. При 3,9 мкг/мл чутливими були 47% штамів, при 7,81 – 59%, а при 15,63 – 65%, Медіана МІК та МІК₅₀ становили 7,81 мкг/мл, а МІК₉₀ визначено поза межами висвітленого діапазону. Порівняно з референтним штамом (МІК 12,50±2,47 мкг/мл), клінічні ізоляти демонстрували нижчу варіабельність і кращу чутливість.

Декаметоксин продемонстрував ефективність, близьку до мірамістину.

Антифунгальна активність фіксувалась починаючи з 1,95 мкг/мл (12%), подвоєння концентрації до 3,9 мкг/мл збільшувало частку чутливих штамів на 35%, досягаючи загальної вибірки 41%. Концентрація 7,81 інгібувала 53%, що відповідає медіані та МІК₅₀. Значення МІК₉₀ визначено у концентрації 15,63 мкг/мл, що свідчить про достатню активність у середньому діапазоні концентрацій.

Флуконазол продемонстрував низьку ефективність щодо *C. glabrata*. Більшість штамів інгібувалось поза межами висвітлених діапазонів, що підтверджується літературними даними про резистентність цього виду кандид до препарату триазольної групи. Результати розподілу чутливості клінічних ізолятів *C. glabrata* продемонстровано на рисунку 4.9.

Визначення чутливості клінічних ізолятів *C. auris* до антибіотиків та антисептичних засобів. Представникам *C. auris* характерна мультирезистентність до протигрибкових препаратів, що продемонстровано і у проведеному дослідженні. Результати дослідження чутливості кандид до АмВ, ністатину та флуконазолу, вказують про неефективність полієнових антибіотиків та препаратів триазольної групи щодо *C. auris*.

В свою чергу антисептичні препарати продемонстрували вищу ефективність. Мірамістин виявив помірну активність, з медіаною і МІК₅₀, що відповідає концентрації 7,81 мкг/мл. Декаметоксин показав найкращу ефективність, з медіаною МІК і МІК₅₀ – 3,90 мкг/мл, що робить його найбільш активним препаратом серед протестованих.

4.1.5 Вивчення ступеню протигрибкових властивостей четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо клінічних штамів дріжджеподібних грибів роду *Candida*

Рід *Candida* включає низку дріжджеподібних грибів, що є частою причиною опортуністичних інфекцій у клінічній практиці, особливо у пацієнтів з ослабленим імунітетом. На тлі зростаючої резистентності до традиційних антимікотиків актуалізується пошук нових синтетичних молекул з вираженою

фунгіцидною дією. Четвертинні амонієві солі арилоксиетокси диалкіл ряду демонструють здатність до порушення клітинних мембран грибів і потенційно можуть стати ефективною альтернативою існуючим засобам. Їх тестування на клінічних ізолятах *Candida* дозволяє визначити спектр активності та чутливість окремих видів до цих сполук.

Визначення антифунгальних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо клінічних штамів *C. albicans*. З рисунку 4.10 видно, що сполука Кс2 продемонструвала помірну протигрибкову активність щодо *C. albicans*. Антимікотична активність зафіксована в концентрації 0,12 мкг/мл. Уже при концентраціях 0,24 вона інгібувала 10%, при 0,48 мкг/мл частка чутливих штамів зросла до 35%. Підвищення концентрації до значення 0,98 мкг/мл рівень зумовлювало інгібування 62% штамів, а в концентрації 1,95 мкг/мл – 85%. Медіана МІК становила 0,98 мкг/мл, що відповідало значенню МІК₅₀ (0,98 мкг/мл); а МІК₉₀ – 3,9 мкг/мл. За ступенем активності Кс2 поступалась лише АмВ, перевищуючи результативність усіх інших препаратів порівняння.

Речовина Кс3 продемонструвала ефективність на рівні Кс2 інгібуючи 30% штамів в концентрації 0,48 мкг/мл. Концентрація 0,98 мкг/мл подвоювала частку чутливих ізолятів визначаючи медіану та МІК₅₀ для сполуки. Концентрація 1,95 мкг/мл відсоток інгібування досягав 98% (МІК₉₀). Порівняльні властивості Кс3 з препаратами порівняння повністю відповідали показникам Кс2.

Сполука Кс14 в концентрації 0,48 мкг/мл інгібувала 15% штамів, подвоєння концентрації до 0,98 мкг/мл пригнічувало ще 23% досягаючи рзагального рівня пригнічення в 38%. Концентрації 1,95 та 3,9 мкг/мл є оптимальними, так як в цьому діапазоні визначено значення медіани, МІК₅₀ та МІК₉₀ – 3,90 мкг/мл. За ступенем активності Кс14 дещо поступається АмВ і відповідає профілю антифунгальної дії ністатину. Порівняно з антисептиками, ефективність була вищою за мірамістин і співставною з декаметоксином.

Речовина Кс15 виявила подібну до Кс14 динаміку активності. Проте, уже

в концентрації 0,12 мкг/мл пригнічувалось 7% штамів, зростаючи до 17% при 0,24 мкг/мл. Пригнічення 45% ізолятів визначено при 0,98 мкг/мл, а в концентрації 1,95 мкг/мл частка інгібування досягала 82% доходячи до 100% з подвоєнням концентрації. Медіана МІК і МІК₅₀ становили 1,95 мкг/мл, а МІК₉₀ – 3,9 мкг/мл. У низьких концентраціях сполука продемонструвала активність на рівні АмВ, проте згодом відповідала профілю ністатину.

Сполука Кс16 в концентрації 0,24 мкг/мл інгібувала 7% штамів. Підвищення до 0,98 мкг/мл зумовлювало пригнічення 32% ізолятів досягаючи 52% (МІК₅₀ та медіана) при 1,95 мкг/мл. МІК₉₀ встановлено в концентрації 3,9 мкг/мл. За характером антифунгального ефекту сполука поступалась активності сполукам Кс3 та Кс14, а також полієновим антибіотика. Однак перевершувала мірамістин та декаметоксин.

Речовина Кс22 продемонструвала антифунгальний ефект в концентрації 0,24 мкг/мл пригнічуючи 8% штамів. Підвищення концентрації до 0,48 мкг/мл спричиняло інгібування 28% ізолятів. Медіана МІК та МІК₅₀ визначено у концентрації 0,98 мкг/мл, а МІК₉₀ – при 3,9 мкг/мл. За загальною ефективністю сполука була співставною з Кс3.

Сполука Кр4 продемонструвала активність у концентрації 0,24 мкг/мл. За 0,98 мкг/мл частка чутливих штамів становила 32%. Більша половина вибірки інгібувалось концентрацією 1,95 мкг/мл. Повне пригнічення вибірки спостерігалось при концентрації 7,81 мкг/мл, проте МІК₉₀ становила 3,90 мкг/мл. Сполука показала стабільну ефективність на рівні вищому ніж декаметоксин, але нижчому ніж ністатин.

Речовина Кр8 продемонструвала швидкий приріст інгібуючої активності у проміжку 0,98–3,9 мкг/мл: концентрація 0,98 мкг/мл пригнічувала 42% штамів, 1,95 мкг/мл інгібувала ще 37% (загальна частка чутливих в цій концентрації становила 78%) і 20% – при 3,9 мкг/мл. Відповідно до отриманих результатів медіана МІК та МІК₅₀ визначено в концентрації 1,95 мкг/мл, а МІК₉₀ – при 3,9 мкг/мл. За ступенем своєї ефективності Кр8 продемонструвала антифунгальну дію співставну з Кс14.

Сполука Кр18 продемонструвала низьку ефективність в концентрації до 1 мкг/мл, концентрація 0,98 мкг/мл пригнічувала лише 17% штамів. Проте подвоєння розведення до 1,95 мкг/мл інгібувало ще 53% штамів, досягаючи рівню 70% чутливих штамів серед ізолятів загальної вибірки. Значення медіана та МІК₅₀ становили 1,95 мкг/мл, МІК₉₀ – 3,90 мкг/мл. За ступенем своєї активності сполука поступалась АмВ, проте відповідала ефективності ністатину.

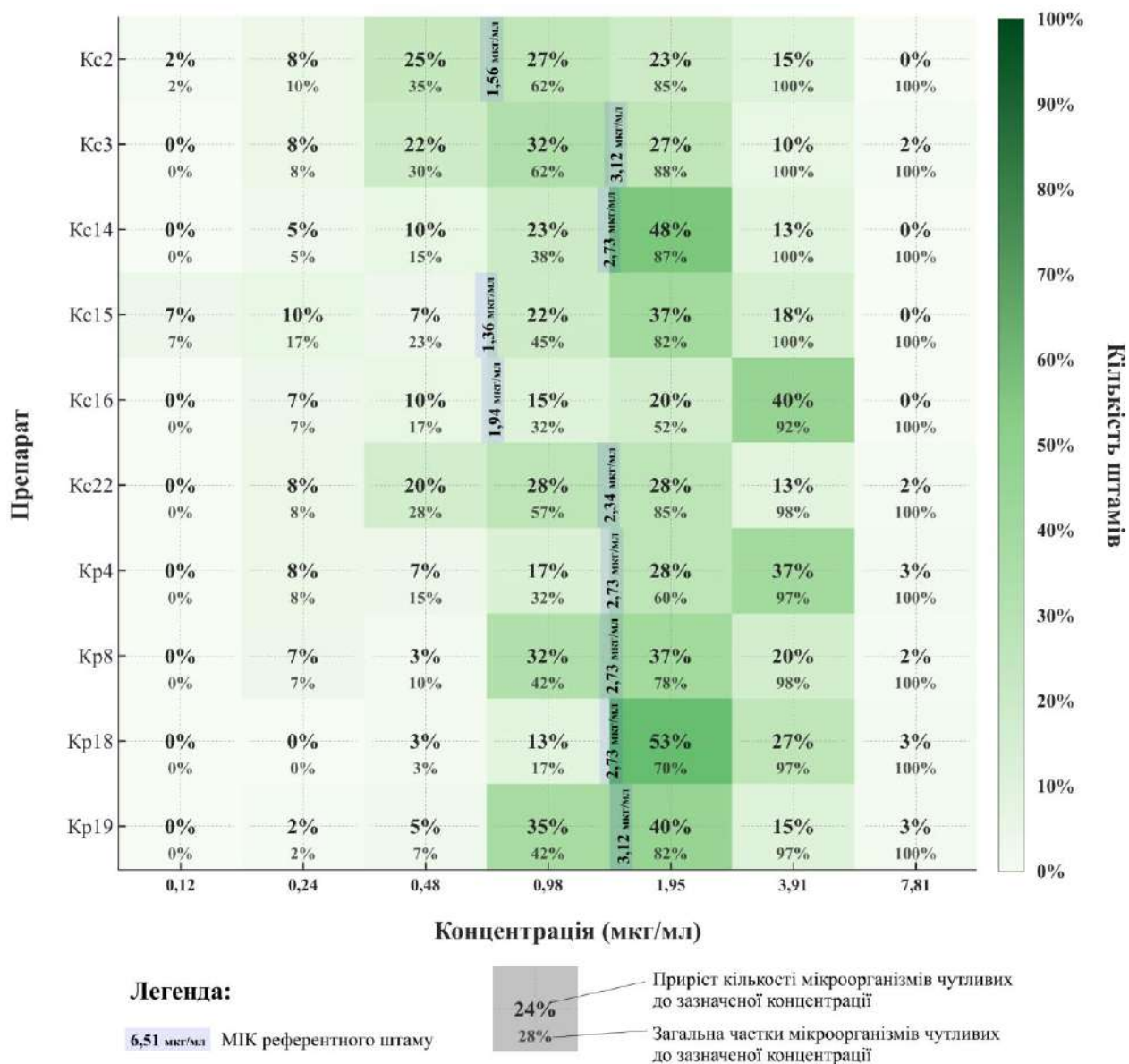


Рис. 4.10. Чутливість клінічних ізолятів *C. albicans* (n=19) до похідних четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію (метод серійних розведень)

Речовина Кр19 інгібувала 42% у концентрації 0,98 мкг/мл, а подвоєння концентрації 1,95 мкг/мл було ефективним щодо 82% ізолятів *C. albicans*.

Медіана і MIK_{50} сполуки становила 1,95 мкг/мл, а MIK_{90} – 3,90 мкг/мл. У порівнянні з антисептиками, Кр19 мала стабільну перевагу у межах усіх клінічно релевантних концентрацій. Антифунгальний ефект сполуки був співставним з активністю ністатину.

Визначення антифунгальних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо клінічних штамів *C. krusei*.

Антикандидозний ефект щодо *C. krusei* був менш виражений в порівнянні з *C. albicans*, проте відповідав високому рівню ефективності (рис. 4.11). Так, сполука Кс2 у концентрації 0,48 мкг/мл інгібувала 16% штамів, при 0,98 мкг/мл – 37%, а при підвищенні до 1,95 мкг/мл – вже 74%. Медіана MIK для Кс2 становила 1,95 мкг/мл, що відповідало значенню MIK_{50} , а MIK_{90} – 3,90 мкг/мл. У порівнянні з антимікотиками, сполука виявилась активнішою за флуконазол, який демонстрував лише 5% інгібування при 1,95 мкг/мл, а повного ефекту досягав лише при 62,5 мкг/мл. У межах 0,98-3,9 мкг/мл Кс2 перевершувала також мірамістин і декаметоксин, які досягали схожого рівня інгібування тільки при значно вищих концентраціях.

Речовина Кс3 показала високу ефективність проти ізолятів *C. krusei*. Уже при 0,48 мкг/мл вона інгібувала 32% штамів, а при 0,98 мкг/мл – 53%, визначаючи таким чином значення медіани та MIK_{50} . В концентрації 1,95 мкг/мл інгібувалось 79% штамів, а повне інгібування фіксувалось при 3,9 мкг/мл, що відповідало значенню MIK_{90} . За своєю активністю Кс3 була ефективнішою за амфотерицин В у низькому діапазоні (до 1,95 мкг/мл) та значно перевершувала мірамістин, який лише при 3,9 мкг/мл демонстрував 37% ефективності. Декаметоксин поступався Кс3 на всьому дослідженому діапазоні концентрацій.

Сполука Кс14 мала помірну протигрибкову дію з повільним збільшенням ефективності починаючи з концентрації 0,24 мкг/мл (5% штамів). При 0,48 мкг/мл вона інгібувала 11% штамів, при 0,98 мкг/мл – 16%, а при 1,95 мкг/мл – 42%. Зростання до 79% фіксувалося на 3,9 мкг/мл, а повне пригнічення – на 7,81 мкг/мл. Узагальнена ефективна концентрація (медіана) та MIK_{50} становили

3,9 мкг/мл, МІК₉₀ – 7,81 мкг/мл. У порівнянні з амфотерицином В активність була дещо нижчою в межах до 3,9 мкг/мл, однак перевага над флуконазолом і мірамістином була очевидною в усіх концентраціях.

Сполука Кс15 продемонструвала стабільний протигрибковий ефект. На концентраціях 0,48 і 0,98 мкг/мл рівень інгібування становив відповідно 11% і 16%, а при 1,95 мкг/мл він зростав до 53%. Повна інгібіція досягалася вже при 3,9 мкг/мл. Медіана та МІК₅₀ дорівнювали 1,95 мкг/мл, а МІК₉₀ – 3,9 мкг/мл. За динамікою активності Кс15 була ефективнішою декаметоксину, і значно перевершувала ефективність флуконазолу та мірамістину.

Сполука Кс16 в концентрації 0,48 мкг/мл інгібувала 21% штамів, а при 0,98 мкг/мл – 42%. Медіана і МІК₅₀ визначено в рохнцентрації 1,95 мкг/мл – 58%, а МІК₉₀ лише при 7,81 мкг/мл. Відносно антисептиків Кс16 перевершувала мірамістин на всьому діапазоні до 15,63 мкг/мл і демонструвала кращу ефективність за декаметоксин на ранніх стадіях (до 7,81 мкг/мл).

Сполука Кс22 продемонструвала високу ефективність щодо клінічних представників *C. krusei*. Концентрація 0,48 мкг/мл інгібувала 16% штамів, 0,98 мкг/мл – 32%, а при 1,95 мкг/мл частка чутливих до сполуки штамів досягала 74%. Повне інгібування досягалося при 3,9 мкг/мл, а медіана та МІК₅₀ становили 1,95 мкг/мл. У порівнянні з антимікотиками, Кс22 мала значно вищу активність за флуконазол, який лише при 15,63 мкг/мл демонстрував 16% інгібування. Порівняно з мірамістином, сполука перевершувала його на всьому діапазоні до 7,81 мкг/мл. Декаметоксин у цих концентраціях також виявляв нижчу ефективність (інгібував не більше 68% штамів при 7,81 мкг/мл).

Сполука Кр4 виявила поступову, але переконливу протигрибкову активність. Інгібування 5% штамів спостерігалось уже при 0,48 мкг/мл, 26% – при 0,98 мкг/мл, і 63% – при 1,95 мкг/мл. При концентрації 3,9 мкг/мл ефективність сягала 95%. Відповідно, медіана та МІК₅₀ становили 1,95 мкг/мл, а МІК₉₀ – 3,90 мкг/мл. За ефективністю сполука була значно активнішою за флуконазол і мірамістин, а декаметоксин поступався Кр4 у межах усіх критично важливих концентрацій (0,98-7,81 мкг/мл).

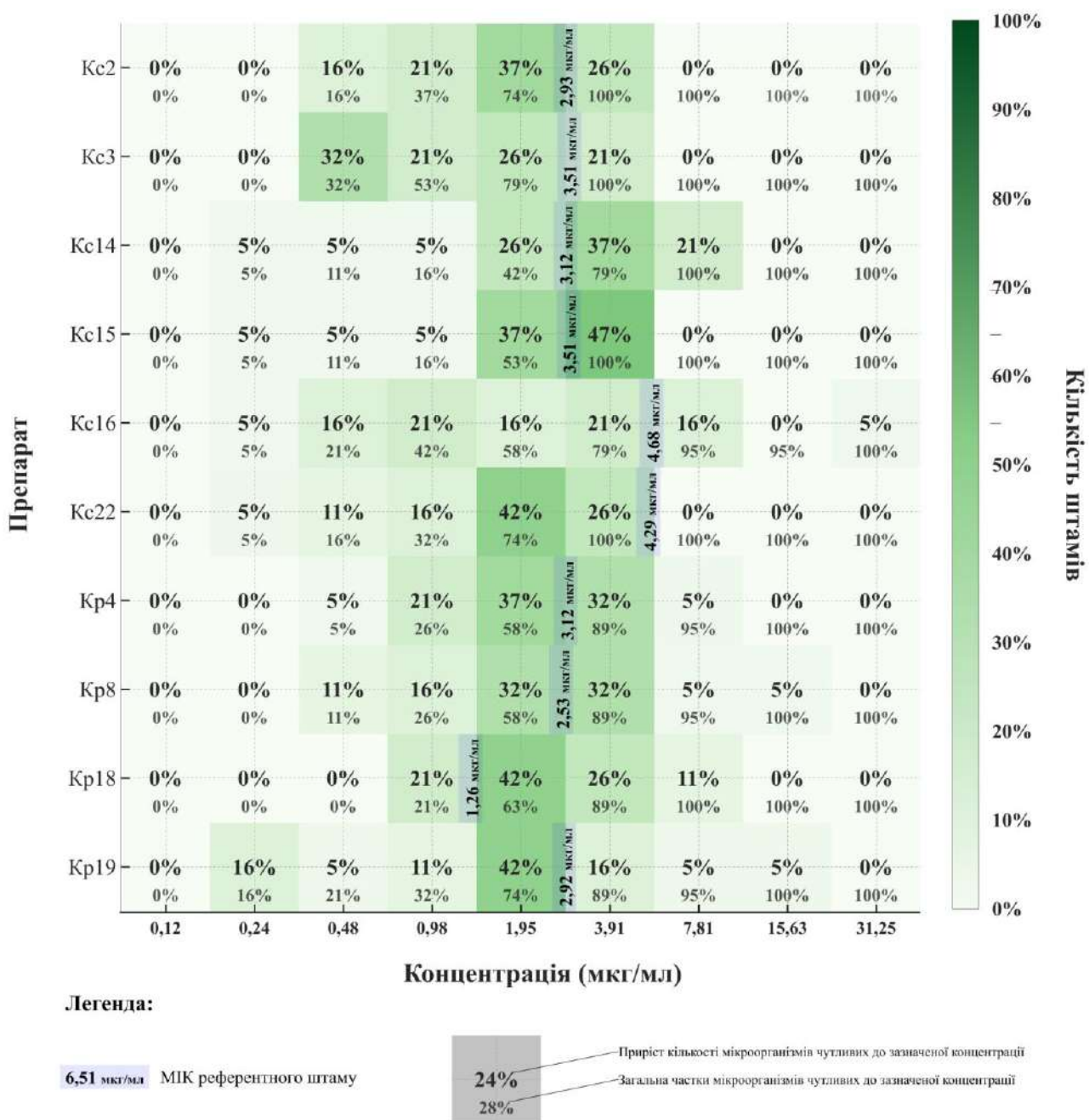


Рис. 4.11. Чутливість клінічних ізолятів *C. krusei* (n=19) до похідних четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію (метод серійних розведень)

Сполука Kr8 показала хороший протигрибковий ефект. Уже при 0,48 мкг/мл чутливість визначено в 11% штавів. Концентрація 0,98 мкг/мл інгібувала 26% ізолятів, а 1,95 мкг/мл – 58%. Медіана та МІК₅₀ становили 1,95 мкг/мл, а МІК₉₀ визначено в концентрації 7,81 мкг/мл. Порівняно з декаметоксином, Kr8 показала аналогічний або кращий профіль ефективності.

Сполука Kr18 проявила активність переважно у середньому

концентраційному діапазоні. При 0,98 мкг/мл чутливість визначено в 21% штамів, при 1,95 мкг/мл – 63%, а при 3,9 мкг/мл – 89%. Повне інгібування досягалося з 7,81 мкг/мл. Медіана та МІК₅₀ дорівнювали 1,95 мкг/мл, МІК₉₀ – 7,81 мкг/мл. За рівнем ефективності сполука перевершувала мірамістин і декаметоксин.

Сполука Кр19 проявила високу ефективність щодо досліджуваних ізолятів. В концентрації 0,24 мкг/мл вона пригнічувала 16% штамів, при 0,48 мкг/мл інгібувалося 21% штамів, а при 0,98 мкг/мл – 32%. Медіана та МІК₅₀ зафіксовано в концентрації 1,95 мкг/мл, а МІК₉₀ – при 7,81 мкг/мл. Сполука мала кращий профіль, ніж флуконазол, мірамістин і декаметоксин. Порівняно з амфотерицином В, Кр19 демонструвала схожі показники ефективності в концентрації 0,98-1,95 мкг/мл.

Визначення антифунгальних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо клінічних штамів C. glabrata.
Досліджувані сполуки продемонстрували високу активність щодо більшої частини вибірки *C. glabrata* (рис.4.12). Сполука Кс2 уже при концентрації 0,48 мкг/мл інгібувала 12% штамів, а при 0,98 мкг/мл – 24%. Концентрація 1,95 мкг/мл відповідала значенню медіани та МІК₅₀ інгібувала 65% штамів. Подальше підвищення концентрації до 3,9 мкг/мл забезпечувало інгібування 94% ізолятів. Порівняно з флуконазолом, який досягав лише 18% інгібування при 15,63 мкг/мл, Кс2 демонструвала суттєву перевагу вже на концентраціях до 2 мкг/мл. У межах 0,98–3,9 мкг/мл сполука перевершувала мірамістин та декаметоксин, які досягали аналогічного ефекту лише на значно вищих концентраціях.

Речовина Кс3 виявила виражену ефективність щодо кандид. У концентрації 0,98 мкг/мл спостерігалось 29% інгібування, на рівні 1,95 мкг/мл сполука пригнічувала 71% штамів, а при 3,9 мкг/мл – 94%. Кс3 суттєво перевищувала ефективність мірамістину, який при 1,95 мкг/мл інгібував лише 12% штамів. У діапазоні 1,95-3,9 мкг/мл сполука продемонструвала вищу

ефективність ніж декаметоксин.

Сполука Кс14 продемонструвала антифунгальний ефект в концентрації 0,48 мкг/мл Пригнічуючи 18% штамів. Підвищення концентрації до значення при 0,98 мкг/мл спричиняло збільшення частки чутливих до сполуки штамів до 29%. Концентрація 1,95 мкг/мл була ефективною щодо 65%, а 3,9 мкг/мл – 94%. Медіана та МІК₅₀ визначено в концентрації 1,95 мкг/мл, а МІК₉₀ – 3,9 мкг/мл. Сполука значно перевершувала ефективність ністатину на концентраціях до 2 мкг/мл та продемонструвала вищу активність ніж мірамістин і декаметоксин у діапазоні 1,95-7,81 мкг/мл.

Речовина Кс15 демонструвала схожу динаміку з Кс14. Інгібування 12% штамів відзначалося вже при 0,48 мкг/мл, при 0,98 мкг/мл – 24%, а при 1,95 мкг/мл – 65%. Концентрація 3,9 мкг/мл пригнічувала 94% штамів *C. glabrata*. За рівнем протигрибкової активності сполука перевершувала флуконазол, мірамістин і декаметоксин.

Сполука Кс16 показала поступове нарощування активності: в концентрації 0,48 мкг/мл вона інгібувала 6% штамів, збільшення частки чутливих до сполуки ізолятів до 29% спостерігалось при 0,98 мкг/мл, а до 59% – при 1,95 мкг/мл. На рівні 3,9 мкг/мл інгібувалось 94% штамів, що відповідало значенню МІК₉₀. У порівнянні з антисептиками, ця сполука демонструвала вищу ефективність, але поступалась ефективності антибіотиків полієнової групи.

Речовина Кс22 виявила помітну ефективність, забезпечуючи інгібування 24% штамів при 0,48 мкг/мл, 35% – при 0,98 мкг/мл, і 53% – при 1,95 мкг/мл. Відповідно до цих результатів, медіана і МІК₅₀ становили 1,95 мкг/мл, МІК₉₀ відповідав концентрації на рівні 3,9 мкг/мл, яка пригнічувала всю вибірку тест-мікроорганізмів. Кс22 переважала флуконазол, мірамістин і декаметоксин на всьому дослідженому діапазоні концентрацій, демонструючи швидке досягнення повного ефекту.

Сполука Кр4 виявила чітку протигрибкову активність. Уже при 0,48, мкг/мл визначено чутливість для 18% штамів, а при 0,98 мкг/мл цей показник зріс до 29%. Концентрація 1,95 мкг/мл інгібувала 59% ізолятів, а

3,9 мкг/мл – 94%. Відповідно, медіана та МІК₅₀ для сполуки становили 1,95 мкг/мл, а МІК₉₀ – 3,9 мкг/мл. Сполука продемонструвала вищу активність ніж флуконазол та антисептичні препарати, поступаючись лише полієновим антибіотикам.

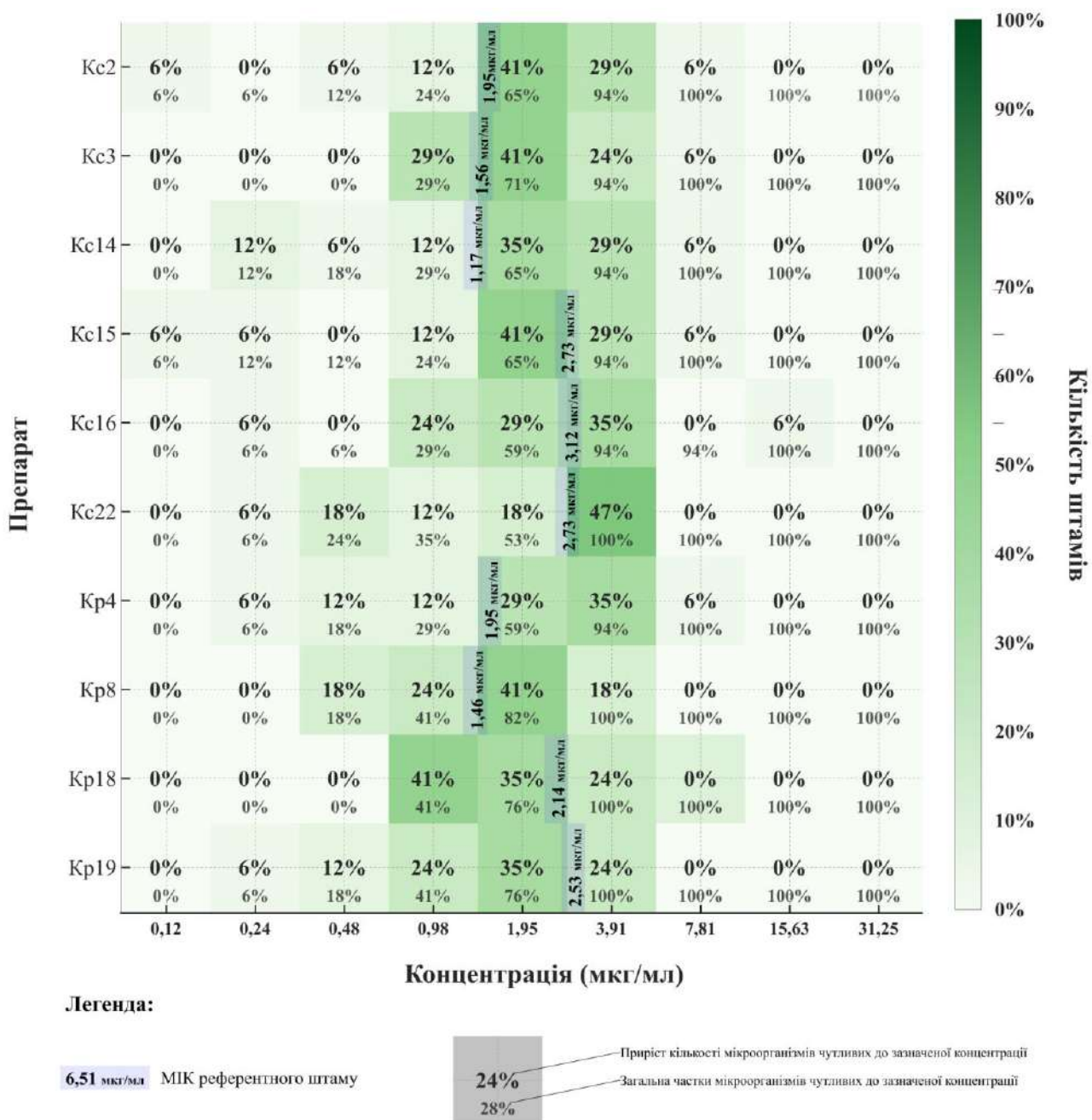


Рис. 4.12. Чутливість клінічних ізолятів *C. glabrata* (n=17) до похідних четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію (метод серійних розведень)

Досліджувана сполука Кр8 була однією з найактивніших серед протестованих. Уже при концентрації 0,48 мкг/мл вона інгібувала 18% штамів,

41% – при 0,98 мкг/мл і 82% – при 1,95 мкг/мл. Медіана та МІК₅₀ становили 1,95 мкг/мл, а МІК₉₀ – 3,9 мкг/мл. Сполука продемонструвала антифунгальну активність співставну з АмВ.

Речовина Кр18 проявила високу активність на середніх концентраціях. При 0,98 мкг/мл сполукою пригнічувалось 41% штамів, при 1,95 мкг/мл частка чутливих зростала до 76%, а при 3,9 мкг/мл досягала повного пригнічення вибірки. Повна інгібіція досягалася при 3,9 мкг/мл. Медіана і МІК₅₀ становили 1,95 мкг/мл, МІК₉₀ – 3,90 мкг/мл. У порівнянні з флуконазолом, що практично не мав активності до 15,63 мкг/мл, сполука виявлялася значно ефективнішою навіть при вдвічі менших дозах. Перевага над мірамістином і декаметоксином також була очевидною при 1,95-3,9 мкг/мл.

Сполука Кр19 демонструвала стабільну активність щодо вибірки *C. glabrata*. При 0,48 мкг/мл протигрибкову дію визначено щодо 18% штамів, при 0,98 мкг/мл – до 41%, а при 1,95 мкг/мл чутливість визначено у 76% ізолятів. Значення медіани та МІК₅₀ відповідали концентрації 1,95 мкг/мл, в МІК₉₀ – 3,90 мкг/мл. Ефективність сполуки поступалась АмВ та ністатину, проте Кр19 показала вищу активність при всіх досліджених концентраціях щодо інших препаратів.

У дослідженні активності сполук проти *C. auris* найвищу ефективність продемонстрували Кс14, Кр18 та Кр19 (рис. 4.13). Сполука Кс14 мала середнє значення МІК $2,54 \pm 0,14$ мкг/мл, медіану та МІС₅₀ на рівні 1,95 мкг/мл, що свідчить про чутливість ізолятів до нижчих концентрацій речовини. Це була одна з небагатьох сполук, що забезпечувала ефективність на рівні, порівнюваному з декаметоксином. Кр18 показала стабільно високу активність із середнім значенням МІК $3,51 \pm 0,10$ мкг/мл, МІС₅₀ та медіаною 3,90 мкг/мл, при найнижчій варіабельності ($SD_p = 0,78$), що підкреслює її передбачуваність і стабільність. Подібні показники мала і Кр19, для якої середнє значення МІК становило $4,29 \pm 0,23$ мкг/мл, а МІС₅₀ та медіана також дорівнювали 3,90 мкг/мл. Високу ефективність також продемонструвала Кр8, із середнім значенням МІК $4,68 \pm 0,19$ мкг/мл, МІС₅₀ – 3,90 мкг/мл.

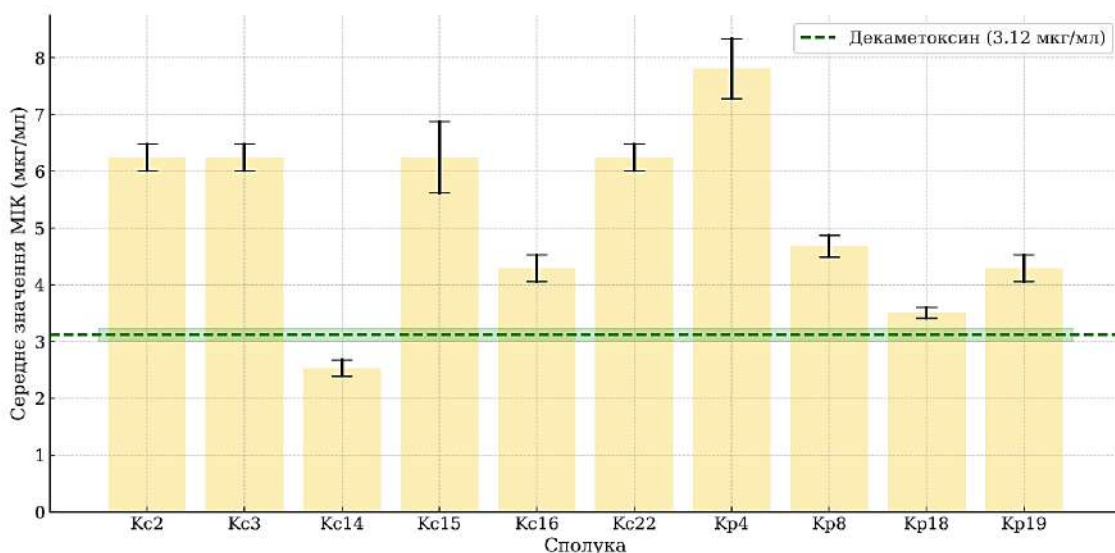


Рис. 4.13. Чутливість клінічних ізолятів *C. auris* (n=5) до похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію (метод серійних розведень)

У той час як деякі сполуки виявили помірну активність, як-от Kc15 ($6,25 \pm 0,63$ мкг/мл, $MIC_{50} = 3,90$ мкг/мл), найменш ефективними проти *C. auris* виявилися Kc2, Kc3, Kc22 – усі з однаковими середніми значеннями МІК $6,25 \pm 0,24$ мкг/мл, медіаною та MIC_{50} 7,81 мкг/мл. Аналогічний рівень ефективності мав Kp4, із середнім значенням МІК $7,81 \pm 0,53$ мкг/мл, що свідчить про недостатню протигрибкову активність у порівнянні з більш перспективними сполуками.

4.2 Скринінгове дослідження протиамебної активності четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію

У ході деталізованого скринінгу методом дискодифузії було протестовано 52 сполуки четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію. Аналіз проводили у трикратному повторенні з вимірюванням діаметру зони інгібування, що відображає ступінь протипротозойної активності кожної речовини (рис. 4.14). Найбільшу активність продемонстрували сполуки Kc10, Kc11, Kc19 та Kc15. Для Kc10 середній діаметр зони пригнічення становив $24,67 \pm 0,67$ мм. На ідентичному рівні проявилась активність сполуки Kc11 ($24,33 \pm 0,33$ мм). Kc19 та Kc15 формувала зони інгібування із середнім значенням $20,00 \pm 0,58$ мм.

Подібну антипротозойну активність продемонстрували сполуки Кр9, Кс14 та Кс22, зони пригнічення бляшкоутворення визначено в діапазоні 19-20 мм, що дозволяє розглядати ці речовини як потенційно ефективні. Зони інгібування бляшкоутворення в межах 15-17 мм були зафіксовані для восьми сполук. У 13 сполук було відзначено слабку активність, зони затримки росту не перевищували 14 мм. Такий рівень ефективності свідчить про потребу подальшої оптимізації їх хімічної структури.



Рис. 4.14. Феномен пригнічення бляшкоутворення навколо лунок з препаратом (сполука Кс22)

У 24 із 52 досліджених сполук не було виявлено жодної протипротозойної активності. Це становить 46% від загальної кількості тестованих речовин. В усіх трьох повтореннях для цих речовин зони інгібування були відсутні, що свідчить про повну неефективність щодо модельної системи амебоцитів у використаних концентраціях.

Таким чином, скринінг методом дифузії в агарі дозволив ідентифікувати групу активних сполук із чітко вираженою або помірною інгібуючою дією. Найперспективнішими з них виявилися Кс10, Кс11, Кс19. Результати скринінгу дискодифузійним методом продемонстровано на рисунку 4.15.

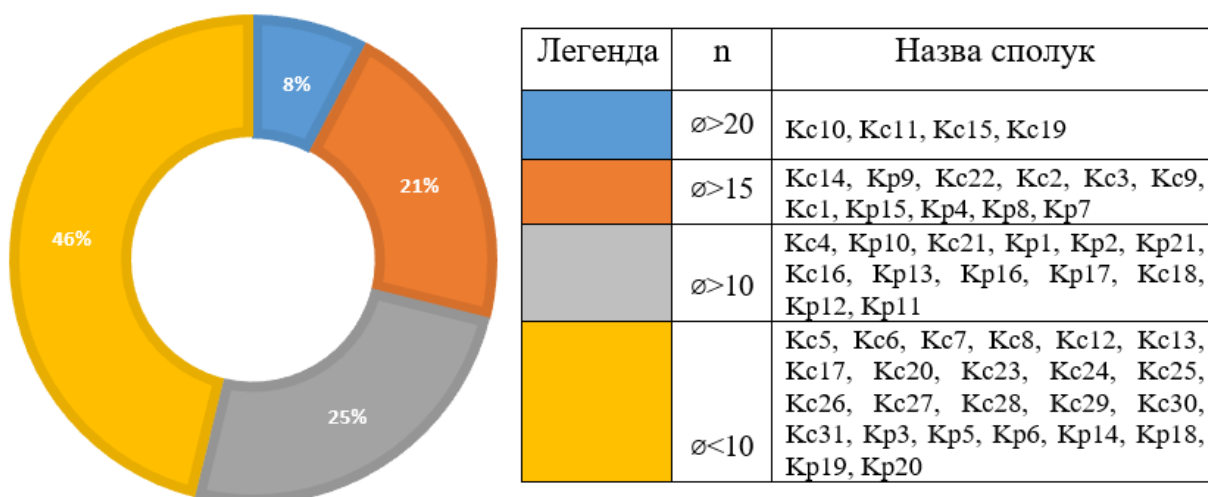


Рис. 4.15. Результати визначення антипротозойної активності арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей (мм)

Застосування методу серійних розведень у твердому поживному середовищі дозволяє кількісно порівняти активність різних сполук в умовах, максимально наближених до колоніального росту збудника. Результати доповнюють дані класичного методу дифузії в агар та дозволяють уточнити профіль чутливості до активних сполук (рис. 4.16).

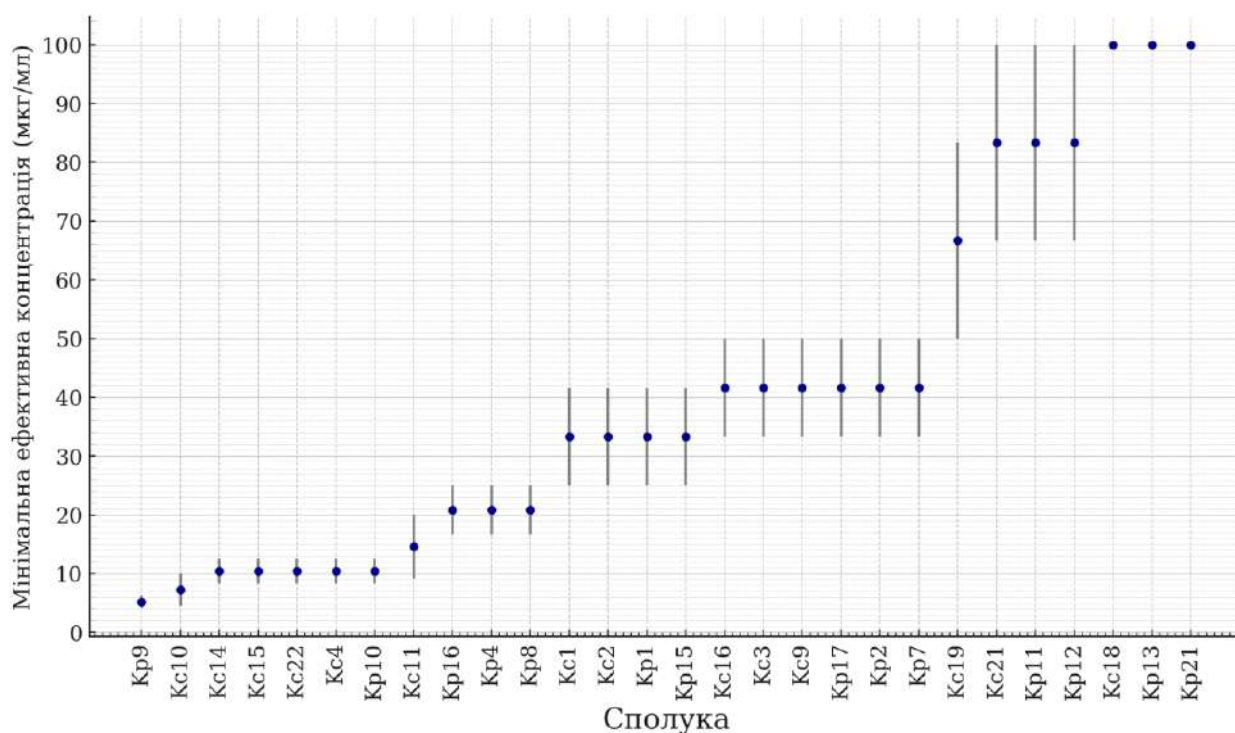


Рис. 4.16. Результати методу серійних розведень у твердому поживному середовищі шляхом визначення мінімальної концентрації сполук, що

утворювали зони пригнічення бляшкоутворення понад 10 мм ($m \pm SD$, мкг/мл)

Серед сполук найвищу активність продемонструвала Кс19, яка забезпечувала утворення зони інгібування діаметром 10 мм при концентрації $5,21 \pm 1,04$ мкг/мл. Близький результат продемонструвала Кс10, найменша активна концентрація становила $7,29 \pm 2,76$ мкг/мл. Отриманий результат підтверджує перспективність даних арил ациклічних аміноспиртів щодо модельного мікроорганізму.

Одразу п'ять сполук продемонстрували третій за значенням результат, зони пригнічення бляшкоутворення діаметром 10 мм визначено в концентрації $10,42 \pm 2,08$ мкг/мл. Граничне значення затримки бляшкоутворення у концентрації до 15 мкг/мл визначено у ще у однієї сполуки (Кс11, яка продукувала зону пригнічення бляшкоутворення понад 20 мм у вихідній концентрації).

Помірну активність зі значенням мінімальної концентрацією в діапазоні 20-35 мкг/мл продемонстрували сім сполук. Ще для шести сполук це значення визначено в концентрації до 50 мкг/мл. Інші сім сполук досягали граничного значення затримки в концентраційному діапазоні 50-100 мкг/мл.

Висновки до розділу 4

1. У процесі скринінгу методом дифузії в агар підтверджено антифунгальну активність 44 з 52 досліджених четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо *Candida albicans* ATCC 10231. Найвищий інгібуючий ефект зафіксовано у сполук, що утворювали зони затримки понад 20 мм, зокрема Кс20, Кс5, Кс6 та Кс7. Щодо *Aspergillus niger* ATCC 704 ефективність була нижчою, проте 17 сполук створювали зони діаметром понад 10 мм. Скринінг дозволив відібрати найбільш активні речовини для якісного аналізу.

2. У результаті дослідження методом серійних розведень у рідкому середовищі RPMI-1640 встановлено, що для *C. albicans* МІК активних сполук коливались у межах 1,36–3,12 мкг/мл (Кс15, Кс2, Кс16, Кс14, Кр8, Кр19). За

цими показниками активність досліджуваних солей була співставною або вищою за ефективність ністатину (МІК $2,53 \pm 0,76$ мкг/мл), і перевищувала декаметоксин ($6,25 \pm 1,24$ мкг/мл). Значення МІК₉₀ найбільш активних сполук не перевищували 3,90 мкг/мл, що свідчить про стабільну інгібуючу дію в межах клінічно релевантних концентрацій.

3. Щодо *A. niger* найвищу активність продемонстрували Кр19, Кс14, Кр8 та Кр16 з МІК у межах 3,12-5,46 мкг/мл. Враховуючи відмінності біології пліснявих грибів, отримані значення свідчать про потенціал обраних речовин у якості основи для антимікотичних засобів широкого спектра дії.

4. При дослідженні музейних штамів *Candida non-albicans* виявлено високий рівень чутливості *C. parapsilosis*, *C. kefir*, *C. utilis* до низки сполук. Наприклад, Кс14 продемонструвала МІК $0,31 \pm 0,09$ мкг/мл проти *C. parapsilosis* і $0,53 \pm 0,15$ мкг/мл проти *C. kefir*. Кс15 виявила подібну активність ($0,34 \pm 0,08$ мкг/мл – *C. kefir*), а Кр8 – $0,38 \pm 0,08$ мкг/мл – *C. parapsilosis*. Значення МІК₉₀ для найактивніших речовин не перевищували 3,90 мкг/мл, що дозволяє порівнювати їх із амфотерицином В.

5. Аналіз чутливості клінічних ізолятів *C. albicans* показав, що найактивніші сполуки (Кс2, Кс3, Кс14, Кс15, Кр8, Кр19) мали медіанні значення МІК 0,98-1,95 мкг/мл. Значення МІК₉₀ для цих речовин становили 3,90 мкг/мл. За ефективністю вони перевищували ністатин (МІК₅₀ = 0,98 мкг/мл, МІК₉₀ = 3,90 мкг/мл) та декаметоксин, а в окремих випадках наближалися до АмВ.

6. У межах дослідження ізолятів *C. krusei*, сполуки Кс2, Кс3, Кс14, Кс22, Кр8, Кр19 мали медіанну МІК 1,95 мкг/мл та МІК₉₀ на рівні 3,90-7,81 мкг/мл. Це відповідає ефективності ністатину та суттєво перевершує декаметоксин, який демонстрував МІК₉₀ 7,81 мкг/мл лише для 68% ізолятів. З урахуванням відомої природної толерантності цього виду, сполуки демонструють клінічно значущий рівень активності.

7. Для ізолятів *C. glabrata* досліджувані речовини виявили медіанну МІК на рівні 1,95 мкг/мл, а значення МІК₉₀ – 3,90 мкг/мл. Отримані дані були зіставними з ефективністю ністатину (МІК₉₀ = 1,95 мкг/мл) та перевищували

показники декаметоксину і мірамістину. Сполуки Кс3, Кс14, Кс15, Кр4, Кр8 та Кр19 демонстрували найстабільніші результати в межах усього діапазону концентрацій.

8. У межах аналізу клінічних ізолятів *C. auris*, сполуки Кс14, Кр18 і Кр19 мали медіанну МІК на рівні 3,90 мкг/мл. Найнижчий середній показник зафіксовано для Кс14 – $2,54 \pm 0,14$ мкг/мл. Значення МІК₅₀ варіювали в межах 3,90-7,81 мкг/мл, що є конкурентоспроможним у порівнянні з декаметоксином (МІК₅₀ = 3,90 мкг/мл). На тлі низької ефективності амфотерицину В та ністатину щодо цього збудника, відібрані четвертинні солі демонструють важливу альтернативну активність.

9. Серед досліджених четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію найбільш перспективними з точки зору антимікотичної активності є такі сполуки:

- Кс14 – демонструє стабільну інгібуючу активність щодо *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. kefir* та *C. auris*, з медіанними значеннями МІК у межах 0,31-1,95 мкг/мл. За ефективністю ця сполука не поступається АмВ і суттєво перевищує активність ністатину та декаметоксину у відповідних тестах.

- Кс15 – виявила найнижчі значення МІК щодо *C. albicans* ($1,36 \pm 0,31$ мкг/мл) та *C. kefir* ($0,34 \pm 0,08$ мкг/мл), а для клінічних ізолятів медіанна МІК становила 1,95-3,90 мкг/мл. Результати свідчать про ефективність сполуки, співставну з полієновими антибіотиками, з перевагою над антисептичними засобами.

- Кр8 – охоплює широкий спектр активності щодо *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* та *C. auris*, з медіанною МІК у межах 0,38-1,95 мкг/мл. У порівнянні з декаметоксином і мірамістином сполука виявила вищу активність у більшості тест-систем.

- Кр18 – проявила виражену активність проти *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. lusitanae*, а також *C. auris* і *A. niger*, з медіанною МІК 1,95-3,90 мкг/мл. Профіль ефективності є стабільним і порівнюваним з ністатином, особливо у

випадках non-albicans штамів.

- Кр19 – забезпечила активність щодо *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. auris* та *A. niger*, з медіанною МІК 1,95-3,90 мкг/мл. Ефективність сполуки відповідає рівню Кр8 і Кр18 та перевищує показники антисептичних препаратів у відповідних концентраційних діапазонах.

10. У ході скринінгу методом дискодифузії встановлено, що 28 із 52 досліджених четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію (54%) виявили протипротозойну активність щодо модельної культури акантамеб. Найвищу інгібуючу здатність продемонстрували сполуки Кс10, Кс11, Кс15 та Кс19, зони затримки росту яких перевищували 20 мм, що свідчить про їх значний вплив на життєдіяльність протистів.

11. Метод серійних розведень у твердому середовищі дозволив кількісно оцінити активність лідируючих сполук, підтвердивши, що найнижчі ефективні концентрації виявлені у Кс19 ($5,21 \pm 1,04$ мкг/мл) та Кс10 ($7,29 \pm 2,76$ мкг/мл). Отримані значення свідчать про виражену активність цих сполук навіть у низьких дозах, що підвищує їхню фармакологічну цінність.

12. За сукупністю результатів найбільш ефективними й перспективними для подальшого вивчення є Кс19, Кс10 та Кс11, які поєднують високий рівень інгібуючої дії з низькими ефективними концентраціями. Це дозволяє виділити їх як пріоритетні кандидати для подальших доклінічних досліджень у напрямку протипротозойної терапії.

Результати досліджень представлені в даному розділі викладені в публікаціях [200, 202, 206, 215-219].

РОЗДІЛ 5

ФАРМАКОЛОГІЧНА ОЦІНКА ЧЕТВЕРТИННИХ СОЛЕЙ АРИЛОКСИЕТОКСИ ДІАЛКІЛ АМОНІЮ *IN VITRO*

5.1 Оцінка фармакодинамічних властивостей четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію

Оцінка фармакологічних властивостей нових антимікробних агентів є ключовим етапом доклінічних досліджень, що визначає як їхню терапевтичну ефективність, так і безпеку застосування. Зокрема, фармакодинамічні моделі *in vitro* – такі як *time-kill* крива та постантибіотичний ефект (PAE/PAFE) – дозволяють визначити швидкість, тривалість та характер мікробіцидної дії препаратів у часовій динаміці, що має важливе значення для раціонального підбору режимів дозування [220, 221]. З цією метою, з урахуванням отриманих результатів антимікробної активності розраховано робочі концентрації сполук для дослідження фармакодинаміки речовин (табл.5.1).

Таблиця 5.1.

Робочі концентрації четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію, обрані для фармакодинамічного дослідження *in vitro*

Сполука	$\frac{1}{4} \times \text{МІК}$	$1 \times \text{МІК}$	$2 \times \text{МІК}$
<i>S. aureus</i> ATCC 25923			
Кс22	0,29	1,17	2,34
Кс1	0,39	1,56	3,12
Кс3	0,39	1,56	3,12
Кс2	0,54	2,14	4,28
Кс15	0,58	2,34	4,68
Кр18	0,68	2,73	5,46
Кс4	0,68	2,73	5,46
Кр16	0,68	2,73	5,46
Кр19	0,78	3,12	6,24
Кр10	0,88	3,51	7,02

продовження таблиці 5.1

<i>Ent. faecalis</i> ATCC 29212			
Kp10	0,14	0,58	1,16
Kp19	0,44	1,76	3,52
Kp8	0,54	2,15	4,3
Kc2	0,58	2,34	4,68
Kp18	0,64	2,54	5,08
Kc23	0,68	2,72	5,44
Kc1	0,78	3,12	6,24
Kc3	0,78	3,12	6,24
Kc4	0,78	3,12	6,24
Kc22	0,98	3,9	7,8
<i>C. albicans</i>			
Kc2	0,39	1,56	3,12
Kc3	0,78	3,12	6,24
Kc14	0,68	2,73	5,46
Kc15	0,34	1,36	2,72
Kc16	0,48	1,94	3,88
Kc22	0,58	2,34	4,68
Kp4	0,68	2,73	5,46
Kp8	0,68	2,73	5,46
Kp18	0,68	2,73	5,46
Kp19	0,78	3,12	6,24

Водночас, враховуючи ризики токсичного впливу на клітини-господарі, паралельне дослідження цитотоксичності на лініях еукаріотичних клітин, таких як HEp-2, є обов'язковим компонентом комплексної оцінки фармакологічного профілю сполуки [222].

5.1.1 Аналіз кінетики «time-kill» похідних четвертинних солей арилоксиетокси диалкіл амонію щодо чутливих референтних штамів в умовах *in vitro*

Оцінка кінетики антимікробної дії лікарських засобів є важливим інструментом при доклінічному вивченні нових сполук з потенційною

терапевтичною активністю. Одним із найбільш інформативних методів, що дозволяє кількісно охарактеризувати динаміку впливу антимікробного агента на бактеріальні популяції в часі, є метод дослідження кривих «time-kill» (*time-kill assay*). Цей підхід базується на серійному визначенні життєздатності мікроорганізмів після інкубації з досліджуваною речовиною впродовж певного часового інтервалу, що дозволяє не лише встановити інгібуючий ефект, але й оцінити його швидкість і тривалість [223].

Оцінка *time-kill assay* арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей щодо референтного штаму *S. aureus* ATCC 25923 *in vitro*. Аналіз динаміки змін кількості життєздатних клітин *S. aureus* під впливом четвертинних амонієвих солей засвідчив чітку залежність антимікробної активності від концентрації сполук і часу експозиції. Контрольна крива без впливу досліджуваних речовин (К) демонструвала стабільне зростання бактеріальної популяції: від початкового рівня 9,43 log₁₀(CFU) до 18,75 log₁₀(CFU) на 24-й годині інкубації (рис. 5.1).

Сполука Кс1 проявила виразну концентраційно-залежну антимікробну активність щодо *S. aureus*. У концентрації 1/4×МІК вже на 1-й годині експозиції спостерігалось зниження кількості життєздатних клітин до 8,55 log₁₀(CFU), а на 2-й годині – до 7,68 log. Однак у подальші часові точки зафіксовано поступове відновлення росту: 8,79 log на 4-й годині, 9,74 log на 8-й та 10,54 log на 24-й, що свідчить про транзиторний характер дії при такій концентрації – тимчасове пригнічення росту без повної ерадикації популяції. Застосування Кс1 у концентрації 1×МІК супроводжувалося більш вираженим антимікробним ефектом: на 1-й годині кількість життєздатних клітин знижувалася до 5,94 log, на 2-й – до 3,79 log, а з 4-ї години фіксувалася повна відсутність колонієутворюючих одиниць (0,00 log), що свідчить про реалізацію бактерицидної дії. У концентрації 2×МІК ефект був ще інтенсивнішим: вже на 1-й годині рівень життєздатності знижувався до 5,01 log, а з 2-ї години спостерігалася повна загибель мікроорганізмів (0,00 log), що вказує на швидкий та стійкий бактерицидний ефект. Отже, сполука Кс1 демонструє надійну

бактерицидну активність при концентраціях $1 \times \text{МІК}$ і вище, забезпечуючи повну ерадикацію *S. aureus* протягом перших 4 годин. Натомість у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ ефект є лише частковим і тимчасовим, з відновленням росту бактерій у подальші часові інтервали ($p < 0,0001$).

Сполука Кс2 продемонструвала обмежену антимікробну активність у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ проти *S. aureus*. Початковий рівень життєздатності ($9,43 \log_{10}(\text{CFU})$) залишався практично незмінним упродовж перших 2 годин експозиції: $9,80 \log$ на 1-й годині та $8,71 \log$ на 2-й. Подальше зростання чисельності клітин – $9,37 \log$ на 8-й годині та $11,55 \log$ на 24-й – свідчить про відсутність інгібуючої дії при низькій концентрації. У концентрації $1 \times \text{МІК}$ ефект був значно виразнішим: на 1-й годині кількість життєздатних клітин знижувалась до $7,48 \log$, на 2-й – до $3,58 \log$, а на 4-й – до $3,45 \log$. У наступні часові точки фіксувалась прогресивна загибель мікроорганізмів: $1,45 \log$ на 8-й годині та повна відсутність КУО ($0,00 \log$) на 24-й, що вказує на реалізацію бактерицидної дії впродовж доби. У концентрації $2 \times \text{МІК}$ ефект був ще швидшим: вже на 1-й годині життєздатність знижувалася до $4,99 \log$, після чого на всіх наступних часових точках (2, 4, 8 і 24 години) фіксувалась повна елімінація бактерій ($0,00 \log$), що свідчить про швидку та стійку бактерицидну дію ($p < 0,0001$). Таким чином, Кс2 демонструє дозозалежну антимікробну активність: при концентраціях $1 \times \text{МІК}$ і вище забезпечується повна ерадикація бактеріальної популяції, тоді як при $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ спостерігається відсутність пригнічення росту.

Речовина Кс3 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ продемонструвала лише короточасну антимікробну дію щодо *S. aureus*. Початкове значення життєздатності ($9,43 \log_{10}(\text{CFU})$) знижувалось до $7,51 \log$ на 1-й годині та до $6,11 \log$ на 2-й. Проте вже на 4-й годині спостерігалось різке відновлення росту – $9,18 \log$, що послідовно прогресувало до $11,34 \log$ на 8-й та $12,61 \log$ на 24-й годині, свідчаючи про нестійкість ефекту та відсутність бактерицидної дії при низькій дозі. У концентрації $1 \times \text{МІК}$ спостерігалось впевнене зниження кількості життєздатних клітин: $4,87 \log$ на 1-й годині, $4,41 \log$ на 2-й, із наступною повною

загибеллю популяції на 4-й годині. Застосування $2\times\text{МІК}$ посилювало ефект: $3,56 \log$ на 1-й годині, після чого вже з 2-ї години реєструвалась повна відсутність колонієутворюючих одиниць ($p<0,0001$).

Сполука Кс4 при впливі на *S. aureus* у концентрації $\frac{1}{4}\times\text{МІК}$ демонструвала помірну транзиторну активність. Первинне зниження життєздатності з $9,43 \log_{10}(\text{CFU})$ до $7,80 \log$ на 1-й годині та $6,43 \log$ на 2-й свідчило про певну антимікробну дію, проте вже на 4-й годині фіксувалося зростання до $7,59 \log$, що продовжувалося на 8-й ($9,65 \log$) та 24-й ($11,28 \log$), вказуючи на відсутність стійкого ефекту. У концентрації $1\times\text{МІК}$ пригнічення росту було більш вираженим і тривалим: $4,94 \log$ на 1-й годині, $3,91 \log$ на 2-й, $3,00 \log$ на 4-й, із повною елімінацією бактерій, починаючи з 8-ї години. При $2\times\text{МІК}$ бактерицидна дія розвивалась швидше – після зниження життєздатності до $4,72 \log$ на 1-й годині вже з 2-ї години спостерігалась повна загибель клітин ($p<0,0001$).

Сполука Кс15 демонструвала м'який, але стійкий інгібуючий вплив на *S. aureus* при концентрації $\frac{1}{4}\times\text{МІК}$. Початкове значення життєздатності ($9,43 \log_{10}(\text{CFU})$) вже на 1-й годині знижувалося до $7,83 \log$, що свідчить про виражений ранній ефект. На 2-й годині фіксувалося подальше, хоча й менш виражене пригнічення – до $6,76 \log$. Надалі показники залишалися відносно стабільними: $7,17 \log$ на 4-й, $7,87 \log$ на 8-й та $8,88 \log$ на 24-й годині, що вказує на неповну реалізацію антимікробної дії та відновлення життєздатної популяції. У концентрації $1\times\text{МІК}$ життєздатність знижувалася суттєвіше: $5,96 \log$ на 1-й годині, $3,96 \log$ на 2-й, із повним зникненням колонієутворюючих одиниць із 4-ї години. Застосування $2\times\text{МІК}$ посилювало ефект – вже на 1-й годині показник становив $3,57 \log$, а на 2-й спостерігалась повна загибель клітин. Ефективність Кс15 полягає у здатності забезпечувати швидку й повну ерадикацію бактерій у концентраціях від $1\times\text{МІК}$, тоді як при нижчій дозі спостерігається лише контрольований тимчасовий вплив на популяцію ($p<0,0001$).

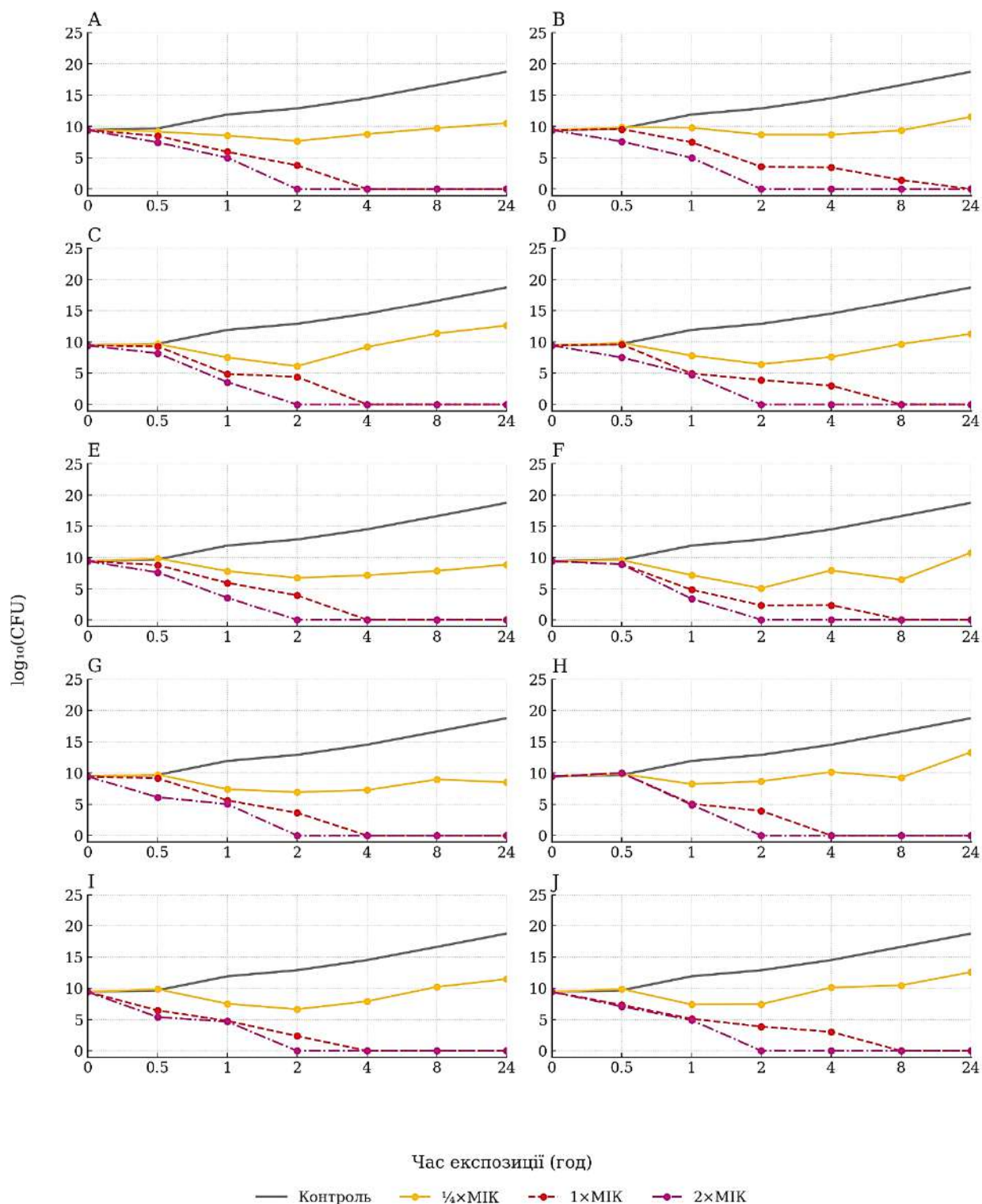


Рис. 5.1. Time-kill крива життєздатності *S. aureus* ATCC 25923 за дії арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей (А – Кс1, В – Кс2, С – Кс3, D – Кс4, Е – Кс15, F - Кс22, G – Кр10, Н – Кр16, I – Кр18, J – Кр19) у трьох концентраціях ($\frac{1}{4}$ ×МІК, 1×МІК, 2×МІК) протягом 24 годин інкубації.

Речовина Кс22 виявила порівняно слабкий інгібуючий ефект щодо *S. aureus* у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$. Початкове значення життєздатності ($9,43 \log_{10}(\text{CFU})$) знижувалося до $7,19 \log$ на 1-й годині та $5,10 \log$ на 2-й, однак подальші часові точки засвідчили активне відновлення росту: до $10,79 \log$ на 24-й годині. При використанні $1 \times \text{МІК}$ ефект був більш вираженим і стійким – $4,85 \log$ на 1-й годині, $2,37 \log$ на 2-й, із повним припиненням росту з 4-ї години ($0,00 \log$). Подібну динаміку спостерігали й при $2 \times \text{МІК}$, проте антимікробна дія реалізовувалася швидше: $3,41 \log$ на 1-й годині та повна елімінація життєздатної мікрофлори з 2-ї години. Таким чином, антимікробна активність Кс22 є дозозалежною, однак недостатньо стійкою при мінімальних концентраціях, що обмежує її ефективність у режимах з низьким дозовим навантаженням ($p < 0,0001$).

У Кр10 дія у низькій концентрації ($\frac{1}{4} \times \text{МІК}$) зумовлювала зниження життєздатності до $7,39 \log$ на 1-й годині та до $6,93 \log$ на 2-й. Проте подальші часові точки свідчать про поступове зростання кількості життєздатних клітин: $7,55 \log$ на 4-й, $8,10 \log$ на 8-й і $8,51 \log$ на 24-й годині, що вказує на транзиторий характер ефекту без стійкого інгібування росту. При застосуванні $1 \times \text{МІК}$ життєздатність знижувалася суттєвіше: $5,61 \log$ на 1-й годині, $3,63 \log$ на 2-й, із повною загибеллю мікроорганізмів з 4-ї години. Водночас концентрація $2 \times \text{МІК}$ забезпечувала ще швидше пригнічення: $5,01 \log$ на 1-й годині та повне інгібування з 2-ї. Така кінетика свідчить про концентраційно-залежний бактерицидний ефект Кр10, при цьому рівень $1 \times \text{МІК}$ є достатнім для досягнення повної ерадикації культури ($p < 0,0001$).

Сполука Кр16 виявила нестабільну інгібуючу активність при концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$. Життєздатність клітин знижувалась незначно – до $8,22 \log$ на 1-й годині та $8,67 \log$ на 2-й, однак уже на 4-й годині показник досягав $10,16 \log$. Незначне зменшення до $9,26 \log$ на 8-й годині не змінювало загальної тенденції: на 24-й годині життєздатність зростала до $13,32 \log$, що вказує на слабкий і нестійкий бактеріостатичний ефект із подальшим активним розмноженням бактерій. У концентрації $1 \times \text{МІК}$ дія була значно ефективнішою:

5,06 log на 1-й годині, 3,94 log на 2-й, а з 4-ї години фіксувалася повна загибель мікроорганізмів. При $2\times\text{МІК}$ ефект проявлявся ще швидше – 4,90 log на 1-й годині та 0,00 log з 2-ї. Така динаміка дозволяє розглядати Кр16 як перспективну сполуку з вираженим бактерицидним потенціалом, ефективність якої напряду залежить від досягнення мінімального критичного рівня концентрації ($p<0,0001$).

Кр18 при впливі на стафілококи у концентрації $\frac{1}{4}\times\text{МІК}$ виявила лише обмежену антимікробну активність. Життєздатність знижувалась до 7,53 log на 1-й годині та 6,65 log на 2-й, однак далі показники поступово зростали: 7,92 log на 4-й, 10,22 log на 8-й та 11,47 log на 24-й годині, що свідчить про нестійкий транзиторний ефект ($p<0,0001$). Натомість при $1\times\text{МІК}$ спостерігалось виразне зниження кількості життєздатних клітин – 4,79 log на 2-й годині, 2,36 log на 4-й, після чого колонієутворюючі одиниці не виявлялися. Застосування $2\times\text{МІК}$ забезпечувало ще швидший ефект: 4,67 log на 1-й годині та повна загибель мікроорганізмів з 2-ї. Такі результати підтверджують високу чутливість досліджуваного штаму до дії Кр18, при цьому ефективність препарату зростає пропорційно до концентрації.

Кр19 демонстрував стриману активність на рівні $\frac{1}{4}\times\text{МІК}$: життєздатність знижувалась до 7,41 log на 1-й годині, але вже на 2-й досягала 7,46 log, а далі – 10,13 log на 4-й, 10,47 log на 8-й і 12,59 log на 24-й годині, що вказує на відсутність тривалого інгібуючого ефекту ($p<0,0001$). У концентрації $1\times\text{МІК}$ пригнічення було значно виразнішим – 5,12 log на 1-й, 3,88 log на 2-й, 3,04 log на 4-й, з повною ерадикацією клітин з 8-ї години. При $2\times\text{МІК}$ інгібування відбувалося ще стрімкіше: 4,91 log на 1-й та повна загибель уже на 2-й годині. Це підтверджує високу ефективність Кр19 як дозозалежної бактерицидної сполуки.

Оцінка time-kill assay арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей щодо референтного штаму *Ent. faecalis* ATCC 29213 in vitro. Дослідження динаміки змін кількості життєздатних клітин *Ent. faecalis* під впливом четвертинних солей

амонію продемонструвало залежність антимікробної дії від концентрації та часу експозиції. Контрольна крива без впливу сполук (К) характеризувалась стабільним зростанням бактеріальної маси з початкового рівня $9,43 \log_{10}(\text{CFU})$ до $18,75 \log_{10}(\text{CFU})$ на 24-й годині (рис. 5.2).

Сполука Кс1 у дослідженні проти ентерококів при концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ демонструвала помірну інгібуючу активність. Кількість життєздатних клітин знижувалась з початкового рівня $9,43 \log_{10}(\text{CFU})$ до $8,71 \log$ на 1-й годині, однак вже на 2-й відмічено зростання до $9,87 \log$, що надалі продовжувалося: $11,81 \log$ на 8-й та $14,54 \log$ на 24-й годині. У концентрації $1 \times \text{МІК}$ ефект був суттєвішим: життєздатність зменшувалась до $7,50 \log$ на 1-й годині, $5,82 \log$ на 2-й та $3,65 \log$ на 4-й. Повна загибель мікроорганізмів фіксувалася з 8-ї години ($0,00 \log$). При застосуванні $2 \times \text{МІК}$ інгібування відбувалося ще швидше – $6,87 \log$ на 1-й годині, $3,29 \log$ на 2-й, із повним припиненням росту вже на 4-й годині. Отримані результати свідчать про високу ефективність Кс1 проти ентерококів, яка реалізується поступово при $1 \times \text{МІК}$ і стрімко – за умов підвищеного дозування ($p < 0,0001$).

Сполука Кс2 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ виявила лише незначну антимікробну дію на початкових етапах: життєздатність клітин становила $8,38 \log$ на 1-й годині та $8,78 \log$ на 2-й, однак уже на 4-й спостерігалось її зростання до $10,59 \log$, а через 24 години – до максимального значення $16,55 \log$. У концентрації $1 \times \text{МІК}$ фіксувалося послідовне пригнічення росту: з $8,26 \log$ на 1-й годині до $6,82 \log$ на 2-й та $5,25 \log$ на 4-й, із подальшою майже повною елімінацією клітин – $1,33 \log$ на 8-й та $0,00 \log$ на 24-й годині. При $2 \times \text{МІК}$ ефект був більш інтенсивним: кількість життєздатних клітин знижувалась до $3,61 \log$ уже на 2-й годині, після чого на 4-й годині не виявлялися колонієутворюючі одиниці. Таким чином, антимікробна активність Кс2 реалізується поступово при $1 \times \text{МІК}$, а при збільшенні концентрації – розвивається швидко й призводить до повної ерадикації ентерококів ($p < 0,0001$).

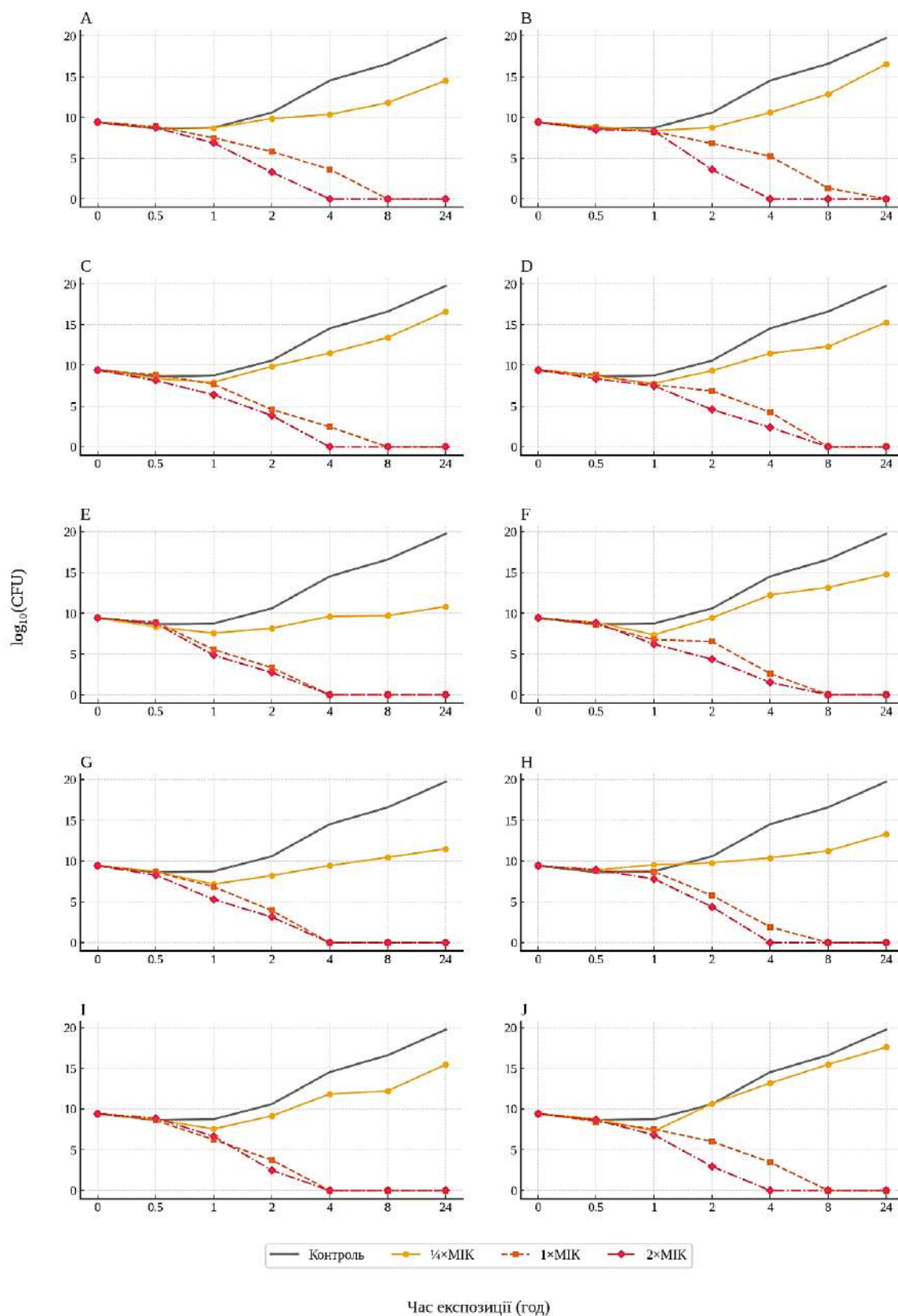


Рис. 5.2. Time-kill крива життєздатності *Ent. faecalis* ATCC 29213 за дії арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей (А – Кс1, В – Кс2, С – Кс3, D – Кс4, Е – Кс22, F - Кс23, G – Кр8, Н – Кр10, I – Кр18, J – Кр19) у трьох концентраціях ($\frac{1}{4} \times \text{МІК}$, $1 \times \text{МІК}$, $2 \times \text{МІК}$) протягом 24 годин інкубації.

Сполука Кс3 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ виявила лише мінімальне інгібування на початкових етапах експозиції: життєздатність становила 7,94 log на 1-й годині, 9,87 log на 2-й, із подальшим безперервним зростанням – до 13,41 log на 8-й та 16,61 log на 24-й годині. При концентрації $1 \times \text{МІК}$ антимікробна дія була значно вираженішою: показники знижувались до 7,69 log на 1-й годині, 4,58 log на 2-й та 2,46 log на 4-й, після чого фіксувалась повна відсутність життєздатних клітин. Максимальний ефект спостерігався при $2 \times \text{МІК}$: життєздатність знижувалася до 6,39 log на 1-й годині, 3,85 log на 2-й та повністю зникала на 4-й. Виявлена концентраційно-залежна дія свідчить про високу ефективність Кс3 проти ентерококів, що швидко реалізується при достатньому рівні експозиції ($p < 0,0001$).

Сполука Кс4 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ демонструвала лише помірне пригнічення життєздатності *Ent. faecalis*. Початковий рівень (8,63 log₁₀(CFU)) знижувався до 7,78 log на 1-й годині, однак вже на 2-й зростав до 9,35 log. Подальше збільшення – до 11,47 log на 4-й, 12,32 log на 8-й та 15,28 log на 24-й годині – свідчить про транзиторний характер дії з активним відновленням бактеріальної популяції. При концентрації $1 \times \text{МІК}$ ефект був стійкішим: життєздатність поступово знижувалась до 7,63 log на 1-й годині, 6,85 log на 2-й і 4,26 log на 4-й, після чого з 8-ї години спостерігалась повна відсутність колонієутворюючих одиниць. У варіанті $2 \times \text{МІК}$ дія була ще вираженішою: 7,48 log на 1-й годині, 4,56 log на 2-й, 2,39 log на 4-й – з подальшим повним інгібуванням із 8-ї години. Такі результати підтверджують ефективність Кс4 у боротьбі з *Ent. faecalis* за умов досягнення терапевтично релевантної концентрації ($p < 0,0001$).

Сполука Кс22 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ виявила лише слабе пригнічення життєздатності *Ent. faecalis*: зниження з 8,31 до 7,56 log на 1-й годині супроводжувалося подальшим зростанням – до 8,15 log на 2-й і 10,82 log на 24-й годині. Значно виразніший ефект спостерігався при концентрації $1 \times \text{МІК}$: 5,55 log на 1-й годині, 3,32 log на 2-й, з повним припиненням росту вже з 4-ї години. При $2 \times \text{МІК}$ інгібування було ще більш стрімким: 4,85 log на 1-й годині, 2,72 log на 2-

й, після чого фіксувалася повна елімінація культури з 4-ї години експозиції. Загальна динаміка свідчить про достатню бактерицидну активність Кс22 за умови застосування концентрацій, що відповідають або перевищують МІК ($p < 0,0001$).

Сполука Кс23 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ мала короткотривалий ефект у дії на *Ent. faecalis*: життєздатність знижувалась з 8,86 log до 7,36 log на 1-й годині, однак уже на 2-й зростала до 9,44 log, після чого спостерігалось стабільне підвищення – 12,24 log на 4-й та 14,79 log на 24-й годині. При $1 \times \text{МІК}$ фіксувалось більш тривале пригнічення: 6,76 log на 1-й годині, 6,54 log на 2-й, 2,60 log на 4-й, із подальшим повним інгібуванням популяції. У концентрації $2 \times \text{МІК}$ дія була інтенсивнішою – 6,21 log на 1-й, 4,35 log на 2-й, 1,51 log на 4-й і повна відсутність життєздатних клітин на 8-й годині ($p > 0,05$).

Сполука Кр8 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ проявляла нестійкий антимікробний ефект щодо *Ent. faecalis*: життєздатність знижувалась незначно – до 7,17 log на 1-й годині, після чого фіксувалось зростання до 9,45 log на 4-й і 11,51 log на 24-й годині. У концентрації $1 \times \text{МІК}$ ефект був значно виразнішим: 6,86 log на 1-й, 3,94 log на 2-й, із повним зникненням колонієутворюючих одиниць з 4-ї години. При $2 \times \text{МІК}$ дія була ще більш інтенсивною – життєздатність знижувалась до 5,30 log на 1-й, 3,15 log на 2-й, а з 4-ї години спостерігалась повна загибель клітин. Така динаміка свідчить про концентраційно-залежну бактерицидну активність Кр8 ($p < 0,0001$).

Кр10 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ виявляла лише транзиторну дію щодо *Ent. faecalis*: життєздатність становила 9,55 log на 1-й годині, 9,79 log на 2-й, із подальшим зростанням до 13,32 log на 24-й годині. У концентрації $1 \times \text{МІК}$ ефект був значно вираженішим – 8,72 log на 1-й годині, 5,78 log на 2-й, 1,92 log на 4-й, після чого фіксувалось повне припинення росту. При $2 \times \text{МІК}$ спостерігалось ще стрімкіше пригнічення: 7,82 log на 1-й, 4,39 log на 2-й, з повною загибеллю клітин з 4-ї години експозиції. Дані свідчать про швидку та дозозалежну бактерицидну дію Кр10 ($p < 0,0001$).

Кр18 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ знижувала життєздатність *Ent. faecalis* до

7,56 log на 1-й годині, однак надалі спостерігалось поступове зростання: 9,15 log на 2-й, 11,84 log на 4-й та 15,47 log на 24-й годині, що свідчить про нетривалий інгібуючий ефект. При $1\times\text{МІК}$ відзначалося стабільне пригнічення росту: 6,24 log на 1-й, 3,75 log на 2-й годині та повне інгібування з 4-ї години. У концентрації $2\times\text{МІК}$ дія була ще стрімкішою – 6,66 log на 1-й годині, 2,48 log на 2-й, після чого життєздатні клітини не виявлялись. Результати підтверджують потужний бактерицидний потенціал Kp18, що реалізується швидко і в повному обсязі при достатній концентрації ($p<0,0001$).

Kp19 при концентрації $\frac{1}{4}\times\text{МІК}$ демонструвала слабе пригнічення життєздатності *Ent. faecalis*: 8,81 log на 0,5 год, 7,29 log на 1-й, однак уже на 2-й годині показник зростав до 10,66 log, далі – 13,17 log на 4-й, 15,47 log на 8-й та 17,59 log на 24-й годині, що свідчить про відсутність тривалого ефекту. У $1\times\text{МІК}$ фіксувалося більш стабільне пригнічення: 8,46 log на 0,5 год, 7,53 log на 1-й, 6,01 log на 2-й, 3,46 log на 4-й і повна загибель із 8-ї години. При $2\times\text{МІК}$ зниження життєздатності відбувалося інтенсивніше – 6,83 log на 1-й, 2,95 log на 2-й, після чого вже на 4-й годині не виявлялися життєздатні клітини. Отримані результати підтверджують наявність вираженої концентраційно- та часозалежної бактерицидної активності Kp19 щодо *Ent. faecalis* ($p<0,0001$).

Оцінка time-kill assay арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей щодо референтного штаму *C. albicans* ATCC 10231 in vitro. Дослідження динаміки змін кількості життєздатних клітин *Candida spp.* у тесті time-kill виявило чіткий зв'язок між концентрацією сполуки та глибиною інгібуючого ефекту (рис. 5.3). Вихідна концентрація складала $7,60 \log_{10}(\text{CFU})$.

Видимий інгібуючий ефект Kc2 при концентрації $\frac{1}{4}\times\text{МІК}$ проявлявся поступово: протягом перших двох годин кількість життєздатних клітин знижувалася з 7,78 до 6,68 $\log_{10}(\text{CFU})$. На 4-й годині цей показник становив 5,79 log, а через 8 годин – 3,15 log, що свідчить про суттєве, але тимчасове пригнічення росту. Утім, у подальші часові точки спостерігалось поступове відновлення популяції: 5,62 log на 24-й годині та 7,74 log на 48-й. У концентрації

1×МІК ефект був більш швидким і стабільним: життєздатність знижувалась до 4,94 log на 1-й годині, 3,77 log на 2-й, із повним припиненням росту вже з 4-ї години (0,00 log). При 2×МІК спостерігалось ще стрімкіше інгібування: 4,01 log на 1-й годині та повна загибель клітин з 2-ї години. Така кінетика вказує на чітку концентраційну залежність антимікробної дії Кс2, з ефективною ерадикацією при досягненні щонайменше рівня 1×МІК ($p < 0,0001$).

Інгібуюча дія Кс3 при концентрації $\frac{1}{4}$ ×МІК була незначною упродовж першої години експозиції: життєздатність змінювалася в межах 7,88–7,80 $\log_{10}$ (CFU). Однак до 4-ї години фіксувалося зниження до 5,70 log, а на 8-й – до 3,92 log, що свідчить про поступову реалізацію антимікробного ефекту. Попри це, у подальшому спостерігалось часткове відновлення популяції: 5,86 log на 24-й годині та 6,55 log на 48-й. У концентрації 1×МІК життєздатність зменшувалася до 5,47 log уже на 1-й годині, до 3,58 log на 2-й, із повною загибеллю клітин із 4-ї години. Для 2×МІК спостерігалось ще стрімкіше пригнічення: 4,99 log на 1-й годині та повна елімінація популяції вже з 2-ї години. Результати демонструють ефективну бактерицидну активність Кс3, яка реалізується в концентраціях, рівних або вищих за МІК ($p < 0,0001$).

При застосуванні Кс14 у концентрації $\frac{1}{4}$ ×МІК життєздатність клітин поступово знижувалась з 7,67 до 6,45 $\log_{10}$ (CFU) протягом перших 4 годин. На 8-й годині показник досягав 3,77 log, однак у подальші часові точки фіксувалося підвищення: 5,46 log на 24-й годині та 6,60 log на 48-й, що свідчить про тимчасову інгібуючу дію з частковим відновленням популяції. У концентрації 1×МІК відзначалося значне зниження життєздатності вже на ранніх етапах: 4,87 log на 1-й годині, 2,40 log на 2-й, із повним знищенням клітин з 4-ї години. При 2×МІК повна загибель культури фіксувалася раніше – з 2-ї години, після зменшення до 3,54 log на 1-й. Отримані дані підтверджують виражену дозозалежну фунгіцидну активність Кс14 ($p < 0,0001$).

Вплив Кс15 у концентрації $\frac{1}{4}$ ×МІК характеризувався повільним зниженням життєздатності клітин *Candida* з 7,83 до 6,17 $\log_{10}$ (CFU) на 4-й годині, далі показник зменшувався до 4,13 log на 8-й. Однак у наступні часові точки

фіксувалося поступове відновлення росту: 4,96 log на 24-й годині та 7,70 log на 48-й, що свідчить про відсутність стійкого інгібуючого ефекту. При 1×МІК спостерігалось зниження життєздатності до 4,93 log на 1-й годині, 3,91 log на 2-й, із повним припиненням росту з 4-ї години. Концентрація 2×МІК забезпечувала швидшу елімінацію – повне пригнічення фіксувалося вже з 2-ї години після попереднього зниження до 4,71 log на 1-й. Результати демонструють ефективну дозозалежну фунгіцидну дію Кс15 ($p < 0,0001$).

Для Кс16 у концентрації $\frac{1}{4}$ ×МІК життєздатність клітин залишалася відносно високою протягом перших двох годин експозиції – зниження відбувалося з 7,87 до 6,76 log₁₀(CFU). До 8-ї години кількість життєздатних клітин зменшувалась до 4,05 log, проте надалі спостерігалось часткове відновлення: 4,94 log на 24-й годині та 7,26 log на 48-й, що свідчить про нестійкий інгібуючий ефект. Застосування 1×МІК супроводжувалося швидшим та більш вираженим пригніченням: 5,96 log на 1-й годині, 3,96 log на 2-й, із повною загибеллю клітин з 4-ї години (0,00 log). При концентрації 2×МІК ефект розвивався ще інтенсивніше – 3,57 log на 1-й годині та повне інгібування популяції з 2-ї години. Дані свідчать про виражену фунгіцидну дію Кс16, реалізація якої є чітко дозозалежною ($p < 0,0001$).

При використанні Кс22 у концентрації $\frac{1}{4}$ ×МІК життєздатність клітин знижувалась до 6,08 log₁₀(CFU) на 2-й годині та 6,00 log на 4-й. До 8-ї години рівень зменшувався до 3,74 log, однак у подальшому спостерігалось відновлення росту: 4,25 log на 24-й годині та 7,82 log на 48-й, що свідчить про нестійкий інгібуючий ефект. У концентрації 1×МІК відзначалося суттєве пригнічення життєздатності: 4,85 log на 1-й годині, 2,36 log на 2-й, із повною елімінацією клітин з 4-ї години. Концентрація 2×МІК забезпечувала ще швидше зниження: 3,40 log на 1-й годині та повне пригнічення популяції з 2-ї години. Отримані результати свідчать про наявність вираженої дозозалежної фунгіцидної активності Кс22 ($p < 0,0001$).

Видимий інгібуючий ефект Кр4 при концентрації $\frac{1}{4}$ ×МІК проявлявся незначно протягом перших двох годин експозиції: кількість життєздатних клітин

знижувалась з 7,73 до 6,93 $\log_{10}$ (CFU). До 4-ї години показник становив 6,17 log, а на 8-й – 3,27 log, що свідчить про суттєве ослаблення популяції. Втім, ефект виявився нестійким – уже на 24-й годині життєздатність зростала до 5,22 log, а на 48-й майже досягала початкових значень (7,88 log). При концентрації $1 \times \text{МІК}$ спостерігалось інтенсивне зниження кількості клітин з 5,59 log на 1-й годині до 3,62 log на 2-й, із повною загибеллю популяції з 4-ї години, яка зберігалася до кінця експерименту. При $2 \times \text{МІК}$ аналогічна динаміка реалізувалась швидше: 5,01 log на 1-й годині та повне інгібування вже з 2-ї години. Отримані результати вказують на швидку й виражену фунгіцидну дію Кр4 за умов досягнення достатньої концентрації ($p < 0,0001$).

Сполука Кр8 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ характеризувалась слабким початковим ефектом: рівень життєздатності клітин знижувався з 7,84 до 6,60 $\log_{10}$ (CFU) протягом перших двох годин. На 4-й годині цей показник становив 5,96 log, а до 8-ї знижувався до 3,45 log. Однак надалі спостерігалось поступове відновлення популяції: 5,32 log на 24-й годині та 7,79 log на 48-й, що свідчить про нестійкий інгібуючий ефект. При концентрації $1 \times \text{МІК}$ життєздатність знижувалась до 5,06 log на 1-й годині, 3,94 log на 2-й, після чого з 4-ї години не фіксувалися життєздатні клітини (0,00 log), що вказує на повне інгібування популяції. Застосування $2 \times \text{МІК}$ забезпечувало ще швидше пригнічення: 4,90 log на 1-й годині та повна загибель клітин з 2-ї години. Дані демонструють ефективну дозозалежну фунгіцидну активність Кр8 ($p < 0,0001$).

У дослідженні динаміки дії Кр18 при концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ встановлено, що життєздатність клітин знижувалась із початкового рівня 7,85 $\log_{10}$ (CFU) до 6,65 log на 2-й годині, 6,40 log на 4-й та 4,34 log на 8-й. До 24-ї години кількість життєздатних клітин зменшувалась до 3,47 log, однак на 48-й годині спостерігалось повне відновлення популяції до 7,95 log, що вказує на нестійкість інгібуючого ефекту. При застосуванні $1 \times \text{МІК}$ життєздатність знижувалася до 4,79 log на 1-й годині, 2,34 log на 2-й, після чого з 4-ї години не виявлялись колонієутворюючі одиниці (0,00 log). Концентрація $2 \times \text{МІК}$ викликала аналогічний ефект із більшою швидкістю: 4,66 log на 1-й годині та повна

загибель клітин уже на 2-й. Ці результати демонструють потужну дозозалежну фунгіцидну дію Кр18 ($p < 0,0001$).

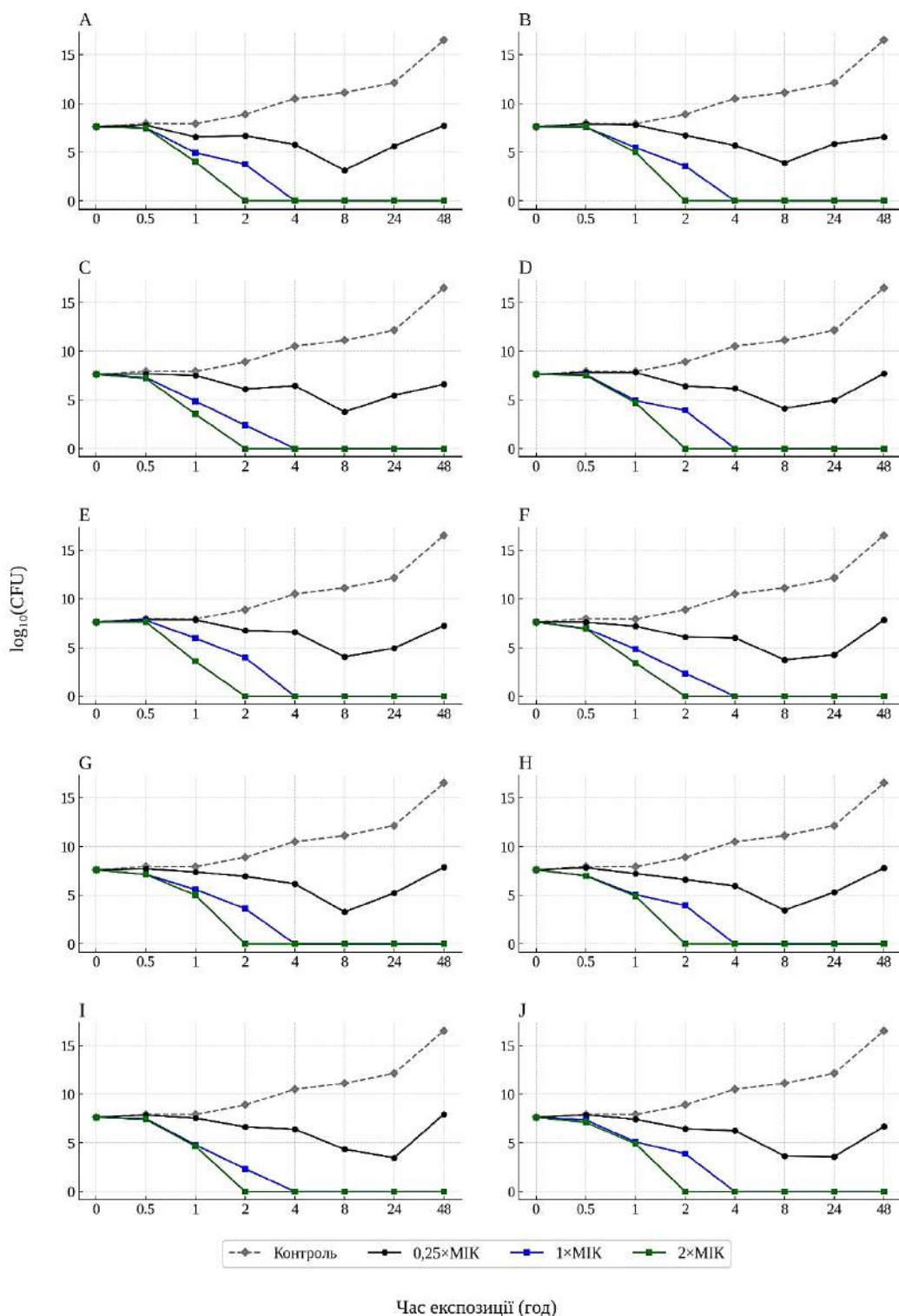


Рис. 5.3. Time-kill крива життєздатності *C. albicans* ATCC 10231 за дії арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей (А – Кс2, В – Кс3, С – Кс14, D – Кс15, Е – Кс16, F - Кс22, G – Кр4, Н – Кр8, I – Кр18, J – Кр19) у трьох концентраціях ($\frac{1}{4} \times \text{МІК}$, $1 \times \text{МІК}$, $2 \times \text{МІК}$) протягом 48 годин інкубації.

У разі застосування Kp19 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ життєздатність клітин знижувалась з початкового рівня $7,88 \log_{10}(\text{CFU})$ до $7,41 \log$ на 1-й годині, $6,46 \log$ на 2-й, $6,26 \log$ на 4-й і $3,65 \log$ на 8-й годині. У подальшому відзначалося часткове збереження популяції: $3,59 \log$ на 24-й годині та $6,67 \log$ на 48-й, що свідчить про відновлення росту клітин після початкового пригнічення. При концентрації $1 \times \text{МІК}$ спостерігалось інтенсивніше зниження життєздатності – $5,10 \log$ на 1-й годині, $3,88 \log$ на 2-й, із повною загибеллю клітин з 4-ї години. Застосування $2 \times \text{МІК}$ призводило до ще швидшого інгібування: $4,91 \log$ на 1-й годині та повне припинення росту з 2-ї години, що зберігалось до кінця експерименту. Отримані результати підтверджують виражену концентраційно-залежну фунгіцидну активність Kp19 ($p < 0,0001$).

5.1.2 Аналіз залишкової антимікробної дії арилоксиетокси четвертинних амонієвих сполук щодо чутливих референтних штамів

Вивчення залишкової (постантимікробної) дії антимікробних сполук є ключовим етапом при розробці нових дезінфікуючих або лікарських засобів. Залишкова антимікробна дія визначає здатність речовини зберігати інгібуючу активність навіть після короткочасного впливу, що має вирішальне значення у випадках епізодичного контакту або періодичного дозування [224]. Для дослідження цього ефекту застосовуються методи time-kill у пост-експозиційній модифікації, що дає змогу оцінити не лише зниження життєздатності клітин, а й швидкість їх відновлення після видалення агента.

Оцінка РАЕ арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей щодо референтного штаму *S. aureus* ATCC 25923 in vitro. Для оцінки постантибактеріального ефекту новосинтезованих сполук щодо *Staphylococcus aureus* референтний штам піддавали попередній експозиції з досліджуваними речовинами протягом 30 або 60 хвилин. Після завершення зазначених періодів впливу антибактеріальні агенти повністю усували, а бактеріальні клітини інкубували в свіжому середовищі без активної речовини. Стартова кількість життєздатних клітин становила $9,43 \log_{10}(\text{CFU})/\text{мл}$. Подальше спостереження за

динамікою росту бактерій упродовж 8 годин дозволило оцінити залишкову дію сполук, яка зберігається після видалення препарату (рис. 5.4). Такий підхід дає можливість визначити потенціал речовини до пролонгованого пригнічення росту бактерій у клінічно релевантних умовах.

У дослідженні постантимікробного ефекту сполука Кс1 при концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ проявила незначну активність щодо *S. aureus*, незалежно від тривалості попередньої експозиції. Початкові рівні життєздатності становили 9,18 $\log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної та 8,55 $\log$ після 60-хвилинної дії, проте вже на 2-й годині спостерігалось зростання до 11,73 і 9,76 $\log$ відповідно, на 4-й – до 12,76/11,76, а на 8-й – 14,76/13,43 $\log$, що свідчить про відсутність тривалого інгібуючого ефекту (РАЕ відсутній). При концентрації $1 \times \text{МІК}$ зниження життєздатності було більш помітним: на 1-й годині кількість КУО становила 7,89 $\log$ після 30-хвилинної та 5,74 $\log$ після 60-хвилинної експозиції, на 4-й – 9,65/5,49 $\log$, на 8-й – 10,49/7,56 $\log$, що дозволяє оцінити РАЕ як ~ 2 год. Застосування $2 \times \text{МІК}$ забезпечувало більш виражене зменшення життєздатності: 7,47/5,01 $\log$ на початку, 6,70/3,99 $\log$ на 1-й годині, з частковим відновленням на 8-й – до 8,76/6,61 $\log$. РАЕ можна оцінити як $\sim 3,5$ год, з вираженою залежністю від експозиції ($p < 0,0001$).

У мінімальній концентрації ($\frac{1}{4} \times \text{МІК}$) сполука Кс2 проявила ще слабшу активність щодо *S. aureus*: вихідні значення життєздатності становили 9,88 $\log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної та 9,80 $\log$ після 60-хвилинної експозиції, а вже з 2-ї години фіксувалось стійке зростання кількості клітин до 11,69/10,77 $\log$, з піковими значеннями 15,45 та 14,56 $\log$ відповідно на 8-й годині, що свідчить про відсутність РАЕ. При концентрації $1 \times \text{МІК}$ спостерігалось помірне зниження життєздатності вже з 1-ї години – 8,47 $\log$ (30 хв) і 7,45 $\log$ (60 хв), з незначними коливаннями на 2-й годині (8,45/8,03 $\log$) та подальшим підвищенням на 8-й до 10,52/9,24 $\log$. РАЕ тривав приблизно ~ 2 год. Застосування $2 \times \text{МІК}$ забезпечувало більш виражене зниження життєздатності на початкових етапах – 7,60 $\log$ (30 хв) та 4,99 $\log$ (60 хв) на початку дослідження, 6,99/4,44 $\log$ на 1-й годині, з утриманням ефекту до 4-ї години (9,60/5,72 $\log$), проте до 8-ї години рівень

життєздатних клітин підвищувався до 10,72/7,30 $\log$, що свідчить про *PAE* тривалістю ~ 4 год ($p < 0,0001$).

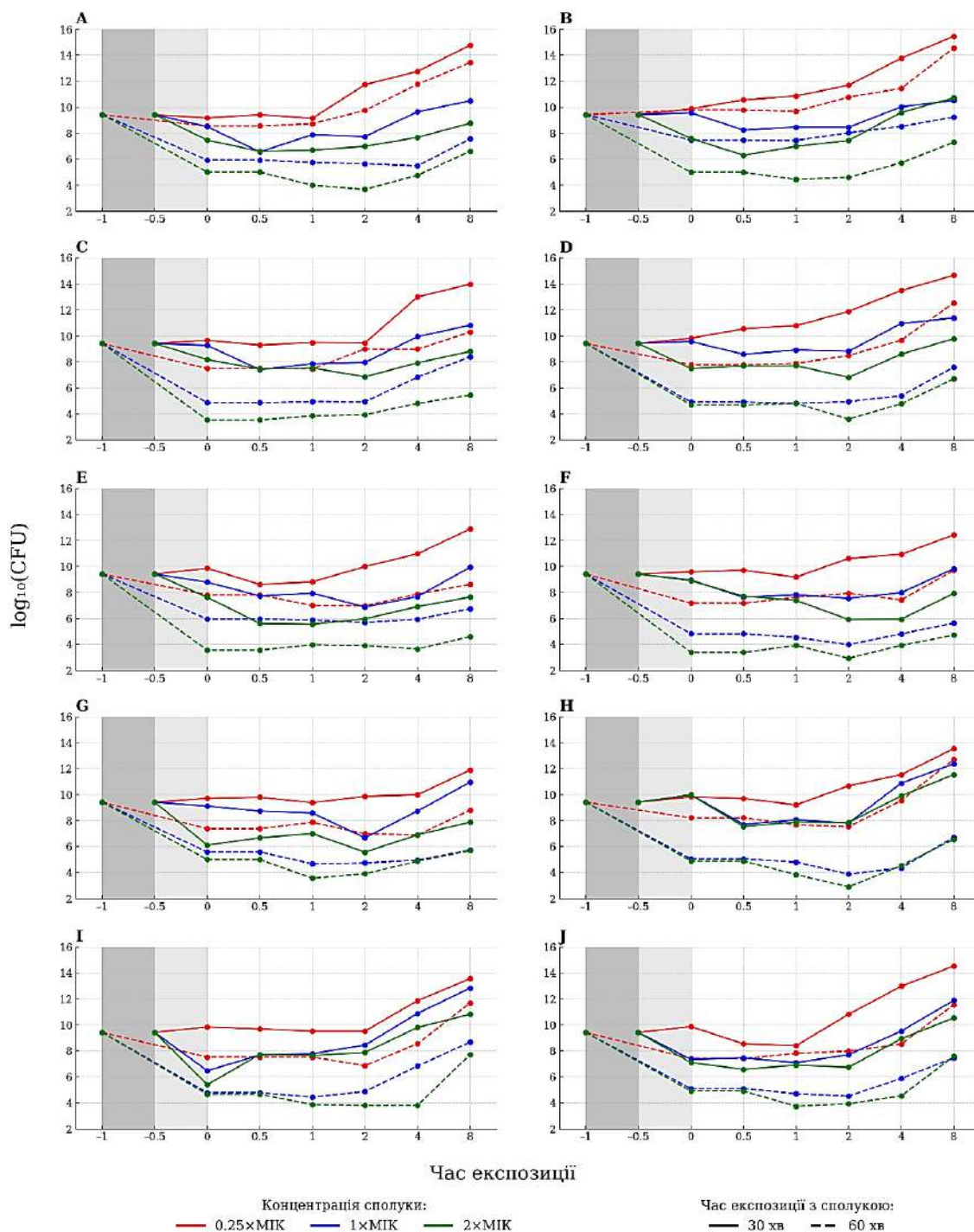


Рис. 5.4. *Post-antimicrobial effect* арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей (А – Кс1, В – Кс2, С – Кс3, D – Кс4, Е – Кс15, F - Кс22, G – Кр10, Н – Кр16, I – Кр18, J – Кр19) проти *S. aureus* ATCC 25923: зміни $\log_{10}$ (CFU) після 30- та 60-хвилинної експозиції в умовах *in vitro*.

У концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ сполука Кс3 проявила низьку активність щодо *S.*

aureus. Початкові значення $\log_{10}(CFU)$ становили 9,67 (30 хв) та 7,50 (60 хв), протягом першої години відзначалося незначне зменшення до 9,50/7,47, після чого КУО зростала до 13,01/8,99 на 4-й годині та 13,99/10,30 на 8-й, що свідчить про слабку інгібіцію при короткій експозиції та помірну при тривалішій. *PAE* у цій концентрації – відсутній. У концентрації $1 \times \text{МІК}$ життєздатність знижувалася до 7,87/4,97 на 1-й годині та 7,97/4,95 на 2-й, з подальшим утриманням ефекту до 8-ї години (10,83/8,41), що свідчить про транзиторну бактерицидну дію з *PAE* близько ~ 2 год і більш вираженим ефектом за 60-хвилинної експозиції. При $2 \times \text{МІК}$ спостерігалася чітке й тривале пригнічення росту: вихідні значення 8,19/3,54, на 1-й годині – 7,54/3,86, на 2-й – 6,86/3,94, а на 8-й – 8,82/5,46, що свідчить про дозо- та експозиційну залежність дії сполуки. *PAE* при цій концентрації оцінюється як ~ 4 год ($p < 0,0001$).

У концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ сполука Кс4 показала дуже слабку інгібуючу дію щодо *S. aureus*. Початкові значення життєздатності становили 9,83 $\log_{10}(CFU)$ після 30-хвилинної та 7,80 $\log$ після 60-хвилинної експозиції, з подальшим зростанням до 13,50/9,68 на 4-й годині та 14,68/12,55 на 8-й, що вказує на відсутність ефективного стримування росту при низькій дозі. *PAE* у цій концентрації відсутній. У концентрації $1 \times \text{МІК}$ спостерігалася помітне зниження КУО з 9,58/4,93 (0 год) до 8,93/4,83 (1 год) і 8,83/4,96 (2 год), надалі відзначалося поступове зростання, проте на 8-й годині значення залишалися нижчими за контроль – 11,40 після 30-хвилинної та 7,60 після 60-хвилинної експозиції. Це дозволяє визначити *PAE* на рівні $\sim 2-3$ год залежно від експозиції. При $2 \times \text{МІК}$ фіксувалася більш виражена бактерицидна дія: з 7,50/4,71 на початку до 6,82/3,61 на 2-й годині та 8,61/4,79 на 4-й, із подальшим утриманням ефекту до 8-ї години (9,79/6,70), без повного відновлення росту. *PAE* при $2 \times \text{МІК}$ тривало ~ 4 год ($p < 0,0001$).

У концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ сполука Кс15 продемонструвала слабку інгібуючу активність щодо *S. aureus*. На 0-й годині кількість життєздатних клітин становила 9,87 $\log_{10}(CFU)$ після 30-хвилинної експозиції та 7,83 $\log$ після 60-хвилинної. Упродовж перших годин спостерігалася часткове пригнічення росту,

однак на 4-й годині рівні КУО досягали 10,99/7,89, а на 8-й – 12,89/8,63, що вказує на нестійкий ефект у низькій концентрації. РАЕ у цій концентрації – відсутній. При $1 \times \text{МІК}$ вже на 1-й годині кількість клітин знижувалася до 7,96/5,89, на 2-й – до 6,89/5,70, з подальшим утриманням ефекту до 8-ї години (9,95/6,75), що свідчить про тривалий бактеріостатичний вплив і РАЕ тривалістю ~ 2 год. При $2 \times \text{МІК}$ відзначалася найвиразніша активність: з 7,64/3,57 на початку до 5,57/3,98 на 1-й годині, 5,98/3,92 на 2-й, з подальшим збереженням ефекту на 8-й годині (7,66/4,62), особливо після довшої експозиції. Це дозволяє оцінити РАЕ як $\sim 4-5$ год ($p < 0,0001$).

При концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ сполука Кс22 демонструвала нестійкий інгібуючий ефект щодо *S. aureus*. Початкові значення життєздатності становили 9,60 $\log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної експозиції та 7,19 $\log$ після 60-хвилинної. Упродовж перших годин спостерігалися коливання КУО, на 4-й годині – 10,95/7,44 $\log$, на 8-й – 12,44/9,72 $\log$, що свідчить про слабе та короткочасне пригнічення росту навіть за умов подовженої дії. РАЕ в цій концентрації відсутній. При $1 \times \text{МІК}$ відзначалося більш помітне зниження життєздатності вже на 1-й годині – до 7,84/4,56, на 2-й – до 7,56/4,00, з поступовим зростанням до 9,83/5,65 $\log$ на 8-й годині, що вказує на стабільний бактеріостатичний ефект із РАЕ тривалістю $\sim 2-3$ год і більш вираженою дією за 60-хвилинної експозиції. У концентрації $2 \times \text{МІК}$ життєздатність клітин знижувалася до 7,40/3,93 $\log$ на 1-й годині, 5,93/2,95 на 2-й, з подальшим утриманням ефекту до 8-ї години – 7,94/4,73 $\log$, що відображає тривалий і стійкий бактерицидний вплив з РАЕ ~ 4 год ($p < 0,0001$).

Сполука Кр10 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ проявила обмежену активність щодо *S. aureus*. Початкові значення $\log_{10}(\text{CFU})$ становили 9,73 після 30-хвилинної та 7,39 після 60-хвилинної експозиції, протягом перших годин змінювались незначно, тоді як на 4-й годині зростали до 10,00/6,90, а на 8-й – до 11,90/8,81, що свідчить про слабку і нестійку інгібіцію, з частковим ефектом лише при тривалішій дії. При $1 \times \text{МІК}$ життєздатність знижувалась до 8,59/4,69 на 1-й годині, на 2-й – до 8,05/4,70, з подальшим зростанням до 10,97/5,74 на 8-й,

що вказує на транзиторний характер впливу, стабільніший за умови 60-хвилинної експозиції. При концентрації $2 \times \text{МІК}$ відзначалося більш виражене зниження КУО: на початку – 6,12/5,01, на 1-й годині – 7,01/3,58, на 2-й – 5,58/3,92, з подальшим утриманням ефекту до 8-ї години – 7,89 після 30 хвилин та 5,69 після 60 хвилин експозиції ($p < 0,0001$).

У концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ сполука Кр16 не забезпечувала суттєвого інгібуючого ефекту щодо *S. aureus*. Початкові значення життєздатності становили 9,84 $\log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної та 8,22 $\log$ після 60-хвилинної експозиції, з подальшим стійким зростанням до 13,55/12,72 $\log$ на 8-й годині, що вказує на відсутність РАЕ. При $1 \times \text{МІК}$ спостерігалось помітне зниження КУО на 1-й годині – до 8,06 після 30 хвилин та 4,82 після 60 хвилин, з утриманням ефекту до 2-ї години (7,82/3,89), після чого відзначалося поступове підвищення – до 12,38/6,72 $\log$ на 8-й годині. Отже, РАЕ при цій концентрації оцінюється як ~ 2 год. При застосуванні $2 \times \text{МІК}$ життєздатність клітин становила 7,90/3,86 $\log$ на 1-й годині, 7,86/2,91 на 2-й, і залишалася нижчою за контрольні показники до кінця експерименту – 11,55 після 30-хвилинної та 6,56 після 60-хвилинної дії на 8-й годині. Це вказує на тривалий бактерицидний ефект із РАЕ ~ 4 год ($p < 0,0001$).

Сполука Кр18 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ демонструвала слабку інгібуючу активність проти *S. aureus*. Початкові значення $\log_{10}(\text{CFU})$ становили 9,85 після 30-хвилинної та 7,53 після 60-хвилинної експозиції, з подальшим збереженням або підвищенням чисельності клітин: 9,53/6,87 на 2-й годині, 11,87/8,56 на 4-й, 13,56/11,70 на 8-й. При $1 \times \text{МІК}$ кількість життєздатних клітин знижувалась до 7,79/4,45 на 1-й годині, 8,45/4,89 на 2-й, з подальшим поступовим зростанням до 12,84/8,68 на 8-й годині, при цьому ефект був стабільнішим після тривалішої дії. При $2 \times \text{МІК}$ спостерігалася найвиразніша динаміка зменшення: з 5,41/4,66 на початку до 7,66/3,88 на 1-й годині, 7,88/3,81 на 2-й, із збереженням пригнічення до 4-ї години. На 8-й годині життєздатність підвищувалась до 10,82 після 30 хвилин і 7,73 після 60 хвилин експозиції, однак рівні залишалися нижчими за контроль ($p < 0,0001$).

Сполука Кр19 при концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ виявила дуже слабку інгібуючу

активність щодо *S. aureus*. Початкові значення життєздатності становили 9,88 $\log_{10}$ (CFU) після 30-хвилинної та 7,41 $\log$ після 60-хвилинної експозиції, на 1-й годині відзначалося незначне зниження до 8,41/7,82 $\log$, однак до 8-ї години КУО зростала до 14,53/11,55 $\log$, що свідчить про втрату ефекту при тривалому спостереженні. При концентрації $1 \times \text{МІК}$ кількість клітин знижувалася до 7,10/4,71 $\log$ на 1-й годині, 9,53/5,89 на 4-й, а на 8-й залишалася на рівні 11,89/7,47 $\log$, з ознаками часткового утримання ефекту, особливо після 60-хвилинної дії. У концентрації $2 \times \text{МІК}$ спостерігалася найвища активність: на 1-й годині КУО становила 6,91/3,75 $\log$, на 2-й – 6,75/3,94, а на 8-й – 10,54 після 30 хвилин та 7,59 після 60 хвилин експозиції, з чітким збереженням інгібуючого впливу протягом усього періоду при довшій дії ($p < 0,0001$).

Оцінка РАЕ арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей щодо референтного штаму *Ent. faecalis* ATCC 29213 *in vitro*. Для вивчення постантибактеріальної активності досліджуваних сполук вихідна кількість клітин *Ent. faecalis* становила 9,76 $\log_{10}$ (CFU)/мл. Визначення кількості життєздатних клітин у динаміці (0-8 год) дозволило охарактеризувати силу, тривалість та характер залишкової антибактеріальної дії (рис. 5.5).

Сполука Кс1 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ продемонструвала слабку інгібуючу активність проти *Ent. faecalis*. На початку експерименту рівень життєздатних клітин становив 9,72 $\log_{10}$ (CFU) після 30-хвилинної та 8,95 $\log$ після 60-хвилинної експозиції, з подальшим поступовим зростанням до 14,90/13,67 $\log$ на 8-й годині, що свідчить про відсутність стабільного інгібування у цій концентрації та відсутність РАЕ. При $1 \times \text{МІК}$ життєздатність знижувалась до 7,60/5,51 на 1-й годині, з утриманням ефекту до 4-ї години, проте на 8-й показники підвищувались до 10,62/7,68 $\log$, що вказує на транзиторийний характер дії з РАЕ близько 2-4 годин, з перевагою за умови 60-хвилинної експозиції. У концентрації $2 \times \text{МІК}$ Кс1 демонстрував чітко виражене зниження життєздатності: 7,95/4,84 $\log$ на початку, 6,73/4,02 на 1-й годині, 6,52/3,64 на 2-й, з подальшим утриманням ефекту до 8-ї години (8,65/6,77), що підтверджує

концентраційно та експозиційно залежну дію з РАЕ понад 4 години ($p < 0,0001$).

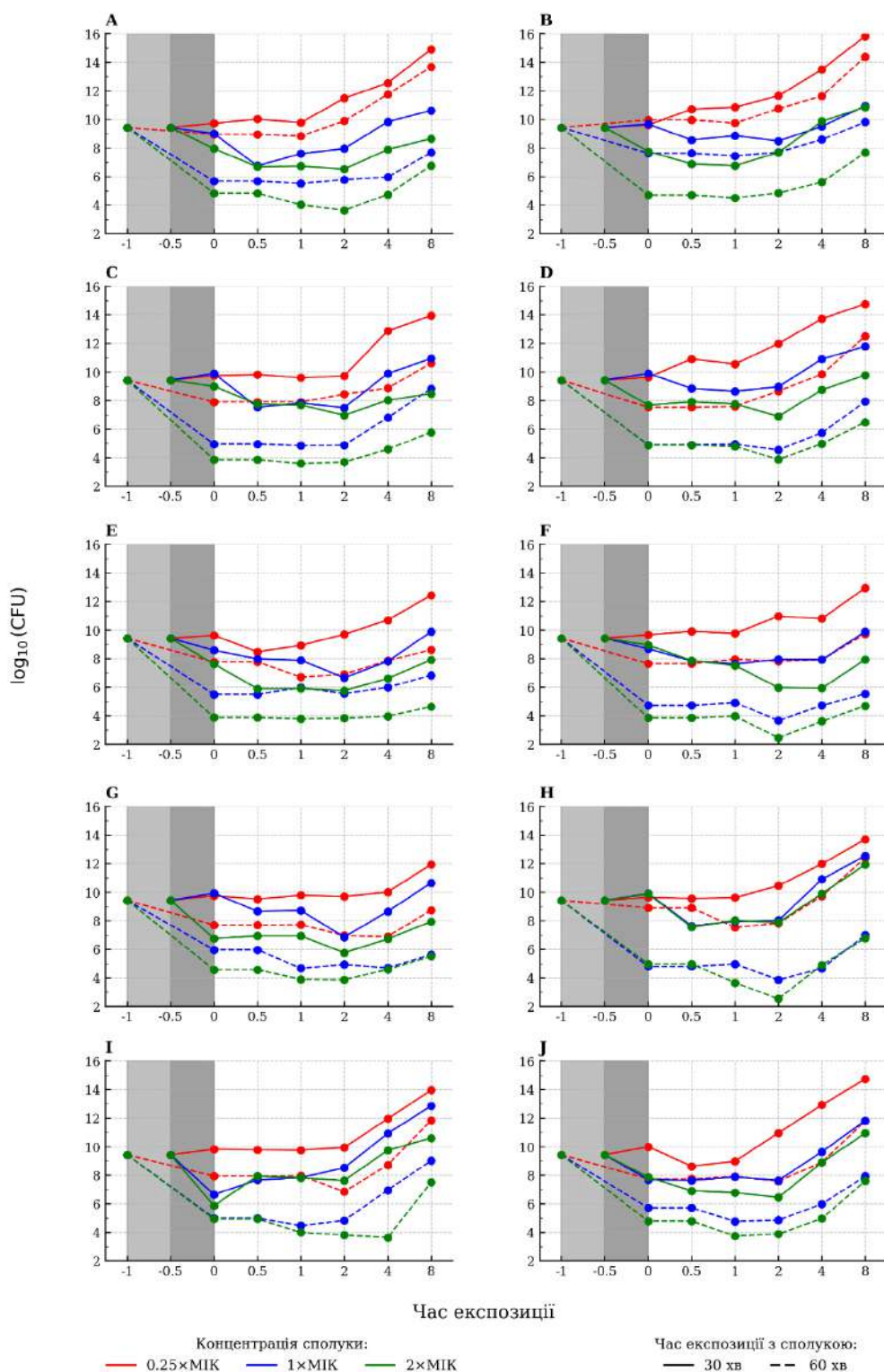


Рис. 5.5. *Post-antimicrobial effect* арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей (А – Кс1, В – Кс2, С – Кс3, D – Кс4, Е – Кс22, F - Кс23, G – Кр8, Н – Кр10, I – Кр18, J – Кр19)проти *Ent. faecalis* ATCC 29213: зміни $\log_{10}(CFU)$ після 30- та 60-хвилинної експозиції в умовах *in vitro*.

Сполука Кс2 у найнижчій концентрації ($\frac{1}{4} \times \text{МІК}$) не проявила суттєвої активності проти ентерококів: на 0-й годині рівень життєздатних клітин становив $9,61 \log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної експозиції та $9,97 \log$ після 60-хвилинної, з подальшим стійким зростанням до $15,83/14,38 \log$ на 8-й годині. Це свідчить про відсутність РАЕ. При концентрації $1 \times \text{МІК}$ спостерігалось помірне зниження КУО на початкових етапах – до $8,86/7,45 \log$ на 1-й годині та $8,49/7,70 \log$ на 2-й, однак до 8-ї години життєздатність зростала до $10,94$ після 30 хвилин і $9,81$ після 60 хвилин, що свідчить про нестійкий бактеріостатичний ефект із РАЕ до 2 годин. Найвища концентрація ($2 \times \text{МІК}$) забезпечувала більш виражене пригнічення: $6,76/4,51 \log$ на 1-й годині, $7,69/4,85$ на 2-й, з подальшим утриманням ефекту до 8-ї години – $10,86/7,68 \log$, що вказує на стабільну, хоча й неповну, бактерицидну дію з РАЕ до 4 годин ($p < 0,0001$).

Сполука Кс3 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ виявила дуже слабкий інгібуючий ефект проти *Ent. faecalis*. На початку експерименту кількість життєздатних клітин становила $9,74 \log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної та $7,90$ після 60-хвилинної експозиції, з подальшим зростанням до $12,88/8,87 \log$ на 4-й годині та $13,94/10,61$ на 8-й, що свідчить про відсутність стабільного інгібування і РАЕ. При концентрації $1 \times \text{МІК}$ на 1-й годині КУО становила $7,83/4,85$, на 2-й – $7,50/4,88$, із поступовим підвищенням до $10,94/8,84$ на 8-й годині, що вказує на транзиторний ефект із РАЕ до 2 годин, більш помітний при тривалішій експозиції. При $2 \times \text{МІК}$ відзначалося стійке зниження життєздатності: $7,69/3,60 \log$ на 1-й годині, $6,98/3,70$ на 2-й, з утриманням ефекту до 8-ї години – $8,49$ після 30 хвилин і $5,78$ після 60 хвилин, що свідчить про тривалу бактерицидну дію з РАЕ понад 4 години за умови подовженого контакту ($p < 0,0001$).

Сполука Кс4 при концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ продемонструвала недостатню ефективність щодо *Ent. faecalis*. Початкові значення $\log_{10}(\text{CFU})$ становили $9,63$ після 30-хвилинної та $7,53$ після 60-хвилинної експозиції, з подальшим зростанням життєздатності до $14,77/12,50 \log$ на 8-й годині, що свідчить про відсутність стійкого інгібування і РАЕ при низькій концентрації. У разі застосування $1 \times \text{МІК}$ ефект був помірно вираженим: на 1-й годині КУО

становила 8,65/4,94, на 2-й – 8,97/4,55, із підвищенням до 11,80/7,93 log на 8-й годині, що вказує на транзиторний характер дії з РАЕ до 2-3 годин, ефективніший при тривалішому впливі. При 2×МІК кількість клітин знижувалась до 7,76/4,79 на 1-й годині, 6,90/3,88 на 2-й, з подальшим утриманням ефекту до 8-ї години – 9,78 після 30 хвилин і 6,49 після 60 хвилин експозиції, що підтверджує стійку бактерицидну дію з РАЕ понад 4 години за умов вищої концентрації й подовженого контакту ($p < 0,0001$).

Сполука Кс15 у концентрації $\frac{1}{4}$ ×МІК продемонструвала обмежену інгібуючу дію щодо *Ent. faecalis*. Початкові значення $\log_{10}(\text{CFU})$ становили 9,63 після 30-хвилинної та 7,77 після 60-хвилинної експозиції, на 1-й годині рівні знижувалися до 8,93/6,71, однак до 8-ї години зростали до 12,43/8,62, що свідчить про нестійкий транзиторний ефект і РАЕ до 2 годин. При концентрації 1×МІК життєздатність зменшувалась до 7,89/5,98 на 1-й годині, 6,66/5,55 на 2-й, з утриманням нижчих за контроль показників до 8-ї години – 9,88 після 30 хвилин та 6,84 після 60 хвилин експозиції, що вказує на стабільний бактеріостатичний вплив із РАЕ до 4 годин. У разі застосування 2×МІК кількість життєздатних клітин знижувалась до 5,91/3,79 на 1-й годині, 5,76/3,84 на 2-й, з подальшим збереженням ефекту до 8-ї години – 7,91/4,64 log, що демонструє стійку бактерицидну дію з РАЕ понад 4 години ($p < 0,0001$).

Сполука Кс22 у концентрації $\frac{1}{4}$ ×МІК виявила слабку антимікробну дію щодо *Ent. faecalis*. На 0-й годині кількість життєздатних клітин становила 9,67 $\log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної та 7,65 log після 60-хвилинної експозиції, на 2-й годині – 10,97/7,82, з подальшим зростанням до 12,95/9,73 на 8-й годині, що вказує на відсутність стабільного інгібування і РАЕ. При 1×МІК відзначалося суттєвіше зниження: 7,62/4,93 log на 1-й годині, 7,95/3,67 на 2-й, з утриманням ефекту до 8-ї години – 9,89/5,54 log, що демонструє кращу ефективність за тривалішої експозиції з РАЕ близько 4 годин. У концентрації 2×МІК Кс22 проявляла чітко виражену дозозалежну активність: кількість життєздатних клітин знижувалась до 7,52/3,98 на 1-й годині, 5,97/2,46 на 2-й, із збереженням низьких значень до 8-ї години – 7,94 після 30 хвилин та 4,70 після 60 хвилин

експозиції, що свідчить про стійку бактерицидну дію та РАЕ понад 4 години ($p < 0,0001$).

Сполука Кр10 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ показала помірну антимікробну активність щодо *Ent. faecalis* на ранніх етапах, однак без стабільного тривалого ефекту. На початку дослідження кількість життєздатних клітин становила $9,76 \log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної та $7,71$ після 60-хвилинної експозиції. На 1-й годині фіксувалося лише незначне зниження до $9,79/7,73$, на 2-й – до $9,70/6,97$, а на 8-й годині життєздатність підвищувалась до $11,94/8,73$, що свідчить про нестійке пригнічення і відсутність РАЕ. У концентрації $1 \times \text{МІК}$ спостерігалось зниження КУО до $8,72/4,68$ на 1-й годині, $6,86/4,94$ на 2-й, із поступовим зростанням до $10,65/5,63$ на 8-й, що вказує на помірно стабільну бактеріостатичну дію з РАЕ до 4 годин, більш виражену при довшій експозиції. У разі застосування $2 \times \text{МІК}$ ефект був чіткішим: $6,95/3,90 \log$ на 1-й годині, $5,76/3,87$ на 2-й, з утриманням пригнічення до 8-ї години – $7,94$ після 30 хвилин та $5,51$ після 60 хвилин експозиції, що свідчить про бактерицидну дію з РАЕ понад 4 години ($p < 0,0001$).

Сполука Кр16 при концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ не продемонструвала ефективності у пригніченні росту *Ent. faecalis*. Початкові значення логарифмованих КУО становили $9,64 \log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної та $8,90 \log$ після 60-хвилинної експозиції, із подальшим зростанням до $13,70/12,39 \log$ на 8-й годині. При $1 \times \text{МІК}$ кількість клітин знижувалась до $7,96/4,98$ на 1-й годині, $8,02/3,86$ на 2-й, із підвищенням до $12,55$ після 30 хвилин та $6,99$ після 60 хвилин дії на 8-й годині, що свідчить про більш стійке пригнічення при довшій експозиції та наявність РАЕ близько 4 годин. У концентрації $2 \times \text{МІК}$ життєздатність знижувалась до $8,03/3,66$ на 1-й годині, $7,88/2,54$ на 2-й, з частковим зростанням на 8-й годині до $11,93/6,79 \log$, однак ефект залишався вираженим упродовж перших годин дії, що свідчить про наявність РАЕ не менше 4 годин, особливо при тривалій експозиції ($p < 0,0001$).

Сполука Кр18 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ виявила низьку інгібуючу активність щодо *Ent. faecalis*. Вихідні значення $\log_{10}(\text{CFU})$ становили $9,82$ після

30-хвилинної та 7,94 після 60-хвилинної експозиції, на 2-й годині показники практично не змінювались – 9,94/6,85, а на 8-й фіксувалося зростання до 13,95/11,84 log, що свідчить про нестійкість дії. При 1×МІК життєздатність знижувалась до 7,83/4,47 на 1-й годині, 8,52/4,83 на 2-й, із частковим відновленням росту до 12,85/9,01 log на 8-й годині, однак показники залишались нижчими за контроль, що вказує на дозозалежну і частково експозиційну бактеріостатичну дію з РАЕ до 2–3 годин. У концентрації 2×МІК спостерігалось зниження КУО до 7,82/4,00 log на 1-й годині, 7,63/3,81 на 2-й, з утриманням пригнічення до 8-ї години – 10,60 після 30 хвилин та 7,51 після 60 хвилин експозиції, що свідчить про бактерицидну дію з РАЕ понад 4 години ($p < 0,0001$).

Сполука Кр19 у концентрації $\frac{1}{4}$ ×МІК виявила слабку інгібуючу дію щодо *Ent. faecalis*. Початкові значення $\log_{10}(\text{CFU})$ становили 9,99 після 30-хвилинної та 7,74 після 60-хвилинної експозиції, на 2-й годині спостерігалось часткове зниження до 10,96/7,59, однак до 8-ї години життєздатність зростала до 14,73/11,81 log, що вказує на відсутність ефективного контролю росту. При концентрації 1×МІК відзначалося помітне зниження КУО до 7,88/4,76 на 1-й годині, 7,64/4,86 на 2-й, з подальшим зростанням до 11,82/7,93 на 8-й годині, при цьому триваліша експозиція забезпечувала стійкіше пригнічення і РАЕ близько 4 годин. У концентрації 2×МІК кількість клітин зменшувалась до 6,78/3,75 на 1-й годині, 6,45/3,89 на 2-й, із збереженням ефекту до 8-ї години – 10,94 після 30 хвилин і 7,60 після 60 хвилин дії, що підтверджує наявність РАЕ понад 4 години ($p < 0,0001$).

Оцінка РАЕ арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей щодо референтного штаму *C. albicans* ATCC 10231 *in vitro*. Для вивчення постантифунгального ефекту нових четвертинних солей щодо *C. albicans* було змодельовано короткочасний контакт грибкових клітин з досліджуваними сполуками тривалістю 30 та 60 хвилин (рис. 5.6). Вихідна концентрація дріжджоподібних клітин становила 7,60 $\log_{10}(\text{CFU})/\text{мл}$.

На початковому етапі (0 год) кількість життєздатних клітин *C. albicans*

становила $7,57 \log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної та $6,57$ після 60-хвилинної експозиції. При застосуванні $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ Кс2 спостерігалось поступове зростання КУО протягом 8 годин до $10,96/9,64 \log$, що свідчить про обмежену фунгістатичну активність у низькій концентрації, незалежно від тривалості дії. У випадку концентрації $1 \times \text{МІК}$ на ранніх часових точках фіксувалось пригнічення росту: з $7,92/4,74 \log$ на початку до $5,93/3,95$ на 1-й годині, з утриманням ефекту до 8-ї години – $6,88$ після 30-хвилинної та $5,87$ після 60-хвилинної експозиції. Найвищу активність спостерігали при $2 \times \text{МІК}$: кількість колонієутворювальних одиниць знижувалась з $7,85/3,96 \log$ на початку до $5,99/4,47$ на 8-й годині, при цьому вже на 1-й годині після 60-хвилинної експозиції показник сягав $2,62 \log$, що свідчить про виражену фунгіцидну дію з концентраційною та експозиційною залежністю ($p < 0,0001$).

На відміну від Кс2, сполука Кс3 виявила дещо слабшу антикандидозну активність при мінімальній концентрації. У групі $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ на 0-й годині значення становили $7,85 \log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної та $7,97$ після 60-хвилинної експозиції, з подальшим зростанням до $10,94/10,97 \log$ на 8-й годині, що свідчить про практично повну відсутність інгібуючої дії. При $1 \times \text{МІК}$ динаміка була стриманою: з $7,96/5,84 \log$ на початку до $7,82/8,87$ на 8-й годині, при цьому після 60-хвилинної експозиції фіксувалось тимчасове пригнічення – $5,63 \log$ на 1-й годині, однак надалі життєздатність підвищувалась, що вказує на транзиторну дію без ознак фунгіцидності. Найвища концентрація ($2 \times \text{МІК}$) демонструвала помірну активність: на 1-й годині кількість клітин знижувалась до $4,90 \log$ після 60-хвилинної дії, на 8-й – до $5,77/6,94 \log$, при цьому ефект був більш вираженим за умов тривалішої експозиції, але залишався в межах фунгістатичного ($p < 0,0001$).

Сполука Кс14 при концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ проявила слабо виражену антимікотичну активність. Початкові рівні життєздатних клітин *C. albicans* становили $7,82 \log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної та $7,67$ після 60-хвилинної експозиції. Упродовж перших годин спостерігалось незначне зниження, однак на 8-й годині КУО зростала до $8,79/9,63 \log$, що вказує на недостатній інгібуючий

ефект у низькій концентрації. При $1 \times \text{МІК}$ фіксувалося виразніше зменшення кількості клітин: 5,98/3,41 log на 1-й годині, 2,64/5,65 на 8-й, при цьому пригнічення було більш стійким у групі з коротшою експозицією. Найбільш значуща активність спостерігалась при $2 \times \text{МІК}$: вже на 1-й годині рівні КУО знижувались до 2,95 після 30-хвилинної та 2,55 після 60-хвилинної експозиції, з утриманням пригнічення до 8-ї години – 6,97/3,51 log, що свідчить про стабільну фунгіцидну дію у вищій концентрації ($p < 0,0001$).

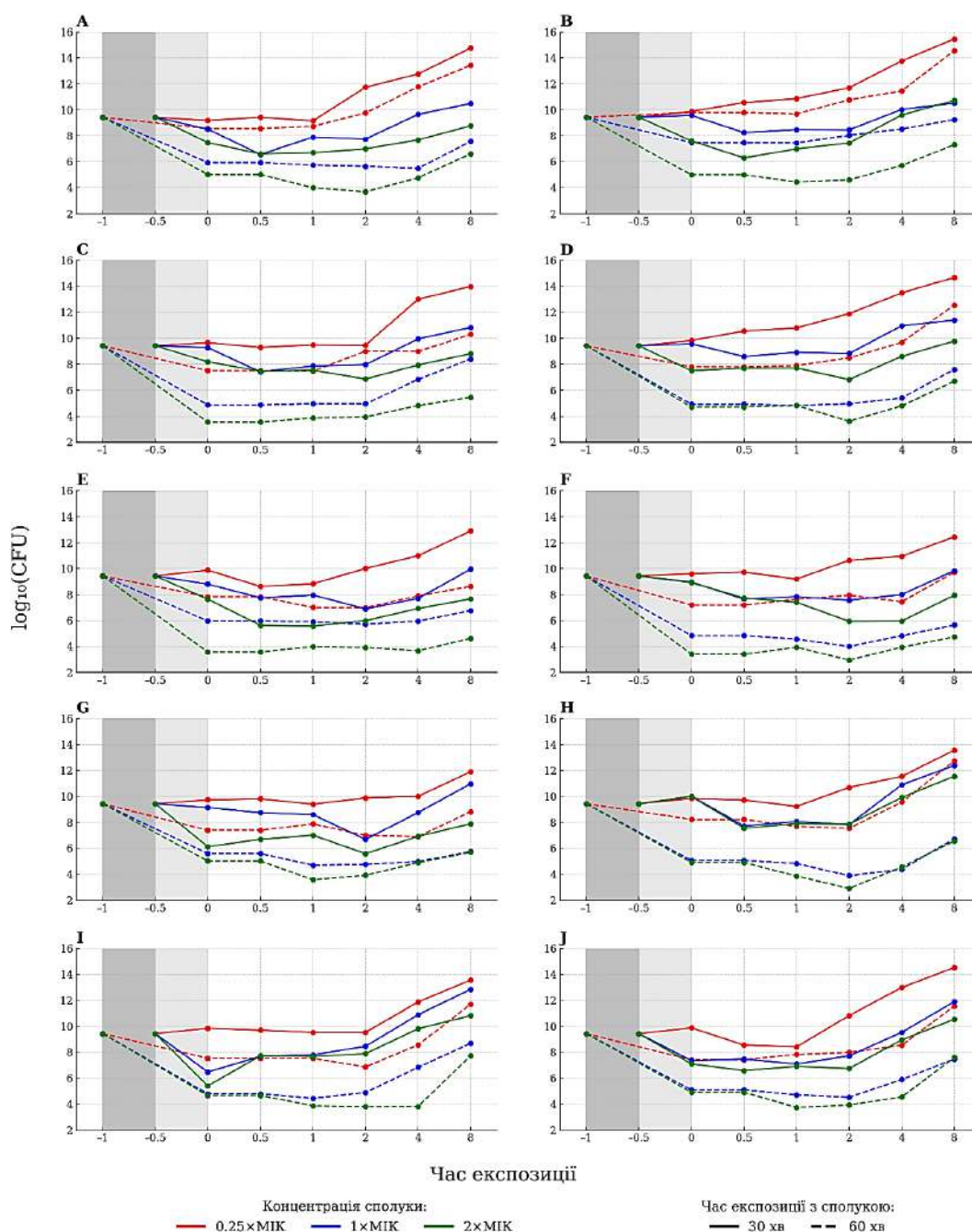


Рис. 5.6. *Post-antimicrobial effect* арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей

(А – Кс2, В – Кс3, С – Кс14, D – Кс15, Е – Кс16, F - Кс22, G – Кр4, Н – Кр8, I – Кр18, J – Кр19) проти *C. albicans* ATCC 10231: зміни $\log_{10}(\text{CFU})$ після 30- та 60-хвилинної експозиції в умовах *in vitro*.

Для сполуки Кс15 спостерігалася подібна до Кс14 тенденція, але з дещо вищою загальною ефективністю. При $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ початкові рівні $\log_{10}(\text{CFU})$ становили 7,65 після 30-хвилинної та 7,89 після 60-хвилинної експозиції, що відповідало вихідному інокулюму. Протягом 8 годин кількість життєздатних клітин зростала до 10,68/9,48 log, що свідчить про відсутність інгібуючої дії при мінімальній концентрації. При $1 \times \text{МІК}$ спостерігалася помітне зниження життєздатності на ранніх часових точках – до 4,90/4,89 log на 1-й годині, однак на 8-й годині фіксувалося часткове відновлення росту – 6,67/5,71 log, що вказує на тимчасовий фунгістатичний ефект з РАЕ близько 2 годин. У разі застосування $2 \times \text{МІК}$ відзначалася чітка дозозалежна динаміка: КУО знижувалась до 3,89/2,79 log на 1-й годині, з утриманням ефекту до 8-ї – 4,95 після 30 хвилин та 3,98 після 60 хвилин експозиції, що відповідає РАЕ понад 4 години. Більш виражене пригнічення при тривалішому контакті підтверджує стабільність фунгіцидної дії за умов підвищеної концентрації ($p < 0,0001$).

На тлі загальної тенденції до слабкої ефективності при низьких концентраціях, Кс16 у дозі $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ також не забезпечувала стійкого протигрибкового ефекту щодо *C. albicans*. Початкові рівні життєздатних клітин становили 7,96 $\log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної та 7,61 після 60-хвилинної експозиції. До 8-ї години кількість колонієутворювальних одиниць зростала до 10,70/10,57 log, що свідчить про відсутність інгібування росту. Підвищення концентрації до $1 \times \text{МІК}$ зумовлювало швидке зниження КУО – 3,95/4,89 log на 1-й годині, однак ефект був нестійким: на 8-й годині фіксувалися значення 5,92 та 6,91 log, що вказує на часткове відновлення життєздатності та короткий РАЕ, тривалістю не більше 2 годин. Найбільш стабільну активність продемонстровано при $2 \times \text{МІК}$: зниження з 7,69/3,78 log (0 год) до 3,67/3,50 (1 год), з утриманням ефекту до 8-ї години – 4,88/4,93 log, що відповідає тривалому РАЕ понад 4

години. Результати свідчать про тривале пригнічення росту при високій концентрації та перевагу довшого контакту з препаратом ($p < 0,0001$).

У концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ сполука Кс22 проявила лише незначну антимікотичну активність. Вже на старті значення КУО становили 7,83 $\log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної та 7,98 після 60-хвилинної експозиції, з подальшим зростанням до 10,89/10,53 $\log$ на 8-й годині, що свідчить про відсутність ефективного пригнічення росту. Застосування $1 \times \text{МІК}$ супроводжувалося помітним зниженням кількості життєздатних клітин: до 4,96/3,75 $\log$ на 1-й годині та 5,72/5,85 на 8-й. Незважаючи на часткове зростання показників у динаміці, значення залишалися нижчими за контрольні, особливо після 60-хвилинної експозиції, що свідчить про РАЕ тривалістю близько 2-3 годин. При $2 \times \text{МІК}$ Кс22 виявляла чітко виражену й ранню фунгіцидну дію: КУО знижувалася до 2,53 $\log$ вже на 1-й годині після 60-хвилинного впливу, а на 8-й годині становила 6,55 після 30 хвилин і 4,00 після 60 хвилин. Така динаміка свідчить про стабільну дозозалежну активність із РАЕ понад 4 години та ефективнішим результатом при тривалішому контакті ($p < 0,0001$).

Сполука КР4 при концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ демонструвала помірну активність щодо *C. albicans* у перші години, однак подальша динаміка вказувала на нестійкість ефекту. На початку експерименту (0 год) кількість життєздатних клітин становила 7,92 $\log_{10}(\text{CFU})$ після 30- та 60-хвилинної експозиції. На 1-й годині спостерігалось зниження КУО до 6,87/5,64 $\log$ відповідно, однак до 8-ї години життєздатність підвищувалась до 8,56/9,99 $\log$, що свідчить про транзиторну дію без пролонгованого ефекту. У разі застосування $1 \times \text{МІК}$ ефект був стабільнішим: КУО знижувалась до 4,58/3,92 $\log$ на 1-й годині, з подальшим збереженням показників до 8-ї години – 6,81 після 30-хвилинної та 5,88 після 60-хвилинної експозиції, що відповідає РАЕ близько 2-3 годин. У концентрації $2 \times \text{МІК}$ КР4 проявляла виражену фунгіцидну дію: на 1-й годині КУО становила 3,01/3,54 $\log$, а на 2-й – 1,63/3,01 $\log$. До 8-ї години життєздатність залишалась зниженою – 1,93 після 30-хвилинної та 4,53 після 60-хвилинної експозиції, що свідчить про ранній і стабільний фунгіцидний ефект з РАЕ понад 4 години.

У концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ сполука КР8 виявила обмежену антикандидозну активність. Початкові рівні КУО становили 7,85 $\log_{10}(\text{CFU})$ після 30-хвилинної та 7,86 після 60-хвилинної експозиції, а на 8-й годині зростали до 10,56/10,89 $\log$, що вказує на відсутність інгібуючого ефекту при мінімальній дозі. Застосування $1 \times \text{МІК}$ сприяло помірному зниженню життєздатності – до 5,48/4,88 $\log$ на 1-й годині, з поступовим зростанням до 7,94/6,82 $\log$ на 8-й. Ефект був більш вираженим після 60-хвилинної експозиції, однак зниження не досягало рівня $\geq 3 \log_{10}$, характерного для фунгіцидної дії, тому РАЕ можна оцінити як невиражене. При $2 \times \text{МІК}$ спостерігалася стабільніша інгібіція: на 1-й годині КУО становила 5,52/4,75 $\log$, а на 8-й – 3,96 після 30 хвилин та 4,80 після 60 хвилин дії. Незважаючи на виражену дозозалежну динаміку, що дозволяє охарактеризувати ефект КР8 як стійкий фунгістатичний із потенційним РАЕ до 2 годин.

Сполука КР18 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ не виявила ефективної протигрибкової дії щодо *C. albicans*. На початку експерименту значення $\log_{10}(\text{CFU})$ становили 7,51 після 30-хвилинної та 7,59 після 60-хвилинної експозиції, а на 8-й годині досягали 11,00/10,85 $\log$, що свідчить про відсутність пригнічення росту при низькому дозуванні. При концентрації $1 \times \text{МІК}$ спостерігалася суттєве зменшення життєздатності клітин: до 5,84/2,92 $\log$ на 1-й годині, із подальшими значеннями 7,53/2,79 на 8-й, що вказує на експозиційно-залежне утримання ефекту при довшій дії з РАЕ понад 3-4 години у разі 60-хвилинної обробки. Найінтенсивніше зниження КУО відзначалося при $2 \times \text{МІК}$: 5,70/2,93 $\log$ на 1-й годині та 3,55/1,95 $\log$ на 8-й, що демонструє швидку та стійку дію, з пригніченням понад 3 $\log_{10}$ у перші години експозиції, особливо при 60-хвилинному впливі та РАЕ > 4 годин.

У концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ сполука КР19 проявила слабкий інгібуючий ефект. Початкові значення $\log_{10}(\text{CFU})$ становили 7,98 після 30-хвилинної та 8,01 після 60-хвилинної експозиції. Незначне зниження на 1-2-й годинах (6,79/6,74) змінювалося поступовим зростанням до 10,81/8,73 $\log$ на 8-й годині, що свідчить про нестійкість ефекту у низькій концентрації. У дозі $1 \times \text{МІК}$ життєздатність знижувалася до 6,71/3,83 $\log$ на 1-й годині та 8,57/4,62 на 8-й, при цьому

показники залишались стабільно нижчими при 60-хвилинній експозиції. Найбільш виразна протигрибкова дія спостерігалася при концентрації $2 \times \text{МІК}$: КУО знижувалась до 5,83/3,69 log на 1-й годині та 4,82/3,83 на 8-й. В усіх часових точках рівні залишались нижчими при довшій експозиції, а зменшення понад 3 $\log_{10}$ свідчило про наявність вираженого фунгіцидного ефекту при максимальному дозуванні з РАЕ до 4 годин.

5.2 Дослідження цитотоксичності четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію

З огляду на зростання антибіотикорезистентності серед збудників інфекційних захворювань, розробка нових хімічних класів антимікробних агентів із прийнятним профілем безпеки є вкрай актуальною [224]. Четвертинні амонієві сполуки, зокрема похідні арилоксиетокси діалкіл амонію, становлять перспективну групу речовин, здатних поєднувати широкий спектр дії з потенційно низькою токсичністю [140].

Враховуючи широке використання МТТ-аналізу як чутливого та надійного інструменту для кількісного визначення життєздатності еукаріотичних клітин, саме цей підхід було застосовано в рамках даного дослідження. Метод базується на відновленні тетразолійного барвника ферментативно активними клітинами до кольорового формагану, інтенсивність якого прямо пропорційна числу життєздатних клітин (рис. 5.7).

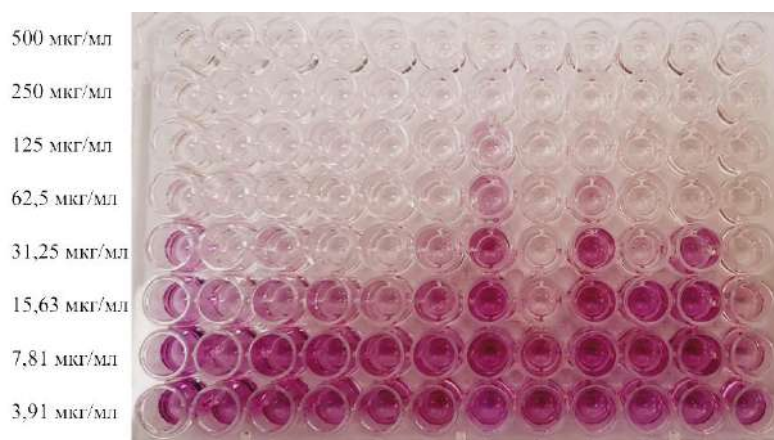


Рис. 5.7. Візуалізація результатів МТТ-аналізу для оцінки цитотоксичності досліджуваних сполук на культурі клітин *HEp-2*. Знебарвлення

вмісту лунок при високих концентраціях свідчить про виражене зниження життєздатності клітин, тоді як інтенсивне фіолетове забарвлення демонструє збереження метаболічної активності.

Такий підхід дає змогу виявити дозозалежні ефекти, охарактеризувати токсичний профіль і виявити концентрації, безпечні для еукаріотичних систем [225, 226]. Результати визначення токсичності досліджуваних сполук стосовно клітинної культури відображено на рисунку 5.8.

Сполука Кс1 виявила виражену дозозалежну цитотоксичність. При 500-250 мкг/мл життєздатність клітин знижувалась до 10 % ($\pm 1-2$ %), при 125-62,5 мкг/мл – зростала до 16-24 %, залишаючись на рівні вираженої токсичності. Перехід до помірної токсичності спостерігався на 31,25 мкг/мл (56 %), а на 15,63 мкг/мл – життєздатність перевищувала 75 %. При 7,81 та 3,9 мкг/мл вона становила 93 % і 95 % відповідно ($p > 0,05$), що свідчить про безпечний профіль у низькому діапазоні концентрацій. Високі значення похибки на деяких рівнях (до 14 %) свідчать про варіабельність ефекту, однак загальна динаміка дозволяє вважати Кс1 перспективною за умов коригування дози.

Сполука Кс2 проявила аналогічний профіль токсичності: при 500-250 мкг/мл життєздатність клітин становила 12-14 % (± 5 %), при 125-62,5 мкг/мл – 13-17 %, а при 31,25 мкг/мл – лише 16 %, що вказує на стійкий токсичний ефект до цього рівня. Значне покращення спостерігалось при 15,63 мкг/мл (33 %), а на 7,81-3,9 мкг/мл життєздатність досягала 95 % і 94 % відповідно ($p > 0,05$). Таким чином, Кс2 також характеризується високою токсичністю у середньо-високих дозах та безпечністю у низьких.

Сполука Кс3 демонструвала поступове зростання життєздатності клітин із 10 % при 500 мкг/мл (± 1 %) до 16 % на 125 мкг/мл та 20-26 % у межах 62,5-31,25 мкг/мл. Ці показники свідчать про помірну токсичність у середньому концентраційному діапазоні. Значне підвищення життєздатності відзначалося при 15,63 мкг/мл – 36 % (± 9 %), а при 7,81-3,9 мкг/мл – 86 % і 96 % відповідно ($p > 0,05$). Таким чином, Кс3 має відносно безпечний профіль у нижньому діапазоні

доз, однак обмежений щодо застосування при концентраціях >30 мкг/мл через токсичний вплив.

Сполука Кс4 продемонструвала м'який профіль токсичності. На високих концентраціях (500-250 мкг/мл) життєздатність клітин залишалася на рівні 11-14 %, при 125-62,5 мкг/мл – 13-15 %, що свідчить про збереження цитотоксичного впливу в середньому діапазоні. Починаючи з 31,25 мкг/мл, показник залишався стабільним (16 %, ± 3 %), проте вже на 15,63 мкг/мл життєздатність стрімко зростала до 73 %, а на 3,9 мкг/мл перевищила контрольне значення – 102 % (± 11 %) ($p > 0,05$). Такий профіль свідчить про добру переносимість сполуки у низьких концентраціях і потенційно низьку загальну токсичність.

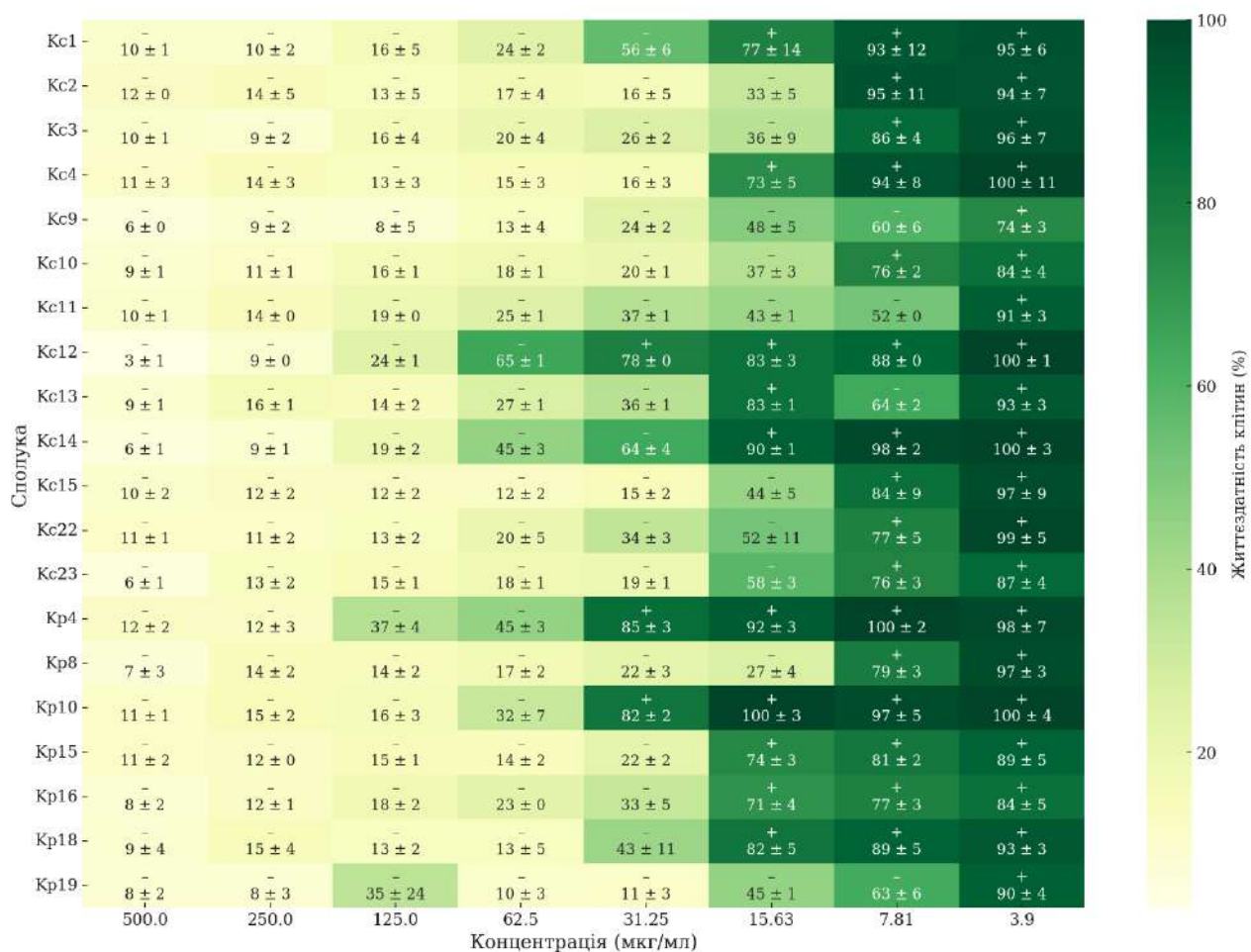


Рис. 5.8. Теплова карта життєздатності клітин у тесті МТТ для похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію. У комірках вказано символічне позначення рівня токсичності («+» – життєздатність $\geq 70\%$, умовно

прийнятна концентрація; «-» – життєздатність <70%) Зелений колір фону відповідає загальному рівню життєздатності клітин, від нижчого (світліший тон) до вищого (насичений зелений) ($m \pm SD$).

Сполука Кс9 виявила найвищий токсичний потенціал серед усіх досліджуваних речовин. Життєздатність клітин залишалася низькою навіть при зниженні концентрації: 6-9 % при 500-250 мкг/мл, 8-13 % при 125-62,5 мкг/мл і лише 24 % при 31,25 мкг/мл. Навіть на рівні 15,63 мкг/мл життєздатність становила 48 %, що не перевищує межу помірної токсичності. Лише при 7,81 мкг/мл і 3,9 мкг/мл вона зростала до 60 % і 74 % відповідно ($p < 0,05$), що залишає лише обмежене вікно безпечної концентрації. Такий профіль потребує обережного підходу до використання цієї сполуки або її структурної оптимізації.

Сполука Кс10 демонструвала стабільну дозозалежну динаміку з поступовим підвищенням життєздатності клітин від 9 % при 500 мкг/мл до 20 % при 31,25 мкг/мл (± 1 %). На концентрації 15,63 мкг/мл життєздатність сягала 37 %, при 7,81 мкг/мл – 76 %, а при 3,9 мкг/мл – 84 % ($p > 0,05$). Таким чином, Кс10 є відносно безпечною у нижньому діапазоні доз і має передбачуваний токсикологічний профіль. Плавна залежність і низькі значення похибки свідчать про надійність дії сполуки.

Сполука Кс11 характеризувалася помірною цитотоксичністю у середньому діапазоні концентрацій. При 500 мкг/мл життєздатність становила 10 %, а при 250 мкг/мл – 14 % (± 1 %), що свідчить про сталий токсичний ефект на високих дозах. На рівні 125-62,5 мкг/мл життєздатність зростала до 19-25 %, а при 31,25 мкг/мл – до 37 %. Подальше зниження концентрації забезпечувало суттєве покращення: 52 % при 7,81 мкг/мл та 91 % при 3,9 мкг/мл ($p > 0,05$). Такий профіль є типовим для дозозалежної цитотоксичності зі збереженням клітинної життєздатності на низьких рівнях концентрації.

Сполука Кс12 продемонструвала один із найсприятливіших профілів безпеки. На високій концентрації 500 мкг/мл життєздатність була мінімальною (3 %, ± 1 %), але вже при 125 мкг/мл вона зростала до 24 %, а при 62,5 мкг/мл –

до 65 %. На рівні 31,25 мкг/мл показник досяг 78 %, а далі – лише зростав: 83 % (15,63 мкг/мл), 88 % (7,81 мкг/мл), і навіть 101 % при 3,9 мкг/мл ($p > 0,05$). Такий профіль свідчить не лише про відсутність токсичності на низьких дозах, а й про можливий цитопротекторний ефект. Сполука Кс12 є перспективною для подальших досліджень з огляду на її біосумісність.

Речовина Кс13 проявила відносно м'яку цитотоксичність із поступовим зниженням токсичної дії при зменшенні концентрації. На рівні 500 мкг/мл життєздатність клітин становила 9 % (± 1 %), при 250 мкг/мл – 16 %, а при 125 мкг/мл – 14 %. Значне покращення спостерігалось вже при 62,5 мкг/мл (27 %), а при 31,25 мкг/мл – до 36 %. Подальше зниження концентрації забезпечувало високі показники життєздатності: 83 % при 15,63 мкг/мл, 64 % при 7,81 мкг/мл і 93 % при 3,9 мкг/мл ($p > 0,05$). Незважаючи на помірну токсичність у середньому діапазоні, сполука демонструє хороший безпечний профіль на низьких дозах, що визначає її потенціал для подальших досліджень.

Сполука Кс14 показала виражену дозозалежну динаміку з чітким переходом від токсичності до біосумісності. При 500 мкг/мл життєздатність становила 6 % (± 1 %), на 250-125 мкг/мл – 9-19 %, при 62,5 мкг/мл – 45 % (± 3 %), що відповідає помірній токсичності. Натомість, на концентраціях 31,25-15,63 мкг/мл життєздатність становила 64-90 %, а на 7,81 та 3,9 мкг/мл перевищувала контроль (98-105 %) ($p > 0,05$). Високі значення життєздатності при зниженій концентрації, а також стабільні значення повторів (SD – 1-4 %) свідчать про низький цитотоксичний потенціал. Кс14 є однією з найменш токсичних сполук у дослідженні.

Сполука Кс15 проявила відносно стабільний профіль токсичності в діапазоні високих і середніх концентрацій. Життєздатність клітин залишалася на рівні 10-15 % при 500-31,25 мкг/мл (± 2 %), що свідчить про помірну, але стабільну цитотоксичність. Лише при концентрації 15,63 мкг/мл показник підвищився до 44 % (± 5 %), а подальше зниження концентрації забезпечило значне покращення життєздатності: 84 % при 7,81 мкг/мл і 97 % при 3,9 мкг/мл

($p > 0,05$). Таким чином, Кс15 характеризується передбачуваним дозозалежним ефектом з добрим профілем безпеки у нижньому діапазоні концентрацій.

Сполука Кс22 виявила помірну токсичність у середніх дозах із поступовим покращенням при зменшенні концентрації. На рівні 500-125 мкг/мл життєздатність становила 11-13 %, при 62,5 мкг/мл – 20 % (± 5 %), а при 31,25 мкг/мл – 34 % (± 3 %). Позитивна динаміка спостерігалась уже на 15,63 мкг/мл – 52 % (± 11 %), що свідчить про вихід за межі токсичного діапазону. При 7,81 мкг/мл життєздатність підвищувалась до 77 %, а при 3,9 мкг/мл – до 99 % (± 5 %) ($p > 0,05$), що вказує на добру переносимість сполуки при терапевтично виправданих дозах.

Сполука Кс23 проявила помірну токсичність на високих концентраціях і виражене покращення життєздатності клітин при зменшенні дози. При 500 мкг/мл життєздатність становила 6 % (± 1 %), а при 250-125 мкг/мл – 13-15 %. На рівні 62,5 мкг/мл вона підвищувалась до 18 %, а при 31,25 мкг/мл – 19 % (± 1 %). При подальшому зниженні концентрації до 15,63 мкг/мл життєздатність зростала до 58 %, а при 7,81 і 3,9 мкг/мл – до 76 % і 87 % відповідно ($p > 0,05$). Така динаміка свідчить про наявність безпечного діапазону доз, хоча ефект на середніх концентраціях все ще вимагає обережності через залишкову цитотоксичність.

Сполука Кр4 продемонструвала добрий профіль безпеки з помірною токсичністю лише у вузькому середньому діапазоні. При 500-250 мкг/мл життєздатність клітин становила 12 %, на 125-62,5 мкг/мл – 37-45 % ($\pm 3-4$ %), що відповідає помірному токсичному ефекту. Проте вже на 31,25 мкг/мл спостерігалось суттєве покращення (85 %), а при 15,63-3,9 мкг/мл життєздатність перевищувала контрольні значення: 92-102 % ($p > 0,05$). Отже, Кр4 є однією з найбільш біосумісних сполук при концентраціях до 31,25 мкг/мл, що робить її перспективною для подальшого вивчення.

Сполука Кр8 проявила низький рівень токсичності на всьому діапазоні концентрацій, за винятком високих доз. При 500 мкг/мл життєздатність клітин становила 7 % (± 3 %), а при 250-125 мкг/мл – 14 % (± 2 %). У середньому

діапазоні (62,5-31,25 мкг/мл) життєздатність зростала до 17-22 %, що відповідає помірній токсичності. Водночас, при 15,63 мкг/мл спостерігалось суттєве покращення – 27 %, а на 7,81 та 3,9 мкг/мл показники становили 79 % і 97 % відповідно ($p > 0,05$). Така динаміка свідчить про добру біосумісність у терапевтично релевантних дозах, із чітким дозозалежним ефектом та низькими стандартними відхиленнями.

Сполука Кр10 вирізнялася одним із найсприятливіших профілів. На рівні 500-125 мкг/мл життєздатність залишалася на рівні 11-16 %, що свідчить про наявність токсичної дії у високих концентраціях. Починаючи з 62,5 мкг/мл життєздатність зростала до 32 %, а на 31,25 мкг/мл досягала 82 %. У діапазоні 15,63-3,9 мкг/мл клітини зберігали повну життєздатність – 100-101 %, що перевищує контрольне значення ($p > 0,05$). Низьке значення похибки (2-5 %) свідчить про відтворюваність результатів. Загалом, Кр10 є однією з найбільш безпечних сполук у дослідженні, з потенційною можливістю використання навіть при помірних концентраціях.

Сполука Кр15 продемонструвала помірну токсичність у високому та середньому діапазоні концентрацій з поступовим покращенням життєздатності клітин у нижчих дозах. При 500 мкг/мл життєздатність становила 11 % (± 2 %), при 250-125 мкг/мл – 12-15 %, а при 62,5 мкг/мл – 14 %. Незначне підвищення спостерігалось на 31,25 мкг/мл (22 %), проте суттєве покращення фіксовано при 15,63 мкг/мл – 74 % (± 3 %), та при 7,81-3,9 мкг/мл – 81 % і 89 % відповідно ($p > 0,05$). Така динаміка підтверджує наявність дозозалежного ефекту та добру переносимість Кр15 на концентраціях, нижчих за 15 мкг/мл.

Сполука Кр16 виявила схожий профіль із дещо менш вираженою токсичністю у середньому діапазоні. При 500-250 мкг/мл життєздатність становила 8-12 %, на 125-62,5 мкг/мл – 18-23 %, а при 31,25 мкг/мл – 33 %. Починаючи з 15,63 мкг/мл життєздатність перевищувала 70 %, а при 7,81 мкг/мл та 3,9 мкг/мл досягала 77 % і 84 % відповідно ($p > 0,05$). Спостерігалася стабільна доза-відповідь і невисока похибка (до 5 %), що вказує на прогнозовану дію сполуки та потенційно безпечне застосування у низьких концентраціях.

Сполука Кр18 демонструвала помірну цитотоксичність у широкому діапазоні концентрацій із чіткою дозозалежною динамікою. При 500 мкг/мл життєздатність становила 9 % (± 4 %), при 250-125 мкг/мл – 15 % і 13 %, а при 62,5 мкг/мл – 13 % (± 5 %), що свідчить про сталу токсичну дію на високих і середніх рівнях. Водночас при 31,25 мкг/мл показник підвищувався до 43 % (± 11 %), а при 15,63-3,9 мкг/мл – до 82-93 % ($p > 0,05$). Ці значення свідчать про помірну токсичність при дозах >30 мкг/мл і добру переносимість на низьких концентраціях.

Сполука Кр19 виявилась однією з найбільш токсичних серед досліджених. При 500-250 мкг/мл життєздатність становила 8 % ($\pm 2-3$ %), при 125 мкг/мл – лише 35 % із високою похибкою (± 24 %), що свідчить про нестабільність ефекту. Подальше зниження концентрації до 62,5-31,25 мкг/мл не спричинило суттєвого покращення – життєздатність залишалась на рівні 10-11 %. Лише при 15,63 мкг/мл вона підвищувалась до 45 %, а на 7,81 і 3,9 мкг/мл – до 63 % і 90 % відповідно ($p > 0,05$). Попри нормалізацію життєздатності на найнижчій концентрації, загальний профіль Кр19 свідчить про значну цитотоксичність і обмежений діапазон безпечного застосування.

Висновки до розділу 4

1. У дослідженні *time-kill* динаміки щодо *S. aureus* ATCC 25923 встановлено, що всі досліджувані арилоксиетокси діалкіл амонієві солі виявляють концентраційно- та часозалежну антимікробну активність. Повна елімінація популяції спостерігалась при $1 \times \text{МІК}$ і $2 \times \text{МІК}$, тоді як при $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ фіксувався транзиторний або слабкий ефект.

2. Найвищу антистафілококову активність у *time-kill* тесті продемонстрували Кс3, Кс15, Кс22, Кр10, Кр18 і Кр19, які у концентрації $2 \times \text{МІК}$ забезпечували повну загибель клітин *S. aureus* вже через 2 години інкубації.

3. При аналізі *time-kill* динаміки щодо *Ent. faecalis* ATCC 29213 встановлено, що більшість сполук забезпечували повне знищення бактеріальної

популяції при $2 \times \text{МІК}$ протягом 2-4 годин, тоді як при $1 \times \text{МІК}$ ефект досягався в межах 8 годин.

4. Найбільш активними щодо ентерококів у *time-kill* дослідженні були Кс3, Кс4, Кс22, Кр8, Кр10, Кр18 і Кр19, які забезпечували швидкий та стійкий бактерицидний ефект, тоді як у $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ їх дія переважно обмежувалась транзиторним зниженням КУО.

5. У *time-kill* тесті щодо *C. albicans* ATCC 10231 всі сполуки виявили виражену фунгіцидну активність при $1 \times \text{МІК}$ і $2 \times \text{МІК}$, з повною елімінацією популяції в межах перших 4 годин. Найактивнішими щодо *C. albicans* у *time-kill* дослідженні були Кс2, Кс3, Кс14, Кс15, Кс16, Кс22, Кр4, Кр8, Кр18 і Кр19, які при $2 \times \text{МІК}$ повністю інгібували популяцію грибів вже через 2 години експозиції.

6. У дослідженні РАЕ щодо *S. aureus* встановлено, що більшість сполук у концентрації $2 \times \text{МІК}$ після 60-хвилинної експозиції зберігали інгібуючу активність до 8 годин, тоді як при $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ ефект був короткотривалим або відсутнім. Найстійкіший РАЕ проти *S. aureus* продемонстрували Кс15, Кс22, Кр10, Кр18 і Кр19, які забезпечували пригнічення росту понад $3 \log_{10}(\text{CFU})$ упродовж щонайменше 6–8 годин після видалення агента.

7. Щодо *Ент. faecalis* найбільш виражене РАЕ зафіксовано для Кс3, Кс4, Кс15, Кс22, Кр8, Кр10, Кр18 і Кр19, особливо за умови 60-хвилинної експозиції та при концентрації $2 \times \text{МІК}$.

8. Для більшості сполук у дослідженні РАЕ щодо *C. albicans* встановлено стійке пригнічення росту при $2 \times \text{МІК}$ після 60-хвилинного контакту, з повною або майже повною елімінацією грибкових клітин упродовж 8 годин. Найтриваліший і найвиразніший ефект спостерігався у Кс14, Кс15, Кс22, Кр4, Кр18 і Кр19, які у концентрації $2 \times \text{МІК}$ забезпечували зниження життєздатності грибів понад $3 \log_{10}$ і утримували ефект до завершення експерименту.

9. До найбільш перспективних сполук за сукупністю показників (виражена *time-kill* дія, тривалий РАЕ/РАЕ, стабільна ефективність у різних модельних системах) належать Кс15, Кс22, Кр10, Кр18 і Кр19. Ці речовини забезпечують швидке й стійке пригнічення росту мікроорганізмів при

концентраціях, що не перевищують $2 \times \text{МІК}$, та зберігають антимікробну дію навіть після короткочасної експозиції.

10. Усі досліджені сполуки виявили виражену дозозалежну цитотоксичність, із максимальним зниженням життєздатності клітин НЕр-2 у високому концентраційному діапазоні (500-250 мкг/мл), де показники переважно не перевищували 15 %.

11. У середньому діапазоні концентрацій (125-62,5 мкг/мл) більшість сполук зберігали помірну або помітну токсичність (життєздатність $< 50\%$), однак деякі речовини (наприклад, Кр4, Кс12) демонстрували зниження токсичного ефекту.

12. При концентраціях $\leq 31,25$ мкг/мл для переважної більшості сполук спостерігалось суттєве покращення життєздатності клітин, що свідчить про наявність діапазону потенційної біосумісності. Найменший токсичний ефект у низьких концентраціях (15,63-3,9 мкг/мл) виявлено для сполук Кс12, Кр4, Кр10, Кс14 і Кс13, життєздатність при цьому досягала показників контролю.

Результати досліджень представлені в даному розділі викладені в публікаціях [200, 201, 209, 216]

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

У сучасних умовах зростання антибіотикорезистентності, зокрема серед представників патогенних бактерій, дріжджеподібних грибів і мікобактерій, актуалізується потреба у створенні нових сполук з розширеним спектром антимікробної активності. Особливе занепокоєння викликає підвищена стійкість до класичних антибіотиків та протигрибкових засобів у представників *S. aureus*, *Ent. faecalis*, *Candida* spp., *Mycobacterium* spp., що значно ускладнює ефективну терапію інфекційних захворювань [227, 228].

У цьому контексті перспективними є похідні четвертинних амонієвих сполук, які демонструють здатність порушувати цілісність клітинних мембран за рахунок електростатичної взаємодії з фосфоліпідами. Результати попередніх досліджень засвідчують, що ліпофільність молекули, довжина алкільного ланцюга та наявність арильних або фенольних фрагментів значно посилюють біоцидну дію таких сполук [229, 230]. Зокрема, катіонні агенти з фенольними залишками здатні ефективно проникати через клітинні бар'єри, демонструючи фунгіцидну та бактерицидну активність у низьких концентраціях [231].

У даному дослідженні проведено комплексну оцінку антимікробної дії новосинтезованих четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо широкого спектра мікроорганізмів – грампозитивних бактерій, в тому числі нетуберкульозних мікобактерій, умовно-патогенних грибів роду *Candida* (включаючи *C. auris*), а також скринінг активних речовин щодо пліснявих грибів роду *Aspergillus* та протиамебної активності (*Acanthamoeba* sp.). Оцінювання здійснювали за допомогою стандартних методів кількісної та якісної мікробіології – дифузійних тестів, визначення МІК, а також дослідження фармакіетики методами «time-kill assay» та визначення постантибіотичного ефекту. Особливу увагу було приділено порівнянню з ефективністю референтних антимікробних засобів.

Результати дослідження свідчать про виявлення низки сполук із високою та селективною активністю, яка в окремих випадках перевищувала ефективність

референтних антимікробних препаратів. Зважаючи на встановлену міжвидову варіабельність чутливості та специфіку взаємодії з клітинною оболонкою збудників, дані результати можуть слугувати основою для подальших фармакодинамічних, токсикологічних та *in vivo* досліджень.

Проведений скринінг підтвердив, що похідні четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію є перспективними антимікробними агентами з переважною дією щодо грампозитивних бактерій. Найвищу активність продемонстровано проти *S. aureus*, де 45 із 52 досліджених сполук викликали чітко виражене інгібування росту. Особливий інтерес становлять речовини з зонами затримки понад 17 мм, зокрема Kp12, Kp13, Kc20 та Kc29.

Методом серійних розведень звужено спектр сполук з вираженою антистафілоковою активністю. Десять найбільш ефективних речовин, серед яких Kc22, Kc1, Kc3, Kc2, Kc15, Kp18, Kc4, Kp16, Kp19 та Kp10, мали значення МІК у межах 1-4 мкг/мл. Найнижче середнє значення МІК зафіксовано для Kc22 ($1,17 \pm 0,20$ мкг/мл), що дозволяє розглядати цю речовину як перспективного претендента для розробки протистафілокових препаратів. Отримані результати узгоджуються з попередніми дослідженнями, що вказують на підвищену чутливість *S. aureus* до катіонних детергентів з арильними радикалами [232].

У ході вивчення антимікробної активності четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо клінічних ізолятів *S. aureus* встановлено високий рівень ефективності значної частини досліджуваних сполук. Отримані результати демонструють, що ряд похідних арил ациклічних аміноспиртів значно перевищують за активністю традиційно застосовувані антисептики – мірамістин і декаметоксин, а в окремих випадках наближаються до або перевершують ефективність референтних антибіотиків (тетрацикліну, ванкоміцину).

Так, такі сполуки як Kc1, Kc2, Kc3, Kc4, Kc15, Kc22, Kp18 і Kp19 демонстрували інгібування понад 90% клінічних штамів уже при концентраціях 3,9-7,81 мкг/мл. За значеннями медіани МІК (1,47-1,95 мкг/мл) та МІК₉₀ (3,91-

7,81 мкг/мл), більшість із цих речовин були ефективнішими за ампіцилін і бензилпеніцилін, а в окремих випадках перевищували тетрациклін. Порівняння з мірамістином виявило суттєву перевагу експериментальних сполук: мірамістин забезпечував повне пригнічення лише при $\geq 15,63$ мкг/мл, тоді як четвертинні солі демонстрували аналогічну або вищу ефективність у 2-4 рази нижчих концентраціях.

Варто відзначити, що отримані дані демонструють структурну залежність активності сполук: похідні з 2,4-дитретбутилфеноксигрупою (наприклад, Кс15, Кс22, Кр10) або гексаметиленіміновим/піролідинійним радикалом у третинному аміні (Кс4, Кр16) виявились серед найактивніших, що узгоджується з даними літератури про роль ліпофільних і катіонних фрагментів у порушенні цілісності клітинної мембрани бактерій [232].

Щодо *S. epidermidis*, досліджувані сполуки також продемонстрували високу антимікробну активність. Показники MIK_{50} становили 0,98–1,95 мкг/мл, а MIK_{90} – 3,9–15,63 мкг/мл. Особливо ефективними були Кс3, Кс4, Кр10 та Кр19, які забезпечували інгібування понад 90% ізолятів при концентрації 3,9–7,81 мкг/мл. Серед досліджених антисептиків декаметоксин проявляв дещо вищу активність порівняно з мірамістином, однак поступався більшості новосинтезованих сполук при тих самих концентраціях. Отримані результати дозволяють розглядати арилоксиетокси похідні як більш ефективну альтернативу на тлі збільшення випадків резистентності коагулазонегативних стафілококів до класичних антисептиків [233].

Порівняльний аналіз чутливості метицилін-чутливих та резистентних штамів стафілококів засвідчив загальну тенденцію до зниження активності досліджуваних сполук стосовно резистентних до метициліну ізолятів. Для більшості речовин було встановлено підвищення значень MIK_{90} у групі MRSA/MRSE у 2-4 рази. Тим не менше, навіть при зростанні концентрацій, абсолютна ефективність залишалась високою (понад 90% інгібування при 7,81–15,63 мкг/мл), що свідчить про збереження клінічного потенціалу проти

резистентних штамів. Це особливо актуально у світлі поширення MRSA у нозокоміальному середовищі [234].

Отримані результати *time-kill* дослідження дозволили детально охарактеризувати динаміку антимікробної дії досліджуваних сполук щодо *S. aureus* ATCC 25923. Всі речовини продемонстрували концентраційно- та часозалежну активність, що є типовим для катіонних поверхнево-активних агентів, однак характер ефекту суттєво варіював залежно від хімічної будови молекули [235].

Більшість сполук досягали повної ерадикації стафілококів вже впродовж перших 2-4 годин при концентрації $1 \times \text{МІК}$. Така швидкодія відповідає критеріям ефективної бактерицидної сполуки і є клінічно значущою з огляду на сучасні рекомендації щодо емпіричної терапії інфекцій, спричинених грампозитивними коками [233].

Відзначено також низку сполук, для яких у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ реалізувався транзиторний бактеріостатичний ефект (наприклад, Кс1, Кс3, Кс15, Кр18). Вони знижували життєздатність популяції в перші години, однак не забезпечували повної елімінації, що зумовлювало відновлення росту. Це може бути пов'язано з частковим порушенням цілісності мембран або незворотніми, але недостатньо глибокими метаболічними змінами, які бактеріальні клітини здатні компенсувати [231].

З іншого боку, для Кс2, Кс22 та Кр19 у концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ не було виявлено істотного зниження кількості КУО, що свідчить про необхідність досягнення щонайменше $1 \times \text{МІК}$ для реалізації ефекту. Ймовірно, це пов'язано з особливостями зарядової густини молекули та ступенем гідрофобності, які визначають швидкість проникнення через клітинну стінку стафілококів [232].

Порівняльний аналіз показав, що сполуки з бензиловими амінофункціоналами, а також замісниками типу гексаметиленіміну (Кс4, Кс22, Кр16), мали кращу активність, ніж речовини з більш простими радикалами. Отримані результати вказують на існування структурно-активної залежності, відповідно до якої збільшення об'єму, ліпофільності та гнучкості молекули

підвищує ефективність взаємодії з клітинною мембраною бактерій. [216]. Особливо виділялись сполуки Kp18 і Kp19, що містять алкілароматичні заміщення у третинному аміногруповому фрагменті – ці речовини демонстрували не лише швидкий, але й пролонгований бактерицидний ефект.

Усі досліджувані сполуки реалізовували бактерицидний ефект при $1 \times \text{МІК}$ та $2 \times \text{МІК}$. Це дозволяє припустити, що антимікробна дія четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію має властивості, притаманні дезінфекційним агентам з мембраноруйнівним механізмом дії. Це узгоджується з раніше описаними властивостями сполук цієї групи [237]

Оцінка постантимікробної дії досліджуваних арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей щодо *S. aureus* ATCC 25923 засвідчила наявність вираженого концентраційного та експозиційного впливу на тривалість залишкового ефекту після припинення дії препарату. Аналіз отриманих результатів свідчить, що більшість сполук демонстрували ПАЕ тривалістю не менше 2 годин у концентраціях, що відповідали $1 \times \text{МІК}$. Застосування вищої концентрації ($2 \times \text{МІК}$) у поєднанні з подовженою експозицією (60 хв) дозволяло подовжити ефект до 4-5 годин.

Найбільш виражений ПАЕ спостерігався у Kc3, Kc4, Kc15 та Kp16. Для цих сполук відзначено стійке пригнічення росту протягом щонайменше 4 годин після 60-хвилинного впливу у дозі $2 \times \text{МІК}$. Такі результати узгоджуються з даними *time-kill* дослідження, де зазначені сполуки демонстрували швидке зниження кількості КУО і забезпечували повну елімінацію популяції бактерій.

Особливо перспективними виглядають Kp18 і Kp19, які, незважаючи на дещо повільніший початок дії, забезпечували стійке зниження життєздатності бактерій при вищих концентраціях і зберігали інгібуючий ефект протягом усього періоду спостереження. Така динаміка свідчить про наявність пролонгованої мембранотропної дії, яка може пояснюватися специфічними властивостями третинного аміногрупового фрагмента з ароматичними заміщеннями. Відомо, що ліпофільність і об'ємність таких замісників можуть сприяти пролонгації дії через стійке вбудовування в бактеріальні мембрани [228].

У концентрації 1×МІК більшість сполук демонстрували транзиторну дію з ПАЕ ~2 години, що, втім, перевищує залишкову активність типових антисептичних препаратів на основі хлоргексидину або октенідину, для яких середнє значення ПАЕ щодо стафілококів становить 0,5-1,5 години [239]. При концентрації 2×МІК майже всі досліджувані сполуки досягали рівня ПАЕ ≥ 4 години, що свідчить про потенційну клінічну перспективність сполук у короткотривалих схемах застосування [240].

Сполуки, які не проявляли РАЕ при 1×МІК, демонстрували пригнічення росту лише при 2×МІК або при подовженій експозиції. Така залежність від тривалості контакту підкреслює важливість забезпечення достатнього часу дії сполук у терапевтичному застосуванні.

Таким чином, досліджені четвертинні солі арилоксиетокси діалкіл амонію продемонстрували виражену постантимікробну дію щодо *S. aureus* ATCC 25923. Найперспективнішими за сумою параметрів залишкового ефекту, концентраційної та експозиційної залежності виявилися сполуки Кс3, Кс4, Кс15, Кр16, Кр18 та Кр19. Збереження інгібуючого ефекту протягом 4-5 годин після припинення впливу свідчить про потенційну клінічну перевагу таких речовин над класичними антисептиками.

Антимікробна дія сполук щодо *Ent. faecalis* ATCC 29212 була менш вираженою порівняно зі стафілококами, та була обмежена переважно зонами до 15 мм. Це частково зумовлено складнішою будовою клітинної стінки ентерококів, яка часто перешкоджає проникненню катіонних молекул. Окрім того, ентерококи мають здатність до активного виведення токсичних агентів, що також знижує ефективність потенційних антимікробних засобів [241].

Методом серійних розведень встановлено, що найвищу активність, щодо референтного штаму продемонструвала сполука Кр10 із МІК $0,58 \pm 0,10$ мкг/мл. Показники інших найефективніших сполук зафіксовано в діапазоні 1-4 мкг/мл. Підтвердженням обмеженої активності стали результати визначення МІК щодо клінічних штамів, найбільш активні сполуки інгібували 88-96% ізолятів при концентрації 15,63 мкг/мл. Значення МІК₅₀ коливались у межах 1,95-3,9 мкг/мл,

що свідчить про помірну, але клінічно значущу ефективність. Активність ряду досліджених солей перевищувала ефективність тетрацикліну, а також була співставна з декаметоксином.

Ідентично до *S. aureus*, антимікробна активність щодо *Ent. faecalis* ATCC 29212 залежала від концентрації та часу контакту. У мінімальній концентрації усі досліджені сполуки продемонстрували мінімальну активність.

Натомість при концентраціях $1\times\text{МІК}$ та $2\times\text{МІК}$ більшість досліджуваних похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію продемонстрували стійке зниження кількості життєздатних клітин, що призводило до повної ерадикації популяції бактерій у межах 4-8 годин. Отримані результати є показовими у порівнянні з референтними даними щодо ефективності традиційних антимікробних агентів [242].

Зокрема, сполуки Kp18 і Kp19 знову підтвердили свою високу ефективність, подібно до результатів, отриманих щодо стафілококів. Їхня активність, вірогідно, обумовлена структурною наявністю бензильних фрагментів у третинному аміногруповому заміщенні, що забезпечує підвищену ліпофільність та сприяє активній взаємодії з клітинною мембраною ентерококів. Аналогічні залежності структури-активності (SAR) для катіонних сполук було встановлено в дослідженнях молекулярного моделювання та біофізичних експериментів [243].

Отримані результати *РАЕ* щодо *Ent. faecalis* свідчать, що усі сполуки виявили недостатню активність при концентрації $\frac{1}{4}\times\text{МІК}$. Для концентрацій $1\times\text{МІК}$ та $2\times\text{МІК}$ простежуються транзиторна бактеріостатична дія з *РАЕ* до 2-3 годин та стійка бактерицидна дія з *РАЕ* понад 4 години, що найчастіше спостерігалася при $2\times\text{МІК}$ та 60-хвилинній експозиції.

Найефективніші сполуки в умовах $2\times\text{МІК}$ продемонстрували пригнічення росту *Ent. faecalis* із утриманням ефекту понад 4 години. Для них характерною є швидка редукція життєздатних клітин протягом перших 1-2 годин з мінімальним подальшим відновленням росту, що свідчить про бактерицидний механізм дії.

Натомість Кс2 та Кр16 виявили меншу ефективність, навіть при подвоєній МІК, що може бути пов'язано з особливостями алкільного ланцюга чи меншою здатністю до взаємодії з мембранами ентерококів [244]. Результати узгоджуються з сучасними уявленнями про РАЕ як маркер тривалості залишкової антимікробної дії [245], що важливо при моделюванні інтервалів дозування.

Помітна активність щодо *B. subtilis* ATCC 6633 підтверджує спектр антимікробної дії сполук. Результати демонструють, що деякі сполуки здатні ефективно діяти навіть на спороутворюючі мікроорганізми, які, як правило, є стійкішими до фізико-хімічних факторів [246]. Серед 28 активних сполук, десять продемонстрували МІК у межах 0,26-1,00 мкг/мл. Особливо варто підкреслити сполуки Кс14 і Кр18, що забезпечували найнижчі значення МІК ($0,26 \pm 0,06$ мкг/мл), що свідчить про потенційно бактерицидний механізм.

Вивчення дії на *M. smegmatis* дозволив визначити найбільш ефективні сполуки з антимікобактеріальною активністю з метою подальшого вивчення. Структурна специфіка мікобактерій, зокрема наявність ліпідозбагаченої клітинної стінки, зазвичай утруднює дифузію антибактеріальних агентів [241].

Отримані результати виявили чітку залежність активності від концентрації речовини та виду збудника. Найвищу чутливість продемонстрував штам *Mycobacterium B5*, щодо якого більшість сполук уже на рівні концентрації К-І (що відповідала МІК для *M. smegmatis*) забезпечували значне зменшення життєздатності або повне знищення бактеріальної популяції.

Найвищу ефективність серед протестованих сполук продемонстрували Кс15 і Кр18, які показали бактерицидну дію, що була порівнювана рифампіцину, який вважається «золотим» стандартом антимікобактеріальної терапії [247]. При цьому сполуки Кр18, Кс15 та Кс12 значно перевершували стрептоміцин, ефективність якого щодо *M. avium* виявилась низькою. Це додає аргументів до гіпотези про те, що новосинтезовані четвертинні солі можуть долати природні бар'єри проникності, властиві мікобактеріальній клітинній стінці, зокрема за

рахунок їх ліпофільної природи та позитивного заряду, що сприяє взаємодії з кислотостійким зовнішнім шаром [248].

У свою чергу, *M. avium* виявився найбільш резистентним серед досліджених штамів, зберігаючи високу життєздатність навіть при концентраціях К-I і К-II ($10 \times \text{МІК}$ щодо *M. smegmatis*). Це відповідає літературним даним, які вказують на здатність *M. avium* формувати щільні біоплівки, мати високу експресію насосів викиду та модифікації мішеней, що ускладнює дію більшості антибактеріальних засобів [249]. Незважаючи на це, сполуки Кс15 та Кс16 щодо *M. avium* забезпечували зниження життєздатності культури на 80 % у концентрації К-II, досягаючи повної загибелі на рівні концентрації К-III ($100 \times \text{МІК}$ щодо *M. smegmatis*). Окрему увагу заслуговує аналіз залежності активності від хімічної структури. Встановлено, що сполуки з об'ємними замісниками в третинному аміногруповому фрагменті, зокрема морфоліновим (Кс13), гексаметиленіміновим (Кр15, Кр18), мають вищу активність, імовірно завдяки здатності посилювати мембранотропну дію. Водночас, менш ефективними були сполуки із простими аліфатичними радикалами або помірною ліпофільністю, що підкреслює важливість SAR при подальшій оптимізації молекулярного дизайну [250].

Таким чином, антимікобактеріальна активність окремих арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей є обґрунтованою та свідчить про доцільність продовження їх дослідження. Особливо перспективними для подальшого доклінічного вивчення можна вважати Кс15, Кр18 і Кс12, які забезпечували значну редукцію колоній не тільки лабораторних, а й патогенних штамів, і демонстрували профіль активності, співставний із рифампіцином.

Механізми дії четвертинних амонієвих солей традиційно пов'язують з порушенням цілісності клітинних мембран, що особливо ефективно реалізується при взаємодії з грампозитивними збудниками [229]. Наявність у структурі досліджених сполук арилоксиетоксифрагментів, а також довгих гідрофобних замісників, ймовірно, посилює здатність до проникнення у фосфоліпідний бішар і сприяє дестабілізації клітинних структур [251]. Підтвердженням цьому є

виявлена висока активність сполук, що містять тетраметилбутильний або 2,4-дитретбутилфеноксигрупи. Подібна структура сприяє підвищеній ліпофільності, що, за сучасними даними, є критичним фактором для антимікробної дії таких речовин [252].

Натомість сполуки практично не виявляли активності щодо грамнегативних бактерій. Це очікуваний результат, який підтверджує наявність бар'єрної функції зовнішньої мембрани грамнегативних збудників, що ускладнює проникнення великих катіонних молекул [253]. Така селективність підкреслює доцільність спрямування подальших розробок саме на мікроорганізми грампозитивного спектра.

Дослідження протигрибкової активності продемонструвало високу ефективність досліджених четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо дріжджеподібних грибів роду *Candida*. Скринінг методом дифузії в агар засвідчив, що 44 із 52 досліджуваних сполук виявляли виражену протикандидозну активність. Результати, отримані методом серійних розведень у рідкому середовищі, підтвердили ці спостереження, продемонструвавши значення МІК на рівні 1-3 мкг/мл для найактивніших речовин. Зокрема, Кс15, Кс2, Кс16, Кс14, Кр4, Кр8 та Кр18 продемонстрували МІК, які були співставні або навіть нижчі, ніж граничні значення для флуконазолу, рекомендовані EUCAST [254].

Найбільш чутливими до досліджуваних речовин серед *Candida* non-*albicans* виявились штами *C. parapsilosis*, *C. kefir*, *C. utilis* та *C. tropicalis*, до яких значна частина сполук демонструвала значення МІК нижче 1 мкг/мл (Кс14, Кр8, Кр18 і Кр19), що свідчить про високий антимікотичний ефект. В свою чергу, *C. krusei* та *C. glabrata* виявили нижчу чутливість до більшості сполук, що відповідає їх природній стійкості до низки антимікотичних препаратів, включаючи азоли [255].

Аналіз клінічних ізолятів показав, що ефективність деяких речовин (наприклад, Кс2, Кс3, Кр8) була співставною або вищою за антисептичні препарати мірамістину та декаметоксину, особливо в концентраційному

діапазоні 1,95–3,9 мкг/мл. За ступенем активності низка сполук (Kc14, Kp18, Kp19) наближались до ефективності полієнових антибіотиків (амфотерицину В та ністатину) щодо *C. albicans* і деяких non-*albicans* штамів.

Особливу увагу заслуговують результати щодо *Candida auris*, оскільки цей вид є відомим мультирезистентним патогеном (в тому числі до полієнових антибіотиків) [256]. У дослідженні найвищу активність щодо *C. auris* продемонстрували Kc14, Kp18 та Kp19, які мали значення МІС₅₀ на рівні 1,95–3,9 мкг/мл. Зважаючи на високу частоту інвазивних кандидозів у клінічній практиці, ці сполуки становлять значний інтерес для розробки нових протигрибкових препаратів [257].

Отримані результати *time-kill* аналізу вказують на виражену концентраційно- та часозалежну фунгіцидну активність усіх досліджуваних четвертинних амонієвих солей арилоксиетокси діалкіл амонію. У більшості випадків за умов концентрацій, рівних або вищих за 1×МІК, досягалася повна елімінація життєздатних клітин *C. albicans* АТСС. Особливо помітними були сполуки Kp4, Kp8, Kp18 і Kp19, які продемонстрували стрімке та незворотне зниження життєздатності клітин уже при 1×МІК. Антифунгальний ефект пов'язаний уже з описаним механізмом порушення цілісності клітинної мембрани, що властиво більшості катіонних агентів. Це узгоджується з результатами досліджень, у яких продемонстровано, що четвертинні амонієві сполуки з гідрофобними радикалами здатні взаємодіяти з фосфоліпідними компонентами клітинної оболонки грибів, спричиняючи витік іонів, осмотичний дисбаланс і подальший лізис клітин [257].

Для концентрації 1/4×МІК у більшості випадків спостерігався транзиторний інгібуючий ефект із частковим пригніченням росту на ранніх часових точках (4–8 годин), після чого кількість життєздатних клітин поступово зростала. Така динаміка характерна для сублетальних концентрацій препаратів, які не досягають порогової критичної концентрації для перфорування клітинних структур [258]. Подібні ефекти зафіксовано і в дослідженнях дії флуконазолу, який зазвичай не викликає повної загибелі клітин *Candida*, а лише гальмує їхній

ріст, що підтверджується менш вираженим зниженням CFU (до 1,5–2 log) навіть після 24-годинного впливу [259].

Натомість класичні полієнові антибіотики, такі як амфотерицин В, викликають повну загибель клітин протягом перших кількох годин, що добре корелює з отриманими результатами для сполук Кс14, Кс15, Кс16, Кс22 та Кр4, які забезпечували повне пригнічення життєздатності вже на 2-й або 4-й годині експозиції при 1×МІК [240]. Подібна швидкість елімінації також була характерною для антисептиків на основі полігуанідів або хлоргексидину, що реалізують свій ефект через мембранотропний механізм [261].

Отримані результати свідчать про наявність вираженого РАФЕ для ряду арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей щодо кандид. Найбільш суттєвий РАФЕ (понад 4 години) спостерігався для сполук Кс14, Кс15, Кс22, КР4, КР18 та КР19 при 2×МІК і 60-хвилинному контакті, що свідчить про потенціал цих речовин для пролонгованої протигрибкової дії навіть після короткочасного впливу.

Подібна концентраційна та експозиційна залежність відповідає загальноприйнятим уявленням про механізм дії катіонних поверхнево-активних речовин навіть за короткого контакту. У дослідженні Jothi та ін. (2022) вивчалася протигрибкова ефективність четвертинної амонійної поверхнево-активної речовини цетилтриметиламоній хлориду (проти різних видів грибів роду *Candida*). Дослідження показало, що сполуки проявляють значну протигрибкову активність МІК в діапазоні від 2 до 8 мкг/мл. Кінетика часової загибелі показала, що для знищення 99,9% інокуляту у всіх досліджуваних штамів потрібно 2 години при 2×МІК. Протигрибкова дія сполук була пов'язана з порушенням клітинних і ядерних мембран, що спричиняло загибель клітини [262].

Істотною є різниця між сполуками з високим РАФЕ (наприклад, Кс15, КР18) і тими, що виявляли лише транзиторний або короткочасний ефект (Кс3, КР8). Це може бути пов'язано з відмінностями у структурі гідрофобних радикалів: наявність розгалужених або ароматичних замісників посилює ліпофільність, що сприяє більш глибокому проникненню через клітинну стінку і персистенції речовини у клітинній мембрані [263], [264].

Загалом, результати свідчать, що за умови достатньої концентрації (1-2×МІК) та тривалості контакту (≥ 60 хвилин), сполуки групи арилоксиетокси діалкіл амонію здатні забезпечити стійкий фунгіцидний ефект із суттєвим РАФЕ. Це робить їх перспективними для подальшої розробки антимікотичних засобів тривалої дії, особливо для клінічних ситуацій, де обмежена частота аплікацій є бажаною або необхідною.

Оцінка антимікотичних властивостей досліджуваних похідних арил-ациклічних аміноспиртів щодо пліснявих грибів засвідчила нижчу ефективність у порівнянні з дріжджеподібними грибами. У ході первинного скринінгу методом дифузії в агар підтверджено активність лише у 17 сполук.

Результати методу серійних розведень в рідкому середовищі RPMI-1640 підтвердили низьку чутливість *A. niger*. Лише окремі сполуки, зокрема Кр19, Кс14, Кр8, Кр16, продемонстрували значення МІК нижче 6 мкг/мл. При цьому Кр19, з МІК $3,12 \pm 0,62$ мкг/мл, показала найвищу ефективність серед усіх тестованих речовин.

З огляду на високий рівень резистентності *Aspergillus* spp. до багатьох класів протигрибкових препаратів та їхню клінічну значущість у пацієнтів із імуносупресією, навіть помірна активність досліджуваних сполук заслуговує на увагу. Особливо це стосується речовин, які проявили ефективність у низьких концентраціях, що потенційно може бути посилено при використанні в комбінаціях або при модифікації хімічної структури з метою покращення проникнення крізь клітинні стінки пліснявих грибів [265].

Скринінг антипротозойної активності 52 сполук арилоксиетокси діалкіл амонію щодо модельної системи амебоцитів методом дискодифузії виявив низку перспективних речовин з чітко вираженою дією. Діаметри зон інгібування бляшкоутворення понад 20 мм були зафіксовані для сполук Кс10, Кс11, Кс15, Кс19, що свідчить про ефективність речовин.

Особливістю структур Кс10 та Кс19 є поєднання гідрофобного 2,4-дітретбутилфеноксі або 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)феноксі фрагмента з катіонною аміногрупою (гексаметиленіміній або діметиламіно), що, можливо,

забезпечує ефективну взаємодію з клітинними мембранами найпростіших. Висока ліпофільність цих радикалів сприяє їх швидкому проникненню через зовнішні оболонки амебоцитів та ініціюванню цитолізу [266], [267].

Важливе значення має й наявність третинного або четвертинного атома азоту у складі бічного ланцюга: Кс15 та Кс11, які також потрапили до групи найактивніших, містять відповідно піролідиній та ізопропіламіно групи, що забезпечують стабільне утворення зон інгібування. Всі ці сполуки мають гнучкий двовуглецевий місток (пропанол-2), що може впливати на доступність катіонного центру для взаємодії з негативно зарядженими ділянками клітинної поверхні акантамеб [268], [269], [270].

Додаткове підтвердження ефективності отримано за допомогою методу серійних розведень у твердому середовищі, де Кс19 продемонструвала найнижче значення активної концентрації ($5,21 \pm 1,04$ мкг/мл). Високу активність також підтвердила Кс10 ($7,29 \pm 2,76$ мкг/мл). Сполуки Кс14, Кс22, Кр9 також формували зони пригнічення діаметром 19-20 мм, що дозволяє розглядати їх як потенційно активні. Для Кс14 характерна наявність 2,4-дітретбутилфеноксіетоксі фрагмента у поєднанні з N-бензил-діметиламіно залишком, що виявило себе ефективним і в попередніх тестах на грибкові патогени.

Водночас для 24 з 52 сполук жодної зони інгібування виявлено не було, що становить 46% від загальної кількості. Така відсутність активності, ймовірно, пов'язана з неефективною орієнтацією функціональних груп або надто високою полярністю молекул, що перешкоджає проникненню крізь оболонки протозойних клітин [271].

Таким чином, найперспективнішими сполуками є Кс10, Кс11, Кс15, Кс19. Отримані результати створюють основу для подальших досліджень з уточнення механізмів дії, визначення цільових структур в протозойних клітинах та вивчення активності в умовах *in vivo*.

Оцінка цитотоксичності є ключовим етапом у визначенні потенційної безпеки нових антимікробних агентів. У межах цього дослідження було

встановлено, що більшість сполук продемонстрували дозозалежну токсичність щодо культури клітин HEp-2, однак при концентраціях $\leq 7,81$ мкг/мл життєздатність клітин у переважній більшості зразків залишалась на рівні >80 %. Це свідчить про достатній рівень біосумісності в межах терапевтично релевантного дозування, що є важливою передумовою для подальшої доклінічної розробки [272].

У цьому контексті сполуки виявили себе найбільш сприятливо з огляду на поєднання високої антимікробної активності та помірної або низької токсичності. Зокрема, Кс15, Кс22 та Кр18 продемонстрували ефективність проти широкого спектра мікроорганізмів, включаючи *S. aureus*, *Ent. faecalis*, *C. albicans*, *M. smegmatis*, а також акантамеби. Водночас ці сполуки зберігали життєздатність клітин HEp-2 на рівні ≥ 80 % при концентраціях до 7,81 мкг/мл, що свідчить про сприятливий токсикологічний профіль.

Сполуки Кс10 і Кс14 виявили високу активність переважно щодо грибів роду *Candida*, включаючи мультирезистентні штами *C. auris*, а також модельну систему протозойної інфекції. Вони також продемонстрували добру цитобезпечність в аналогічному діапазоні концентрацій, що робить їх потенційно придатними для розробки фунгіцидних засобів.

Натомість окремі речовини, як-от Кс9, Кс23 та Кр19, хоча й демонстрували потужну антимікробну дію – зокрема, Кр19 була ефективна щодо бактерій (*S. aureus*, *Ent. faecalis*), грибів (*Candida spp.*) і найпростіших, – мали виражену токсичність вже на середніх концентраціях (15,63-31,25 мкг/мл). Наприклад, життєздатність клітин при 15,63 мкг/мл для Кр19 становила лише 48 %, що вимагає обережного підходу до подальших розробок та можливого структурного модифікування [273].

Аналіз структури-активності виявив, що присутність 2,4-дітретбутилфеноксигрупи або тетраметилбутильного фрагмента у поєднанні з бензильними або гетероциклічними радикалами (гексаметиленімін, піролідиній, морфолін тощо) позитивно корелює з біоцидною активністю та часто не супроводжується надмірною цитотоксичністю. Це дозволяє визначити такі

фрагменти як ключові фармакофори для створення наступних поколінь сполук [274-276].

Таким чином, за сукупністю результатів ефективності та безпеки, найперспективнішими сполуками залишаються Кс15, Кс22, Кр18, Кр10 та Кс14. Вони забезпечують швидку елімінацію збудників при низьких концентраціях, мають пролонгований РАЕ та сприятливий профіль безпечності щодо культури клітин. Зокрема:

- Кс15, Кс22 і Кр18 були активні щодо *S. aureus*, *Ent. faecalis*, *Candida spp.*, *Mycobacterium spp.* та амебоцитів;
- Кс10 і Кс14 демонстрували високу активність проти *Candida spp.* і найпростіших.

Ці результати створюють підґрунтя для подальших *in vivo* досліджень і розробки нових антимікробних препаратів із широким або специфічно фунгіцидним спектром дії.

Одержані результати доводять, що ефективність і безпечність досліджуваних сполук тісно пов'язана з їх хімічною структурою. Наявність катіонних центрів, гнучких ланцюгів та ліпофільних фрагментів забезпечує одночасно високу проникність через мікробні мембрани та прийнятну біосумісність. Це дозволяє обґрунтувати створення нових терапевтичних засобів для боротьби з інфекціями, спричиненими мультирезистентними патогенами.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та запропоновано нове вирішення актуального науково-практичного завдання щодо створення та комплексної оцінки антимікробного потенціалу новосинтезованих четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію. Проведено системне мікробіологічне та цитотоксикологічне дослідження, що охоплює оцінку антибактеріальної, протигрибкової, антимікобактеріальної та протиамебної активності сполук, вивчення залишкового антимікробного ефекту (РАЕ/РАФЕ) та аналіз їхньої біотоксичності щодо клітинних культур. Доведено перспективність розроблених сполук як потенційних антимікробних агентів широкого спектра дії.

1. При вивченні новосинтезованих сполук четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію, встановлено, що більшість з них щодо грампозитивних бактерій (*S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *Ent. faecalis* ATCC 29212), спороутворюючих бактерій (*B. subtilis* ATCC 6633), нетуберкульозних мікобактерій (*M. smegmatis*), а також клінічних ізолятів стафілококів та ентерококів. Для референтних штамів бактерій мінімальні інгібуючі концентрації найбільш активних сполук становили 1–4 мкг/мл для *S. aureus* і *S. epidermidis*, 2–4 мкг/мл для *Ent. faecalis* та 0,26–1,00 мкг/мл для *B. subtilis*. Протимікобактеріальна активність щодо *M. smegmatis* реєструвалася у межах 0,22–4,00 мкг/мл.

2. Визначено протистафілококову активність досліджуваних сполук щодо клінічних ізолятів *S. aureus* та *S. epidermidis*. Найнижчі значення МІК (0,12–4,00 мкг/мл) зафіксовано для 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-1-етокси-3-(N-бензил діетиламіно)-2-пропанол хлориду (Кс1), 1-(2,4-дитретбутилфенокси)-1-етокси-3-(N-бензил гексаметиленіміній)-2-пропанол хлориду (Кс22) та 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-1-етокси-3-(N-(4-Ф бензил)диметиламіно)-2-пропанол хлориду (Кр18). Активність сполук була вищою щодо метицилін-чутливих штамів (MSSA і MSSE) порівняно з

резистентними (MRSA і MRSE), для яких повне інгібування досягалося у концентраціях 7,81–15,63 мкг/мл.

3. Визначено протиентерококову активність четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо клінічних ізолятів *Ent. faecalis*. Найбільшу активність виявили 1-(2,4-дитретбутилфенокси)-1-етокси-3-(N-бензил гексаметиленімін)-2-пропанол хлорид (Кс22), 1-(2,4-дитретбутилфенокси)-1-етокси-3-(N-бензил N-метил циклогексаламіно)-2-пропанол хлорид (Кс23) та 1-(2,4-дитретбутил фенокси)-3-(N-(4-CH₃-бензил)піролідиній)-2-пропанол хлорид (Кр10), з ефективним інгібуванням 80–90% ізолятів при концентраціях 7,81–15,63 мкг/мл.

4. Вивчено протимікобактеріальну активність досліджуваних сполук щодо *M. terrae*, *M. B5* та *M. avium*. Найвищу ефективність проти *M. terrae* і *M. B5* продемонстрували 1-(2,4-дитретбутилфенокси)-1-етокси-3-(N-бензил піролідиній)-2-пропанол хлорид (Кс15) та 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-1-етокси-3-(N-(4-F бензил)диметиламіно)-2-пропанол хлорид (Кр18), тоді як відносно *M. avium* найбільш перспективним був 1-(2,4-дитретбутилфенокси)-1-етокси-3-(N-бензил циклогексаламіно)-2-пропанол хлорид (Кс16), забезпечуючи понад 90% пригнічення життєздатності при концентраціях К-III.

5. Встановлено, що більшість досліджених четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію проявляють виражену протигрибкову активність щодо референтного штаму *C. albicans* ATCC 10231. Активність сполук варіювала від дуже високої (МІК 1,36–4 мкг/мл для *C. albicans*) до помірної і низької (понад 20 мкг/мл) для окремих зразків. Найактивнішими були похідні, що містили ароматичні або гетероциклічні фрагменти у будові катіону: 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-1-етокси-3-(N-(4-метилбензил)диметиламіно)-2-пропанол хлорид (Кр19), 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси]-1-етокси-3-(N-(4-F-бензил)диметиламіно)-2-пропанол хлорид (Кр18) та інші. Щодо, *A. niger* антимікотична ефективність була нижчою, однак

окремі сполуки, як-от Кр19, демонстрували МІК 3,12 мкг/мл, що свідчить про їх перспективність у боротьбі з пліснявими грибами.

6. Вивчено чутливість референтних і клінічних штамів *Candida non-albicans* до досліджуваних сполук. Визначено, що більшість із протестованих похідних зберігали активність проти ізолятів *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* та особливо *C. auris*, який є одним із найбільш резистентних видів. Найкращі результати отримано для Кр18 і Кр19, де середні значення МІК для *C. auris* становили відповідно 3,51 та 4,29 мкг/мл. Сполука Кс14 також проявила високу активність із МІК₅₀ на рівні 1,95 мкг/мл. Показано, що окремі четвертинні солі арилоксиетокси діалкіл амонію перевершують або співставні за активністю з декаметоксином щодо *C. auris*, що свідчить про можливість подальшого розвитку цих сполук як бази для створення нових протигрибкових агентів проти мультирезистентних ізолятів.

7. Виявлено амебоцидну активність 52 четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо модельного штаму *Acanthamoeba* spp. методом дискодифузії. Показано, що 54% сполук формували зони інгібування бляшкоутворення діаметром понад 10 мм. Описано найбільшу активність для Кс10 (24,67±0,67 мм) і Кс11 (24,33±0,33 мм), а також помірний рівень для Кс15 і Кс19 (20,00±0,58 мм). Встановлено, що 46% досліджених речовин не проявляли інгібуючої дії в усіх повтореннях. За даними методу серійних розведень визначено, що мінімальні активні концентрації становили 5,21±1,04 мкг/мл для Кс19 та 7,29±2,76 мкг/мл для Кс10, у решти активних речовин – в межах 10,42-50 мкг/мл. Найбільш перспективними за сукупністю біоцидної активності та безпечності визнано сполуки Кс15, Кс22 та Кр18, які продемонстрували ефективність щодо всіх досліджених мікроорганізмів: бактерій (*S. aureus*, *Ent. faecalis*), грибів (*Candida* spp.), мікобактерій (*M. smegmatis*, *M. B5*) та аміб. Кс10 і Кс14 показали високу протигрибкову та антипротозойну активність із мінімальними проявами токсичності

8. Охарактеризовано кінетику антимікробної дії арилоксиетокси діалкіл амонієвих солей методом *time-kill* щодо референтних штамів *S. aureus*

ATCC 25923, *Ent. faecalis* ATCC 29213 та *C. albicans* ATCC 10231. Встановлено, що при концентрації $1 \times \text{МІК}$ повна елімінація популяцій бактерій досягалася у проміжку між 4-ю і 8-ю годинами інкубації з вихідних рівнів $9,43\text{--}9,76 \log_{10}(\text{CFU})/\text{мл}$, а для грибів з початкового рівня $7,60 \log_{10}(\text{CFU})/\text{мл}$ загибель фіксувалася в аналогічні строки. Зафіксовано, що при концентрації $2 \times \text{МІК}$ стерилізація культур відбувалася вже через 2 години експозиції. Визначено, що при концентрації $\frac{1}{4} \times \text{МІК}$ життєздатність клітин знижувалася на $1\text{--}3 \log_{10}$ порівняно з контролем, однак надалі спостерігалось відновлення росту упродовж 24-48 годин.

9. Профіль токсичності четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію визначено шляхом МТТ-аналізу на культурі клітин *HEp-2*. Встановлено, що більшість досліджуваних сполук спричиняли суттєве зниження життєздатності клітин у концентраційному діапазоні $500\text{--}125 \text{ мкг/мл}$ із рівнем життєздатності $3\text{--}24 \%$. Показано, що безпечний рівень життєздатності клітин ($\geq 70 \%$) досягався при концентраціях нижче $15,63 \text{ мкг/мл}$ для більшості речовин. Найвищу біосумісність продемонстрували Кс12, Кр10 і Кр4, де життєздатність клітин перевищувала 90% навіть у низьких концентраціях. Виявлено високий цитотоксичний потенціал сполук Кс9 та Кр19, які зберігали низьку життєздатність клітин навіть за мінімальних концентрацій. Зафіксовано стабільну дозозалежну динаміку цитотоксичності для сполук Кс1, Кс10, Кс14 і Кр16, що свідчить про передбачуваний токсикологічний профіль. Узагальнено, що більшість сполук мають прийнятну біосумісність при низьких концентраціях, що визначає їх потенціал для подальшої розробки як антимікробних агентів із контрольованим токсичним профілем.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3(9), 541-548. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.24>
2. Prestinaci, F., Pezzotti, P., & Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 109(7), 309-318. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>
3. Tacconelli, E., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
4. Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial resistance: Implications and costs. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3903-3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
5. Theuretzbacher, U., Outtersen, K., Engel, A., & Karlén, A. (2020). The global preclinical antibacterial pipeline. *Nature Reviews Microbiology*, 18(5), 275-285. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0288-0>
6. Årdal, C., et al. (2016). International cooperation to improve access to and sustain effectiveness of antimicrobials. *The Lancet*, 387(10015), 296-307. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00470-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00470-5)
7. Renwick, M. J., Brogan, D. M., & Mossialos, E. (2016). A systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 69(2), 73-88. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.98>
8. Короткий, Ю. В., Дудікова, Д. М., Вринчану, Н. О., & Смертенко, О. А. (2015). Синтез та антимікробна активність четвертинних солей 1-[4-(1-адамантил)-фенокси]-3-діалкіламіно-2-пропанолу [Synthesis and antimicrobial activity of quaternary salts of 1-[4-(1-adamantyl)-phenoxy]-3-dialkylamino-2-propanol]. *Медицина хімія [Medical Chemistry]*, 17(1). <https://doi.org/10.11603/1681-2557.2015.v17.i1.4063>

9. Liu, X., Jiang, Y., Chen, X., Li, J., Shi, D., & Xin, D. (2014). Drug resistance mechanisms of *Mycoplasma pneumoniae* to macrolide antibiotics. *BioMed Research International*, 2014, 320801. <https://doi.org/10.1155/2014/320801>
10. Дудікова, Д. М., Суворова, З. С., Недашківська, В. В., Шарова, А. О., Дронова, М. Л., & Вринчану, Н. О. (2017). Активність похідних амінопропанолу відносно біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* [Activity of aminopropanol derivatives against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms]. *Фармацевтичний журнал* [Pharmaceutical Journal], (1), 93-100.
11. Dronova, M. L. (2016). The therapeutic efficacy of 1-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]-3-(N-benzylhexametylenimino)-2-propanol chloride under in vivo models. *Pharmacology and Drug Toxicology*, 1(47), 60–65.
12. Belkhir, K., Lacroix, M., Jamshidian, M., Salmieri, S., Jegat, C., & Taha, M. (2017). Evaluation of antibacterial activity of branched quaternary ammonium grafted green polymers. *Food Packaging and Shelf Life*, 12, 28-41. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.02.005>
13. Jiao, Y., Niu, L., Ma, S., Li, J., Tay, F. R., & Chen, J. (2017). Quaternary ammonium-based biomedical materials: State-of-the-art, toxicological aspects and antimicrobial resistance. *Progress in Polymer Science*, 71, 53-90. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.03.001>
14. Wei, L., et al. (2018). Synthesis, characterization, and antifungal activity of pyridine-based triple quaternized chitosan derivatives. *Molecules*, 23(10), 2604. <https://doi.org/10.3390/molecules23102604>
15. Nadagouda, M. N., et al. (2022). Antimicrobial activity of quaternary ammonium salts: Structure-activity relationship. *Medicinal Chemistry Research*, 31(10), 1663-1678. <https://doi.org/10.1007/s00044-022-02924-9>
16. Grenier, M. C., et al. (2012). The antibacterial activity of 4,4'-bipyridinium amphiphiles with conventional, bicephalic and gemini architectures. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(12), 4055-4058. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.04.079>

17. Boumzour, W., El Youssfi, S., El Hammoumi, M. M., Maazouz, O., Nassri, A., & El Bachiri, A. (2025). Synthesis and therapeutic application of beta-amino alcohol derivatives. *Journal of Molecular Structure*, 1321, 140028. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2024.140028>
18. de Almeida, M. V., Le Hyaric, M., Amarante, G. W., Silva Lourenço, M. C., & Lima Brandão, M. L. (2007). Synthesis of amphiphilic galactopyranosyl diamines and amino alcohols as antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42(8), 1076-1083. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2007.01.009>
19. Manda, B., et al. (2017). Synthesis, antibacterial and antitubercular evaluation of cardanol and glycerol based β -amino alcohol derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 28(11), 2142-2150. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170178>
20. Korotkii, Y. V., Vrynchanu, N. A., Dronova, M. L., Suvorova, Z. S., & Smertenko, O. A. (2019). Synthesis, antibacterial and antifungal activity of 1-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy]-3-dialkylamino-2-propanol quaternary salts. *Farmatsevtichnyi zhurnal [Pharmaceutical Journal]*, (1), 56-62. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.1.15.04>
21. Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1, 134. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
22. Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
23. Murray, C. J. L., et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
24. Marot, S., Calvez, V., Louet, M., Marcelin, A.-G., & Burrel, S. (2021). Interpretation of SARS-CoV-2 replication according to RT-PCR crossing threshold value. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(7), 1056-1057. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.01.017>

25. Rawson, T. M., et al. (2020). Bacterial and fungal coinfection in individuals with coronavirus: A rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. *Clinical Infectious Diseases*, 71(9), 2459-2468. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa530>
26. Knight, G. M., et al. (2021). Antimicrobial resistance and COVID-19: Intersections and implications. *eLife*, 10, e64139. <https://doi.org/10.7554/eLife.64139>
27. World Health Organization. (2024). WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. WHO.
28. Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *BioMed Research International*, 2016, 2475067. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>
29. Pendleton, J. N., Gorman, S. P., & Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(3), 297-308. <https://doi.org/10.1586/eri.13.12>
30. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. U.S. Department of Health and Human Services. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
31. Lobanovska, M., & Pilla, G. (2017). Penicillin's discovery and antibiotic resistance: Lessons for the future? *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(2), 237-241.
32. Hawkey, P. M., & Jones, A. M. (2009). The changing epidemiology of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(Suppl_1), i3-i10. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp256>
33. Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 146(3713), 837. <https://doi.org/10.1038/146837a0>
34. Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., & Grossart, H.-P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*, 4, 47. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047>

35. Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00020-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
36. Lee, A. S., et al. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 18033. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
37. Chambers, H. F., & DeLeo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629-641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
38. David, M. Z., & Daum, R. S. (2010). Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(3), 616-687. <https://doi.org/10.1128/CMR.00081-09>
39. Cassini, A., et al. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: A population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), 56-66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)
40. Schouls, L. M., et al. (2023). Molecular characterization of MRSA collected during national surveillance between 2008 and 2019 in the Netherlands. *Communications Medicine*, 3(1), 123. <https://doi.org/10.1038/s43856-023-00348-z>
41. Locke, T. E., et al. (2025). Prevalence and risk factors for *Staphylococcus aureus* colonisation among healthy individuals in low- and middle-income countries: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection*, 90(4), 106462. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2025.106462>
42. McGuinness, W. A., Malachowa, N., & DeLeo, F. R. (2017). Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 90(2), 269-281.
43. Hiramatsu, K., et al. (2014). Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(4), 213-224. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2014.04.006>

44. Arias, C. A., & Murray, B. E. (2012). The rise of the Enterococcus: Beyond vancomycin resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4), 266-278. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2761>
45. Weiner-Lastinger, L. M., et al. (2020). Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015-2017. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 41(1), 1-18. <https://doi.org/10.1017/ice.2019.296>
46. Crank, C., & O'Driscoll, T. (2015). Vancomycin-resistant enterococcal infections: Epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infection and Drug Resistance*, 8, 217-230. <https://doi.org/10.2147/IDR.S54125>
47. O'Toole, R. F., Leong, K. W. C., Cumming, V., & Van Hal, S. J. (2023). Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and the emergence of new sequence types associated with hospital infection. *Research in Microbiology*, 174(4), 104046. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104046>
48. Davis, E., et al. (2020). Epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* colonization in nursing facilities. *Open Forum Infectious Diseases*, 7(1), ofz553. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz553>
49. Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis part 1: Causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277-283.
50. Rolain, J. M., Abat, C., Jimeno, M. T., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2016). Do we need new antibiotics? *Clinical Microbiology and Infection*, 22(5), 408-415. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.03.012>
51. Abraham, E. P., & Newton, G. G. F. (1961). The structure of cephalosporin C. *Biochemical Journal*, 79(2), 377-393. <https://doi.org/10.1042/bj0790377>
52. Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(8), a025247. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>

53. European Centre for Disease Prevention and Control. (2023). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023. ECDC. <https://doi.org/10.2900/63495>
54. Gebremeskel, L., Teklu, T., Kasahun, G. G., & Tuem, K. B. (2023). Antimicrobial resistance pattern of Klebsiella isolated from various clinical samples in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. BMC Infectious Diseases, 23(1), 693. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08633-x>
55. Ali, I., Rafaque, Z., Ahmed, S., Malik, S., & Dasti, J. I. (2016). Prevalence of multi-drug resistant uropathogenic Escherichia coli in Potohar region of Pakistan. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 6(1), 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.09.022>
56. Kumarasamy, K. K., et al. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study. The Lancet Infectious Diseases, 10(9), 597-602. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70143-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2)
57. Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -lactamases. Clinical Microbiology Reviews, 22(1), 161-182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>
58. Codjoe, F. S., & Donkor, E. S. (2017). Carbapenem resistance: A review. Medical Sciences, 6(1), 1. <https://doi.org/10.3390/medsci6010001>
59. Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. U.S. Department of Health and Human Services. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>
60. Centers for Disease Control and Prevention. (2022). COVID-19: U.S. impact on antimicrobial resistance, special report 2022. U.S. Department of Health and Human Services. <https://doi.org/10.15620/cdc:117915>
61. European Centre for Disease Prevention and Control. (2025). Carbapenem-resistant Enterobacterales - third update, 3 February 2025. ECDC. <https://doi.org/10.2900/875261>

62. European Centre for Disease Prevention and Control. (2024, November). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) EU targets on antimicrobial resistance. ECDC Atlas. <https://atlas.ecdc.europa.eu/>
63. Lee, Y.-L., Ko, W.-C., & Hsueh, P.-R. (2022). Geographic patterns of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Asia-Pacific region: Results from the Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) program, 2015-2019. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(2), e02000-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.02000-21>
64. Hsu, L. Y., Apisarnthanarak, A., Khan, E., Suwantararat, N., Ghafur, A., & Tambyah, P. A. (2017). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and Enterobacteriaceae in South and Southeast Asia. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1), 1-22. <https://doi.org/10.1128/CMR.00042-16>
65. World Health Organization. (2024). Global tuberculosis report 2024. WHO.
66. Verma, A. K., & Kalra, O. P. (2012). Discovery of new drugs against tuberculosis: History guides. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 7(3), 111-114. <https://doi.org/10.5812/archcid.15088>
67. Grobbelaar, M., Louw, G. E., Sampson, S. L., van Helden, P. D., Donald, P. R., & Warren, R. M. (2019). Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 74, 103937. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103937>
68. Nowinski, A., et al. (2025). The impact of the war in Ukraine on the prevalence of MDR/RR-TB in Poland. *IJTL D Open*, 2(1), 6-12. <https://doi.org/10.5588/ijtlldopen.24.0357>
69. Schildknecht, K. R., Pratt, R. H., Feng, P.-J. I., Price, S. F., & Self, J. L. (2023). Tuberculosis - United States, 2022. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 72(12), 297-303. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7212a1>
70. van Rhijn, N., et al. (2024). Beyond bacteria: The growing threat of antifungal resistance. *The Lancet*, 404(10457), 1017-1018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01827-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01827-0)

71. Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases-Estimate precision. *Journal of Fungi*, 3(4), 57. <https://doi.org/10.3390/jof3040057>
72. Perfect, J. R. (2017). The antifungal pipeline: A reality check. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(9), 603-616. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.46>
73. Pfaller, M. A., & Diekema, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: A persistent public health problem. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(1), 133-163. <https://doi.org/10.1128/CMR.00029-06>
74. Odds, F. C., Brown, A. J. P., & Gow, N. A. R. (2003). Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, 11(6), 272-279. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00117-3](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00117-3)
75. Dai, Z., et al. (2025). Nineteen years retrospective analysis of epidemiology, antifungal resistance and a nomogram model for 30-day mortality in nosocomial candidemia patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 15, 1504866. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1504866>
76. Arendrup, M. C., et al. (2023). European candidaemia is characterised by notable differential epidemiology and susceptibility pattern: Results from the ECMM Candida III study. *Journal of Infection*, 87(5), 428-437. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.08.001>
77. Rosa, R., et al. (2025). Changing trends in the sources and volumes of clinical cultures with *Candida auris* at an integrated health system in Miami, Florida, United States, 2019-2023. *American Journal of Infection Control*, Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2025.03.013>
78. Pappas, P. G., et al. (2016). Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 62(4), e1-e50. <https://doi.org/10.1093/cid/civ933>
79. Lyman, M., et al. (2023). Worsening spread of *Candida auris* in the United States, 2019 to 2021. *Annals of Internal Medicine*, 176(4), 489-495. <https://doi.org/10.7326/M22-3469>

80. White, N. J. (2004). Antimalarial drug resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 113(8), 1084-1092. <https://doi.org/10.1172/JCI21682>
81. Tu, Y. (2011). The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. *Nature Medicine*, 17(10), 1217-1220. <https://doi.org/10.1038/nm.2471>
82. Dondorp, A. M., et al. (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *New England Journal of Medicine*, 361(5), 455-467. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0808859>
83. Gulliver, E. L., et al. (2023). Extensive genome analysis identifies novel plasmid families in *Clostridium perfringens*. *Microbial Genomics*, 9(4), mgen000995. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000995>
84. Wu, Z., & Zhang, X. (2025). Emergence of antibiotic-resistant pathogens in ancient deep-sea sediments predates anthropogenic antibiotic use. *Environment International*, 199, 109488. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2025.109488>
85. Skandalis, N., et al. (2021). Environmental spread of antibiotic resistance. *Antibiotics*, 10(6), 640. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060640>
86. Memar, M. Y., et al. (2020). The central role of the SOS DNA repair system in antibiotics resistance: A new target for a new infectious treatment strategy. *Life Sciences*, 262, 118562. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118562>
87. Oliver, A., Baquero, F., & Blázquez, J. (2002). The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: Molecular characterization of naturally occurring mutants. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1641-1650. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02855.x>
88. Baillie, E. J., Merlo, G., Van Driel, M. L., Magin, P. J., & Hall, L. (2024). Early-career general practitioners' antibiotic prescribing for acute infections: A systematic review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 79(3), 512-525. <https://doi.org/10.1093/jac/dkae002>
89. Liu, Y., Blanco-Toral, C., & Larrouy-Maumus, G. (2025). The role of cyclic nucleotides in bacterial antimicrobial resistance and tolerance. *Trends in Microbiology*, 33(2), 164-183. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2024.08.006>

90. Amel, R., et al. (2024). Molecular mechanisms impact on fluoroquinolone resistance among *E.coli* from enteric carriage monitoring before prostate biopsy and earliest description of qnrB81. *Scientific Reports*, 14(1), 29324. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77844-2>
91. Patel, Y., Soni, V., Rhee, K. Y., & Helmann, J. D. (2023). Mutations in *rpoB* that confer rifampicin resistance can alter levels of peptidoglycan precursors and affect β -lactam susceptibility. *mBio*, 14(2), e03168-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.03168-22>
92. Zhu, S., Hong, J., & Wang, T. (2024). Horizontal gene transfer is predicted to overcome the diversity limit of competing microbial species. *Nature Communications*, 15(1), 800. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45154-w>
93. Rana, C., et al. (2024). Antimicrobial resistance genes and associated mobile genetic elements in *Escherichia coli* from human, animal and environment. *Chemosphere*, 369, 143808. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143808>
94. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
95. Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., & Claverys, J.-P. (2014). Bacterial transformation: Distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology*, 12(3), 181-196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>
96. Gurney, J., et al. (2020). Phage steering of antibiotic-resistance evolution in the bacterial pathogen, *Pseudomonas aeruginosa*. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2020(1), 148-157. <https://doi.org/10.1093/emph/eaaa026>
97. Pfeifer, E., Bonnin, R. A., & Rocha, E. P. C. (2022). Phage-plasmids spread antibiotic resistance genes through infection and lysogenic conversion. *mBio*, 13(5), e01851-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.01851-22>
98. Iredell, J., Brown, J., & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae*: Mechanisms and clinical implications. *BMJ*, 352, h6420. <https://doi.org/10.1136/bmj.h6420>

99. Darby, E. M., et al. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 280-295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
100. Soto, S. M. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4(3), 223-229. <https://doi.org/10.4161/viru.23724>
101. Loots, D. T. (2016). New insights into the survival mechanisms of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(3), 655-660. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv406>
102. Floss, H. G., & Yu, T.-W. (2005). Rifamycin: Mode of action, resistance, and biosynthesis. *Chemical Reviews*, 105(2), 621-632. <https://doi.org/10.1021/cr030112j>
103. Krawczyk, S. J., Leśniczak-Staszak, M., Gowin, E., & Szaflarski, W. (2024). Mechanistic insights into clinically relevant ribosome-targeting antibiotics. *Biomolecules*, 14(10), 1263. <https://doi.org/10.3390/biom14101263>
104. Yang, W., & Hu, F. (2022). Research updates of plasmid-mediated aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferase. *Antibiotics*, 11(7), 906. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070906>
105. Ero, R., Yan, X.-F., & Gao, Y.-G. (2021). Ribosome protection proteins- 'New' players in the global arms race with antibiotic-resistant pathogens. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 5356. <https://doi.org/10.3390/ijms22105356>
106. Peacock, S. J., & Paterson, G. K. (2015). Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 577-601. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034516>
107. Shalaby, M. A. W., Dokla, E. M. E., Serya, R. A. T., & Abouzid, K. A. M. (2020). Penicillin binding protein 2a: An overview and a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 199, 112312. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112312>

108. Lebreton, F., & Cattoir, V. (2019). Resistance to glycopeptide antibiotics. In *Bacterial resistance to antibiotics - From molecules to man* (pp. 51-80). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119593522.ch3>
109. Howden, B. P., Davies, J. K., Johnson, P. D. R., Stinear, T. P., & Grayson, M. L. (2010). Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 99-139. <https://doi.org/10.1128/CMR.00042-09>
110. Yushchuk, O., Binda, E., & Marinelli, F. (2020). Glycopeptide antibiotic resistance genes: Distribution and function in the producer actinomycetes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01173>
111. Arthur, M., Depardieu, F., Molinas, C., Reynolds, P., & Courvalin, P. (1995). The *vanZ* gene of Tn1546 from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene*, 154(1), 87-92. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)00851-I](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)00851-I)
112. Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*, 8(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>
113. Bevan, E. R., Jones, A. M., & Hawkey, P. M. (2017). Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: Temporal and geographical shifts in genotype. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(8), 2145-2155. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx146>
114. Yao, Y., et al. (2024). Plasmid-mediated spread of carbapenem resistance in Enterobacterales: A three-year genome-based survey. *Antibiotics*, 13(8), 682. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13080682>
115. Balaban, N. Q., et al. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology*, 17(7), 441-448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>
116. Sun, D., Sun, X., Hu, Y., & Yamaichi, Y. (2023). Editorial: Horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance, volume II. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1221606. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1221606>

117. Solanki, S., & Das, H. K. (2024). Antimicrobial resistance: Molecular drivers and underlying mechanisms. *Journal of Medicine, Surgery, and Public Health*, 3, 100122. <https://doi.org/10.1016/j.glmedi.2024.100122>
118. Holmes, A. H., et al. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387(10014), 176-187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
119. Smith, R., & Coast, J. (2013). The true cost of antimicrobial resistance. *BMJ*, 346, f1493. <https://doi.org/10.1136/bmj.f1493>
120. Singer, A. C., Kirchhelle, C., & Roberts, A. P. (2020). (Inter)nationalising the antibiotic research and development pipeline. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(2), e54-e62. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30552-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30552-3)
121. Gawand, D. K. S., et al. (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. *Microbe Magazine*, 10(9), 354-355. <https://doi.org/10.1128/microbe.10.354.1>
122. Hsu, L. Y., Legido-Quigley, H., & Chua, A. Q. (2025). High-level political commitment to action against AMR: What is next? *BMJ Global Health*, 10(1), e002351. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2024-002351>
123. Zhazykhubayeva, D., Bayesheva, D., Kosherova, Z., & Semenova, Y. (2024). Antimicrobial resistance surveillance in post-soviet countries: A systematic review. *Antibiotics*, 13(12), 1129. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13121129>
124. Symochko, L., Pereira, P., Demyanyuk, O., Pinheiro, M. N. C., & Barcelo, D. (2024). Resistome in a changing environment: Hotspots and vectors of spreading with a focus on the Russian-Ukrainian War. *Heliyon*, 10(12), e32716. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32716>
125. Ho, C. S., et al. (2025). Antimicrobial resistance: A concise update. *The Lancet Microbe*, 6(1), e64-e74. <https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.07.010>
126. Lederberg, J. (2000). Infectious history. *Science*, 288(5464), 287-293. <https://doi.org/10.1126/science.288.5464.287>
127. Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial resistance: Implications and costs. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3903-3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>

128. Pulingam, T., et al. (2022). Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 170, 106103. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.106103>
129. Theuretzbacher, U., Outtersson, K., Engel, A., & Karlén, A. (2020). The global preclinical antibacterial pipeline. *Nature Reviews Microbiology*, 18(5), 275-285. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0288-0>
130. Ali, A. S. M., & Anderson, C. S. (2024). Gepotidacin, a new first-in-class antibiotic for treating uncomplicated urinary tract infection. *The Lancet*, 403(10428), 702-703. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02697-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02697-1)
131. Jangra, M., et al. (2025). A broad-spectrum lasso peptide antibiotic targeting the bacterial ribosome. *Nature*, 640(8060), 1022-1030. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-08723-7>
132. Brodiazhenko, T., et al. (2022). Synthetic oxepanoprolinamide iboxamycin is active against *Listeria monocytogenes* despite the intrinsic resistance mediated by VgaL/Lmo0919 ABCF ATPase. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 4(3), dlac061. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlac061>
133. Zampaloni, C., et al. (2024). A novel antibiotic class targeting the lipopolysaccharide transporter. *Nature*, 625(7995), 566-571. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06873-0>
134. Huseby, D. L., et al. (2024). Antibiotic class with potent in vivo activity targeting lipopolysaccharide synthesis in Gram-negative bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 121(15), e2317274121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2317274121>
135. Hata, D. J., Humphries, R., & Lockhart, S. R. (2020). An emerging yeast pathogen posing distinct challenges for laboratory diagnostics, treatment, and infection prevention. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 144(1), 107-114. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0508-RA>

136. de Almeida, A. M., et al. (2013). Synthesis and antimicrobial activity of novel amphiphilic aromatic amino alcohols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(10), 2883-2887. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.03.078>

137. Ferreira, B. D. S., et al. (2014). Synthesis and biological evaluation of a new series of N-acyldiamines as potential antibacterial and antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(19), 4626-4629. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.08.047>

138. De Souza Fernandes, F., et al. (2016). Synthesis and evaluation of antibacterial and antitumor activities of new galactopyranosylated amino alcohols. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 108, 203-210. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.11.037>

139. Kondoh, O., et al. (2005). Piperazine propanol derivative as a novel antifungal targeting 1,3- β -D-glucan synthase. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(11), 2138-2141. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.2138>

140. Suvorova, Z. (2017). The therapeutic efficacy of 1-[4-(1,1,3,3-tetramethyl butyl) phenoxy]-3-(n-benzyl hexametylenimino)-2-propanol chloride in vivo. *ScienceRise: Biological Science*, 0(4), 37-39. <https://doi.org/10.15587/2519-8025.2017.109317>

141. Дронова, М. Л., Коробкова, К. С., Вринчану, Н. О., & Токовенко, І. П. (2013). Чутливість мікоплазм до похідних арилаліфатичних аміноспиртів [Sensitivity of mycoplasmas to derivatives of aryl-aliphatic amino alcohols]. *Фармакологія та лікарська токсикологія [Pharmacology and Drug Toxicology]*, 4-5(35), 48-52.

142. Короткий, Ю. В., Смертенко, О. А. (2013). Пат. № 86109. Четвертинні солі 1-[4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-алкілдіалкіламіно)-2-пропанолу. МКП C07D 213/00. № u201308693; заявл. 10.07.2013; опубл. 10.12.2013, Бюл. № 23.

143. Короткий, Ю. В., Смертенко, О. А. (2014). Пат. № 93482. Четвертинні солі 1-[(2,4-дитретбутил)фенокси-1-етокси]-3-(N-алкілдіалкіламонію)-2-

пропанолу. МКП С07D 213/00. № u201400149; заявл. 10.01.2014; опубл. 10.10.2014, Бюл. № 19.

144. Shah, R. V., et al. (2023). Population pharmacokinetic study of benzylpenicillin in critically unwell adults. *Antibiotics*, 12(4), 643. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040643>

145. Herrera-Hidalgo, L., et al. (2020). Ampicillin and ceftriaxone solution stability at different temperatures in outpatient parenteral antimicrobial therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(7), e00309-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00309-20>

146. Bryson, A. L., Bhalodi, A., Liesman, R. M., & Mathers, A. J. (2024). Cefazolin as a predictor of urinary cephalosporin activity in indicated Enterobacterales. *Journal of Clinical Microbiology*, 62(4), e0078821. <https://doi.org/10.1128/jcm.00788-21>

147. Rybak, M. J., et al. (2020). Therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: A revised consensus guideline and review by the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 77(11), 835-864. <https://doi.org/10.1093/ajhp/zxaa036>

148. Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232-260. <https://doi.org/10.1128/mnbr.65.2.232-260.2001>

149. Tkachova, O. V., Iakovlieva, L. V., & Sheptak, T. I. (2020). Pharmacoeconomic analysis by the cost-minimization method of fluconazole drugs recommended for use in candidiosis. *Farmatsevychnyi zhurnal [Pharmaceutical Journal]*, (3), 59-68. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.3.20.06>

150. Sousa, F., Nascimento, C., Ferreira, D., Reis, S., & Costa, P. (2023). Reviving the interest in the versatile drug nystatin: A multitude of strategies to increase

its potential as an effective and safe antifungal agent. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 200, 114969. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114969>

151. Koryabina, K. S., Sergeeva, M. V., Komissarov, A. B., Eshchenko, N. V., & Stepanov, G. A. (2021). Amphotericin B effect on the sensitivity to influenza infection of WI-38 VA-13 cells with IFITM3 gene knockout. *Medicinskij Akademiceskij Zurnal*, 21(3), 109-112. <https://doi.org/10.17816/MAJ76106>

152. Honchar, O. O., Nazarchuk, O. A., Paliy, D. V., Kovalenko, I. V., & Burkot, V. M. (2015). Antimicrobial qualities of generics of Decamethoxin®. *Medical and Clinical Chemistry*, 17(4), 93-97. <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681x.2015.v17.i4.5683>

153. Osmanov, A., Farooq, Z., Richardson, M. D., & Denning, D. W. (2020). The antiseptic Miramistin: A review of its comparative in vitro and clinical activity. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(4), 423-440. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa012>

154. Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 165. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>

155. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2023). Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST (Version 13.1). EUCAST.

156. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

157. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2023). EUCAST definitive document E.Def 7.4 Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts (Version 1.0). EUCAST.

158. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2024). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (Version 14.0). EUCAST.

159. Skov, R., et al. (2020). EUCAST disc diffusion criteria for the detection of mecA-mediated β -lactam resistance in *Staphylococcus pseudintermedius*: Oxacillin versus cefoxitin. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(1), 122.e1-122.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.05.002>
160. Ferro, B. E., Van Ingen, J., Wattenberg, M., Van Soolingen, D., & Mouton, J. W. (2015). Time-kill kinetics of antibiotics active against rapidly growing mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(3), 811-817. <https://doi.org/10.1093/jac/dku431>
161. Datta, A. (2021). Determination of viable microbial count present in tap water. *International Journal of Innovative Science and Research Technology*, 6(4). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27683.05924>
162. Belley, A., Neesham-Grenon, E., Arhin, F. F., McKay, G. A., Parr Jr., T. R., & Moeck, G. (2008). Assessment by time-kill methodology of the synergistic effects of oritavancin in combination with other antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(10), 3820-3822. <https://doi.org/10.1128/AAC.00361-08>
163. Singh, S. R., Bacon, A. E., Young, D. C., & Couch, K. A. (2009). In vitro 24-hour time-kill studies of vancomycin and linezolid in combination versus methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), 4495-4497. <https://doi.org/10.1128/AAC.00237-09>
164. Foerster, S., Unemo, M., Hathaway, L. J., Low, N., & Althaus, C. L. (2016). Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC Microbiology*, 16(1), 217. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0838-9>
165. Ferro, B. E., Van Ingen, J., Wattenberg, M., Van Soolingen, D., & Mouton, J. W. (2015). Time-kill kinetics of antibiotics active against rapidly growing mycobacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(3), 811-817. <https://doi.org/10.1093/jac/dku431>
166. Alshareef, F., & Review, B. (2021). Protocol to evaluate antibacterial activity MIC, FIC and time kill method. [Source information needed]

167. Stubbings, W. J., Bostock, J. M., Ingham, E., & Chopra, I. (2004). Assessment of a microplate method for determining the post-antibiotic effect in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(1), 139-143. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh275>
168. Uchejeso, O. M. (2020). Time kill kinetics study of commonly used disinfectants against *Pseudomonas aeruginosa* in Federal Medical Centre, Umuahia-Nigeria. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 7(3), 262-268. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2020.07.001155>
169. Appiah, T., Boakye, Y. D., & Agyare, C. (2017). Antimicrobial activities and time-kill kinetics of extracts of selected Ghanaian mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 4534350. <https://doi.org/10.1155/2017/4534350>
170. Peck, K. R., et al. (2012). In vitro time-kill studies of antimicrobial agents against blood isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, including colistin- or tigecycline-resistant isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 61(Pt_3), 353-360. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.036939-0>
171. Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
172. Amman, V., Basri, D. F., & Huyop, F. (2011). Determination of the post-antibiotic effect (PAE) of combinations of extracts from galls of *Quercus infectoria* with vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *African Journal of Biotechnology*, 10(79), 18274-18278. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1611>
173. Yoo, M. S., & Lee, S. Y. (2020). Post-antibiotic effects and post-antibiotic sub-minimal inhibitory concentration effects of chlorhexidine against oral bacteria. *Oral Biology Research*, 44(1), 8-13. <https://doi.org/10.21851/obr.44.01.202003.8>
174. Wang, L., & Zhang, Y. (2009). Postantibiotic effects and postantibiotic sub-MIC effects of tilmicosin, erythromycin and tiamulin on erythromycin-resistant *Streptococcus suis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(4), 980-987.

175. Shyrobokov, V., Poniatskyi, V., Chobotar, A., & Sałamatin, R. (2020a). Applying of bacteria *Cellulosimicrobium* sp. for cultivation protozoa of genus *Acanthamoeba*. *Annals of Parasitology*, 66(1), 37-42. <https://doi.org/10.17420/ap6601.238>
176. Shyrobokov, V., Poniatskyi, V., Chobotar, A., & Sałamatin, R. (2020b). Morphological, physiological and genetic characteristics of protozoa of genus *Acanthamoeba*, isolated from different deposit of bentonite in Ukraine. *Annals of Parasitology*, 66(1), 43-50. <https://doi.org/10.17420/ap6601.239>
177. Shyrobokov, V., Poniatskyi, V., Poniatska, V., Romanchyshyna, A., & Sałamatin, R. (2024). Determination of the anti-protozoal activity of medicinal agents using the phenomenon of plaque formation by *Acanthamoeba* spp. *Annals of Parasitology*, 70(1), 15-22. <https://doi.org/10.17420/ap7001.522>
178. Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), pdb.prot095505. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
179. Thusyanthan, J., et al. (2022). Cytotoxicity against human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells and anti-oxidant activity of selected endemic or medicinal plants in Sri Lanka. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2022, 6407688. <https://doi.org/10.1155/2022/6407688>
180. Stern, S. T., Adiseshaiah, P. P., Timothy, M., & Potter, B. S. (2024). NCL method GTA-2 Hep G2 hepatocarcinoma cytotoxicity assay. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2746, pp. 215-224). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3578-0_13 [Note: Verify vol/pp if possible]
181. Mahmood, M. A., Abd, A. H., & Kadhim, E. J. (2023). Assessing the cytotoxicity of phenolic and terpene fractions extracted from Iraqi *Prunus arabica* on AMJ13 and SK-GT-4 human cancer cell lines. *F1000Research*, 12, 433. <https://doi.org/10.12688/f1000research.131336.1>
182. Rai, Y., et al. (2018). Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation

induced growth inhibition. *Scientific Reports*, 8(1), 1539.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>

183. Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12827.
<https://doi.org/10.3390/ijms222312827>

184. Jo, H. Y., et al. (2015). The unreliability of MTT assay in the cytotoxic test of primary cultured glioblastoma cells. *Experimental Neurobiology*, 24(3), 235-245. <https://doi.org/10.5607/en.2015.24.3.235>

185. Tsekhmister, Y. (2018). [Title and source information missing]. ResearchGate. <https://www.researchgate.net/publication/326271449> [Note: Needs title and context]

186. Ajulo, S., & Awosile, B. (2024). Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS 2022): Investigating the relationship between antimicrobial resistance and antimicrobial consumption data across the participating countries. *PLoS One*, 19(2), e0297921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297921>

187. Murray, C. J. L., et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

188. O'Neill, J. (2016) Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. Review on Antimicrobial Resistance. Wellcome Trust and HM Government. https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf

189. European Centre for Disease Prevention and Control & World Health Organization Regional Office for Europe. (2022). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 - 2020 data. ECDC/WHO. <https://doi.org/10.2900/112339>

190. Flynn, C. E., & Guarner, J. (2023). Emerging antimicrobial resistance. *Modern Pathology*, 36(9), 100249. <https://doi.org/10.1016/j.modpat.2023.100249>

191. Gilbert, P., & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 703-715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>
192. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2021). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (31st ed.). CLSI document M100.
193. Luo, Y., Yang, Q., Zhang, D., & Yan, W. (2021). Mechanisms and control strategies of antibiotic resistance in pathological biofilms. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(1), 1-10. <https://doi.org/10.4014/jmb.2010.10021>
194. Shields, R. K., et al. (2017). Ceftazidime-avibactam is superior to other treatment regimens against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(8), e00882-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00882-17>
195. Marciniak, K., Tyczewska, A., & Grzywacz, K. (2024). Genetics of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Biotechnology & Applied Biochemistry*, Advance online publication. <https://doi.org/10.5114/bta.2024.139756>
196. Fergestad, M. E., Stamsås, G. A., Morales Angeles, D., Salehian, Z., Wasteson, Y., & Kjos, M. (2020). Penicillin-binding protein PBP2a provides variable levels of protection toward different β -lactams in *Staphylococcus aureus* RN4220. *MicrobiologyOpen*, 9(8), e1057. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1057>
197. Britsun, V. M., Simurova, N. V., Popova, I. V., & Simurov, O. V. (2021). Modern chemical disinfectants and antiseptics. Part II. *Journal of Organic and Pharmaceutical Chemistry*, 19(4), 20-32. <https://doi.org/10.24959/ophcj.21.231998>
198. Griffith, D. E., et al. (2006). Clinical and molecular analysis of macrolide resistance in *Mycobacterium avium* complex lung disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 174(8), 928-934. <https://doi.org/10.1164/rccm.200603-450OC>
199. Ryu, Y. J., Koh, W. J., & Daley, C. L. (2016). Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial lung disease: Clinicians' perspectives. *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 79(2), 74-84. <https://doi.org/10.4046/trd.2016.79.2.74>

200. Nastenکو V.B., Osypchuk N.O. (2018). Features of detection of MRSA strains among clinical isolates. In III International Scientific Conference: Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century (April 18, 2018, Kyiv) (p. 75-76).

201. Nastenکو, V. (2024). Antimicrobial properties of newly synthesised aryl acyclic amino alcohols against clinical strains of enterococci. *ScienceRise: Biological Science*, 4 (41), 11-18. <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2024.325076>

202. Nastenکو, V. (2025). Antimycobacterial activity of new aryloxyethoxy-dialkylaminopropanol derivatives against reference strains of nontuberculous mycobacteria. *ScienceRise: Biological Science*, 1 (42), 12–17. <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2025.326435>

203. Nastenکو, V. B., Voloshchuk, O. M., Korotkiy, J. V., Smertenko, A. A., Chuyko, A. L., & Shyrobokov, V. P. (2015). Peculiarities of antimicrobial action of synthetic aromatic alcohols. In X International Summer School-Conference “Molecular microbiology and biotechnology” (p. 146). Odesa.

204. Настенко В.Б. (2017). Скринінг похідних арил ациклічних аміноспиртів з антимікробними властивостями. У XV Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances» (18–21 квітня 2017 р., м. Київ) (с. 71-72).

205. Настенко В.Б. (2022). Дослідження антистафілокової активності новосинтезованих похідних четвертинних солей арил ациклічних аміноспиртів щодо клінічних штамів *Staphylococcus aureus*. У XVI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної медицини» (24-25 листопада 2022 р., м. Запоріжжя) (с. 145-146).

206. Настенко В.Б., Вавринюк В.В. (2020). Дослідження спектру активності новосинтезованих похідних четвертинних солей арил ациклічних аміноспиртів щодо музейних штамів. У XIV Всеукраїнська науково-практична

конференція молодих вчених з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної медицини» (20 листопада 2020 р., м. Запоріжжя) (с. 143-144).

207. Настенко В.Б., Короткий Ю.В., Смертенко О.А. (2017). Антимікробні властивості похідних арил ациклічних аміноспиртів щодо метицилін-резистентних стафілококів. У Тези доповідей XV з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (11-15 вересня 2017 р., м. Одеса) (с. 214).

208. Настенко В.Б., Короткий Ю.В., Смертенко О.А., Осипчук Н.О., Широбоков В.П. (2018). Антимікробні властивості похідних арил ациклічних аміноспиртів щодо референтних мікроорганізмів. У Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності: Матеріали конференції (29 січня 2018 р., м. Чернівці) (с. 129-130).

209. Настенко, В. Б., Короткий, Ю. В., Смертенко, О. А., Осипчук, Н. О., Широбоков, В. П., Чоботар, А. П. (2018). Вивчення протимікробної активності солей алкіл (г-арил) оксидиалкіл амонію щодо референтних штамів мікроорганізмів. Мікробіологія і біотехнологія, (1), 18–27.
[https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1\(41\).117806](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1(41).117806)

210. Akinosoglou, K., et al. (2024). Amphotericin B in the era of new antifungals: Where will it stand? Journal of Fungi, 10(4), 278.
<https://doi.org/10.3390/jof10040278>

211. Verweij, P. E., Chowdhary, A., Melchers, W. J. G., & Meis, J. F. (2016). Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? Clinical Infectious Diseases, 62(3), 362-368.
<https://doi.org/10.1093/cid/civ885>

212. Ahmad, S., & Alfouzan, W. (2021). *Candida auris*: Epidemiology, diagnosis, pathogenesis, antifungal susceptibility, and infection control measures to combat the spread of infections in healthcare facilities. Microorganisms, 9(4), 807.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040807>

213. Billamboz, M., Fatima, Z., Hameed, S., & Jawhara, S. (2021). Promising drug candidates and new strategies for fighting against the emerging superbug *Candida auris*. *Microorganisms*, 9(3), 634. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030634>

214. Jain, T., et al. (2017). Chain-length-specific anti-*Candida* activity of cationic lipooxazoles: A new class of quaternary ammonium compounds. *Journal of Medical Microbiology*, 66(12), 1706-1714. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000610>

215. Nastenko V.B., Osypchuk N.O., & Shyrobokov V.P. (2022). Sensitivity of *Candida* clinical isolates to antimycotic drugs. In IV International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century” (September 22, 2022, Kyiv) (p. 47).

216. Osypchuk, N. O., Nastenko, V. B., Shyrobokov, V. P., & Korotkyi, Y. V. (2020). Sensitivity of antifungal preparations of *Candida* isolates from sub-biotopes of the human oral cavity. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11(1), 82–87. <https://doi.org/10.15421/022011>

217. Настенко В.Б. (2021). Скринінг протигрибкової активності новосинтезованих похідних четвертинних солей арил ациклічних аміноспиртів щодо музейних штамів. У XV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної медицини» (29 листопада 2021 р., м. Запоріжжя) (с. 189-19

218. Настенко В.Б., Широбоков В.П., Ковальчук В.П., Короткий Ю.В. (2024). Протигрибкові властивості новосинтезованих похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо клінічних штамів *C. albicans*. У Мечниковські читання – 2024: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю (1 листопада 2024 р., м. Харків) (с. 82-83).

219. Осипчук Н.О., Настенко В.Б., Широбоков В.П., Короткий Ю.В. (2020). Чутливість до синтетичних аромациклічних аміноспиртів ізолятів *Candida*, що виділені від пацієнтів з цукровим діабетом 1-го типу. *Довкілля та здоров'я*, №1 (94), 39-47. <https://doi.org/10.32402/dovkil2020.01.039>

220. Levison, M. E., & Levison, J. H. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infectious Disease Clinics of North America*, 23(4), 791–815. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.06.008>

221. Nielsen, E. I., Viberg, A., Löwdin, E., Cars, O., Karlsson, M. O., & Sandström, M. (2007). Semimechanistic pharmacokinetic/pharmacodynamic model for assessment of activity of antibacterial agents from time-kill curve experiments. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(1), 128–136. <https://doi.org/10.1128/AAC.00604-06>

222. de Azevedo, V. L. S., Rosa, F. C., Dias, L. R. L., Batista, L. A., Melo, M. C., Sales, L. A. T., Branco, A. d. J. M., Araújo, T. R. R., de Miranda, R. d. C. M., & Aliança, A. S. d. S. (2024). An Evaluation of the Antibacterial, Antileishmanial, and Cytotoxic Potential of the Secondary Metabolites of *Streptomyces* sp. ARH (A3). *Microorganisms*, 12(3), 476. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12030476>

223. King, E. S., Stacy, A. E., & Scott, J. G. (2024). A low-footprint, fluorescence-based bacterial time-kill assay for estimating dose-dependent cell death dynamics. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2024.03.08.584154>

224. Chan CY, Au-Yeang C, Yew WW, Leung CC, Cheng AF. In vitro postantibiotic effects of rifapentine, isoniazid, and moxifloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):340-3. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.340-343.2004>

225. Theuretzbacher, U., Gottwalt, S., Beyer, P., Butler, M., Czaplewski, L., Lienhardt, C., Ardal, C., Harbarth, S., & Kieny, M. P. (2019). Analysis of the clinical antibacterial and antituberculosis pipeline. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(2), e40–e50. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30513-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30513-9)

226. van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: The MTT assay. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 731, pp. 237-245). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20

227. Kiskó, G., et al. (2025). The invisible threat of antibiotic resistance in food. *Antibiotics*, 14(3), 250. <https://doi.org/10.3390/antibiotics14030250>

228. Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., & Biondo, C. (2021). Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. *Pathogens*, 10(10), 1310. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>
229. Kwaśniewska, D., Chen, Y. L., & Wieczorek, D. (2020). Biological activity of quaternary ammonium salts and their derivatives. *Pathogens*, 9(6), 459. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060459>
230. Borsari, C., Trader, D. J., Tait, A., & Costi, M. P. (2020). Designing chimeric molecules for drug discovery by leveraging chemical biology. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(6), 2737-2755. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01456>
231. Marzullo, P., Gruttadauria, M., & D'Anna, F. (2024). Quaternary ammonium salts-based materials: A review on environmental toxicity, anti-fouling mechanisms and applications in marine and water treatment industries. *Biomolecules*, 14(8), 957. <https://doi.org/10.3390/biom14080957>
232. Gerba, C. P. (2015). Quaternary ammonium biocides: Efficacy in application. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(2), 464-469. <https://doi.org/10.1128/AEM.02633-14>
233. Damavandi, M. S., Dehkordi, M. S., Dehghan, A., Heibati, F., Taghaddosi, R., & Gholipour, A. (2017). Detection of antiseptic resistance genes among *Staphylococcus aureus* colonising nurses and coagulase-negative staphylococci isolated from clinical specimens at teaching hospitals in southwest of Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 10(1), e39285. <https://doi.org/10.5812/jjm.39285>
234. Bankar, N., Shelke, Y., Bandre, G., & Kohle, M. (2024). MRSA in hospital setting. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.113393>
235. Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 864-870.
236. Ma, X., et al. (2024). A review of antimicrobial peptides: Structure, mechanism of action, and molecular optimization strategies. *Fermentation*, 10(11), 540. <https://doi.org/10.3390/fermentation10110540>

237. Lainioti, G. C., & Druvari, D. (2024). Designing antibacterial-based quaternary ammonium coatings (surfaces) or films for biomedical applications: Recent advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(22), 12264. <https://doi.org/10.3390/ijms252212264>

238. Wanka, L., Iqbal, K., & Schreiner, P. R. (2013). The lipophilic bullet hits the targets: Medicinal chemistry of adamantane derivatives. *Chemical Reviews*, 113(5), 3516-3604. <https://doi.org/10.1021/cr100264t>

239. Müller, G., Langer, J., Siebert, J., & Kramer, A. (2013). Residual antimicrobial effect of chlorhexidine digluconate and octenidine dihydrochloride on reconstructed human epidermis. *Skin Pharmacology and Physiology*, 27(1), 1-8. <https://doi.org/10.1159/000350172>

240. Moore, J. N., et al. (2023). Animal pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) infection models for clinical development of antibacterial drugs: Lessons from selected cases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 78(6), 1369-1380. <https://doi.org/10.1093/jac/dkad114>

241. Miller, W. R., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2014). Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 12(10), 1221-1236. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.956092>

242. Khan, A., Miller, W. R., Axell-House, D., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2022). Antimicrobial susceptibility testing for enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 60(9), e0084321. <https://doi.org/10.1128/jcm.00843-21>

243. Langer, M. K., et al. (2022). A concise SAR-analysis of antimicrobial cationic amphipathic barbiturates for an improved activity-toxicity profile. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 241, 114632. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114632>

244. Kim, J., Yu, H., Yang, E., Choi, Y., & Chang, P.-S. (2023). Effects of alkyl chain length on the interfacial, antibacterial, and antioxidative properties of erythorbyl fatty acid esters. *LWT - Food Science and Technology*, 174, 114421. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114421>

245. Rázquin-Olazarán, I., Shahrour, H., & Martínez-De-Tejada, G. (2020). A synthetic peptide sensitizes multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics for more than two hours and permeabilizes its envelope for twenty hours. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00678-3>
246. Ahmed, F., Zhang, D., Tang, X., & Malakar, P. K. (2024). Targeting spore-forming bacteria: A review on the antimicrobial potential of selenium nanoparticles. *Foods*, 13(24), 4026. <https://doi.org/10.3390/foods13244026>
247. Kazdaglis, G., et al. (2016). Drug susceptibility pattern from tuberculosis patients in region of Macedonia Greece. *Journal of Tuberculosis Research*, 4(3), 92-97. <https://doi.org/10.4236/jtr.2016.43011>
248. Chen, H., et al. (2018). The mycobacterial membrane: A novel target space for anti-tubercular drugs. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1627. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01627>
249. Palomino, J. C., & Martin, A. (2014). Drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antibiotics*, 3(3), 317-340. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3030317>
250. Saxena, S., Spaink, H. P., & Forn-Cuní, G. (2021). Drug resistance in nontuberculous mycobacteria: Mechanisms and models. *Biology*, 10(2), 96. <https://doi.org/10.3390/biology10020096>
251. Zhou, Z., et al. (2023). Quaternary ammonium salts: Insights into synthesis and new directions in antibacterial applications. *Bioconjugate Chemistry*, 34(2), 302-325. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00598>
252. Zhao, F., Wang, P., Lucardi, R. D., Su, Z., & Li, S. (2020). Natural sources and bioactivities of 2,4-di-tert-butylphenol and its analogs. *Toxins*, 12(1), 35. <https://doi.org/10.3390/toxins12010035>
253. Zgurskaya, H. I., & Rybenkov, V. V. (2020). Permeability barriers of Gram-negative pathogens. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1459(1), 5-18. <https://doi.org/10.1111/nyas.14134>

254. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2024). Breakpoint tables for interpretation of MICs for antifungal agents (Version 12.0). EUCAST.

255. Whaley, S. G., Berkow, E. L., Rybak, J. M., Nishimoto, A. T., Barker, K. S., & Rogers, P. D. (2017). Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* species. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02173>

256. Pal, M., Tariku, F., Upadhyay, D., Paula, C. R., & Patil, B. (2024). *Candida auris*: An emerging life-threatening fungal pathogen of global public health concern. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*, 12(2), 40-43. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2024.12.00371>

257. Lyon, G. M., Karatela, S., Sunay, S., & Adiri, Y. (2010). Antifungal susceptibility testing of *Candida* isolates from the *Candida* surveillance study. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1270-1275. <https://doi.org/10.1128/JCM.02363-09>

258. Arendrup, M. C., & Patterson, T. F. (2017). Multidrug-resistant *Candida*: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *Journal of Infectious Diseases*, 216(Suppl_3), S445-S451. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix131>

259. John, C. N., Abrantes, P. M. D. S., Prusty, B. K., Ablashi, D. V., & Africa, C. W. J. (2019). K21 compound, a potent antifungal agent: Implications for the treatment of fluconazole-resistant HIV-associated *Candida* species. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01021>

260. Cantón, E., Pemán, J., Gobernado, M., Viudes, A., & Espinel-Ingroff, A. (2004). Patterns of amphotericin B killing kinetics against seven *Candida* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2477-2482. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2477-2482.2004>

261. Jiang, Q., Deng, Y., Li, S., Yang, D., & Tao, L. (2023). Sub-lethal concentrations of chlorhexidine inhibit *Candida albicans* growth by disrupting ROS and metal ion homeostasis. *Journal of Oral Microbiology*, 15(1), 2278937. <https://doi.org/10.1080/20002297.2023.2278937>

262. Jothi, R., Sangavi, R., Raja, V., Kumar, P., Pandian, S. K., & Gowrishankar, S. (2022). Alteration of cell membrane permeability by cetyltrimethylammonium chloride induces cell death in clinically important *Candida* species. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(1), 27. <https://doi.org/10.3390/ijerph20010027>

263. Rouvier, F., et al. (2024). Identification of 2,4-di-tert-butylphenol as an antimicrobial agent against *Cutibacterium acnes* bacteria from Rwandan propolis. *Antibiotics*, 13(11), 1080. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13111080>

264. Sayed, S. R. M., Ezzat, A. O., Yassin, M. T., & Abdelbacki, A. M. M. (2023). Synthesis, characterization and application of novel cationic surfactants as antibacterial agents. *Separations*, 10(2), 97. <https://doi.org/10.3390/separations10020097>

265. Alanio, A., et al. (2016). Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* in immunocompromised patients with invasive aspergillosis. *Emerging Infectious Diseases*, 22(1), 157-158. <https://doi.org/10.3201/eid2201.150848>

266. Kwaśniewska, D., Chen, Y.-L., & Wieczorek, D. (2020). Biological activity of quaternary ammonium salts and their derivatives. *Pathogens*, 9(6), 459. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060459>

267. Xue, Y., Xiao, H., & Zhang, Y. (2015). Antimicrobial polymeric materials with quaternary ammonium and phosphonium salts. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), 3626-3655. <https://doi.org/10.3390/ijms16023626>

268. Jennings, M. C., Minbiole, K. P. C., & Wuest, W. M. (2015). Quaternary ammonium compounds: An antimicrobial mainstay and platform for innovation to address bacterial resistance. *ACS Infectious Diseases*, 1(7), 288-303. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00047>

269. Crnčević, D., et al. (2025). A dual antibacterial action of soft quaternary ammonium compounds: Bacteriostatic effects, membrane integrity, and reduced in vitro and in vivo toxicity. *RSC Advances*, 15(2), 1490-1506. <https://doi.org/10.1039/D4RA07975B>

270. Liu, C., et al. (2023). Low concentration quaternary ammonium compounds promoted antibiotic resistance gene transfer via plasmid conjugation. *Science of The Total Environment*, 887, 163781. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163781>
271. Yao, Y., Ye, Z., Zhang, Y., Wang, Y., & Yu, C. (2024). Quaternary ammonium compounds and their composites in antimicrobial applications. *Advanced Materials Interfaces*, 11(17), 2300946. <https://doi.org/10.1002/admi.202300946>
272. Sheth, U. V. (2022). Determination of toxicity through cytotoxicity assays. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2538, pp. 137-147). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2509-5_15
273. Vasileva-Tonkova, E., et al. (2019). Antimicrobial, antibiofilm and cytotoxicity activity of a new acridine hyperbranched polymer in solution and on cotton fabric. *Fibers and Polymers*, 20(1), 19-24. <https://doi.org/10.1007/s12221-019-8687-4>
274. Langer, M. K., et al. (2022). A concise SAR-analysis of antimicrobial cationic amphipathic barbiturates for an improved activity-toxicity profile. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 241, 114632. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114632>
275. Seenivasan, A., Manikkam, R., Kaari, M., Sahu, A. K., Said, M., & Dastager, S. G. (2022). 2,4-Di-tert-butylphenol (2,4-DTBP) purified from *Streptomyces* sp. KCA1 from *Phyllanthus niruri*: Isolation, characterization, antibacterial and anticancer properties. *Journal of King Saud University - Science*, 34(5), 102088. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102088>
276. Varsha, K. K., Devendra, L., Shilpa, G., Priya, S., Pandey, A., & Nampoothiri, K. M. (2015). 2,4-Di-tert-butyl phenol as the antifungal, antioxidant bioactive purified from a newly isolated *Lactococcus* sp. *International Journal of Food Microbiology*, 211, 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.025>

ДОДАТКИ

Додаток А

Список публікацій здобувача

Наукові праці, у яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. Настенко, В. Б., Короткий, Ю. В., Смертенко, О. А., Осипчук, Н. О., Широбоков, В. П., Чоботар, А. П. (2018). Вивчення протимікробної активності солей алкіл (r-арил) оксидиалкіл амонію щодо референтних штамів мікроорганізмів. *Мікробіологія і біотехнологія*, (1), 18–27. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1\(41\).117806](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1(41).117806) (Фахове видання України).

Короткий Ю. В. – підготовка хімічних сполук, консультування під час проведення експериментальної частини роботи

Смертенко О. А. – приймала участь в формальному аналізі і перевірці даних дослідження

Осипчук Н. О. – приймала участь в організації методології дослідження

Широбоков В. П. – приймав участь в адмініструванні проекту, брав участь у критичному рецензуванні рукопису статті перед публікацією

Чоботар А. П. – приймала участь в візуалізації даних дослідження

2. Osypchuk, N. O., Nastenko, V. B., Shirobokov, V. P., & Korotkyi, Y. V. (2020). Sensitivity of antifungal preparations of *Candida* isolates from sub-biotopes of the human oral cavity. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 11(1), 82–87. <https://doi.org/10.15421/022011> (Фахове видання України. Видання включено до міжнародної наукометричної бази Web Of Science).

Osypchuk N. O. – участь у зборі частини біоматеріалу від пацієнтів для мікробіологічного дослідження, особисто проводила частину мікробіологічних досліджень, оцінку результатів, та підготовку матеріалу до друку, пошук та аналіз літературних джерел за темою роботи

Shirobokov V. P. – приймав участь в адмініструванні проекту, брав участь

у критичному рецензуванні рукопису статті перед публікацією;

Korotkyi Y. V. – підготовка хімічних сполук, консультування під час проведення експериментальної частини роботи

3. Nastenko V. (2024). Antimicrobial properties of newly synthesised aryl acyclic amino alcohols against clinical strains of enterococci. *ScienceRise: Biological Science*, 4 (41), 11-18. <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2024.325076> (Фахове видання України).

4. Nastenko, V. (2025). Antimycobacterial activity of new aryloxyethoxy-dialkylaminopropanol derivatives against reference strains of nontuberculous mycobacteria. *ScienceRise: Biological Science*, 1 (42), 12–17. <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2025.326435> (Фахове видання України).

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації

5. Осипчук Н. О., Настенко В. Б., Широбоков В. П., Короткий Ю. В. (2020). Чутливість до синтетичних ароматичних аміноспиртів ізолятів *Candida*, що виділені від пацієнтів з цукровим діабетом 1-го типу. *Довкілля та здоров'я*, №1 (94), 39-47. <https://doi.org/10.32402/dovkil2020.01.039> (Категорія В – нефахове видання)

Осипчук Н. О. – участь у зборі частини біоматеріалу від пацієнтів для мікробіологічного дослідження, особисто проводила частину мікробіологічних досліджень, оцінку результатів, та підготовку матеріалу до друку, пошук та аналіз літературних джерел за темою роботи

Широбоков В. П. – приймав участь в адмініструванні проекту, брав участь у критичному рецензуванні рукопису статті перед публікацією;

Короткий Ю. В. – підготовка хімічних сполук, консультування під час проведення експериментальної частини роботи

Список наукових праць, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

6. Nastenko, V. B., Voloshchuk, O. M., Korotkiy, J. V., Smertenko, A. A., Chuyko, A. L., & Shyrobokov, V. P. (2015). Peculiarities of antimicrobial action of

synthetic aromatic alcohols. In *X International Summer School-Conference "Molecular microbiology and biotechnology"* (p. 146). Odesa. **(Тези)**

Voloshchuk, O. M. – приймала участь в мовній адаптації рукопису

Korotkiy, J. V. – підготовка хімічних сполук, консультування під час проведення експериментальної частини роботи

Smertenko, A. A. – підготовка хімічних сполук

Chuuko, A. L. – підготовка хімічних сполук

Shyrobokov, V. P. – приймав участь в адмініструванні проекту, брав участь у критичному рецензуванні рукопису

7. Настенко В. Б., Короткий Ю. В., Смертенко О. А. (2017). Антимікробні властивості похідних арил ациклічних аміноспиртів щодо метицилін-резистентних стафілококів. У *Тези доповідей XV з'їзду Товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського* (11-15 вересня 2017 р., м. Одеса) (с. 214). **(Тези)**

Короткий Ю. В. – підготовка хімічних сполук, консультування під час проведення експериментальної частини роботи

Смертенко О. А. – підготовка хімічних сполук Настенко В. Б. (2017). Скринінг похідних арил ациклічних аміноспиртів з антимікробними властивостями. У *XV Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances»* (18–21 квітня 2017 р., м. Київ) (с. 71-72). **(Тези)**

8. Nastenkov V. B., Osypchuk N. O. (2018). Features of detection of MRSA strains among clinical isolates. In *III International Scientific Conference: Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century* (April 18, 2018, Kyiv) (p. 75-76). **(Тези)**

Osypchuk N.O. – приймала участь в організації методології дослідження

9. Настенко В. Б., Короткий Ю. В., Смертенко О. А., Осипчук Н. О., Широбоков В. П. (2018). Антимікробні властивості похідних арил ациклічних аміноспиртів щодо референтних мікроорганізмів. У *Сучасні проблеми*

антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності: Матеріали конференції (29 січня 2018 р., м. Чернівці) (с. 129-130). (Тези)

Короткий Ю. В. – підготовка хімічних сполук, консультування під час проведення експериментальної частини роботи

Смертенко О. А. – приймала участь в формальному аналізі і перевірці даних дослідження

Осипчук Н. О. – приймала участь в організації методології дослідження

Широбоков В. П. – приймав участь в адмініструванні проекту, брав участь у критичному рецензуванні рукопису статті перед публікацією

10. Настенко В. Б., Вавринюк В. В. (2020). Дослідження спектру активності новосинтезованих похідних четвертинних солей арил ациклічних аміноспиртів щодо музейних штамів. У *XIV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної медицини»* (20 листопада 2020 р., м. Запоріжжя) (с. 143-144). (Тези)

Вавринюк В. В. – приймала участь в організації методології дослідження

11. Настенко В. Б. (2021). Скринінг протигрибкової активності новосинтезованих похідних четвертинних солей арил ациклічних аміноспиртів щодо музейних штамів. У *XV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної медицини»* (29 листопада 2021 р., м. Запоріжжя) (с. 189-190). (Тези)

12. Настенко В. Б. (2022). Дослідження антистафілокової активності новосинтезованих похідних четвертинних солей арил ациклічних аміноспиртів щодо клінічних штамів *Staphylococcus aureus*. У *XVI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної медицини»* (24-25 листопада 2022 р., м. Запоріжжя) (с. 145-146). (Тези)

13. Nastenko V. B., Osypchuk N. O., & Shyrobokov V. P. (2022). Sensitivity of *Candida* clinical isolates to antimycotic drugs. In *IV International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century”* (September 22, 2022, Kyiv) (p. 47). (Тези)

Osypchuk N.O. – участь у зборі частини біоматеріалу від пацієнтів для мікробіологічного дослідження

Shyrobokov, V. P.– приймав участь в адмініструванні проекту, брав участь у критичному рецензуванні рукопису

Настенко В. Б., Широбоков В. П., Ковальчук В. П., Короткий Ю. В. (2024). Протигрибкові властивості новосинтезованих похідних четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію щодо клінічних штамів *C. albicans*. У *Мечниковські читання – 2024: Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю* (1 листопада 2024 р., м. Харків) (с. 82-83). **(Тези)**

Широбоков В. П. – приймав участь в адмініструванні проекту, брав участь у критичному рецензуванні рукопису статті перед публікацією

Ковальчук В. П. – приймав участь в адмініструванні проекту, брав участь у критичному рецензуванні рукопису статті перед публікацією

Короткий Ю. В. – підготовка хімічних сполук, консультування під час проведення експериментальної частини роботи

Апробація результатів дисертації

- науково-практична конференція з міжнародною участю X International Summer School-Conference “Molecular microbiology and biotechnology” (Одеса, 2015) – публікація;
- науково-практична конференція з міжнародною участю XV з’їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського (Одеса, 2017) – публікація з усною доповіддю;
- науково-практична конференція з міжнародною участю XV Міжнародна науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances» (Київ, 2017) – публікація;
- науково-практична конференція з міжнародною участю III International Scientific Conference: Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century (Київ, 2018) – публікація;

- науково-практична конференція з міжнародною участю «Сучасні проблеми антибіотикотерапії та формування антибіотикорезистентності» (Чернівці, 2018) – публікація;
- науково-практична конференція з міжнародною участю XIV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні питання клінічної медицини» (Запоріжжя, 2020) – публікація;
- науково-практична конференція з міжнародною участю XV Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні питання клінічної медицини» (Запоріжжя, 2021) – публікація;
- науково-практична конференція з міжнародною участю XVI Всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні питання клінічної медицини» (Запоріжжя, 2022) – публікація;
- науково-практична конференція з міжнародною участю IV International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century” (Київ, 2022) – публікація;
- науково-практична конференція з міжнародною участю «Мечниковські читання – 2024» (Харків, 2024) – публікація.

Додаток Б

АКТИ ВПРОВАДЖЕНЬ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи та
інновацій Національного
медичного університету імені
О. О. Богомольця МОЗ України,
професор

Земсков С.В.
2025 р



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів наукових досліджень

1. Назва наукової розробки, яка впроваджується: Антимікробні властивості четвертинних солей арилоксисетокси діалкіл амонію в умовах експерименту
2. Установа-розробник: Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України; 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.
Розробник: Настенко Володимир Борисович.
Джерела інформації:
 1. Настенко, В. Б., Короткий, Ю. В., Смертенко, О. А., Осипчук, Н. О., Широбоков, В. П., Чоботар, А. П. (2018). Вивчення протимікробної активності солей алкіл (г-арил) оксидиалкіл амонію щодо референтних штамів мікроорганізмів. Мікробіологія і біотехнологія, (1), 18–27. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1\(41\).117806](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1(41).117806)
 2. Osypchuk, N. O., Nastenko, V. B., Shirobokov, V. P., & Korotkyi, Y. V. (2020). Sensitivity of antifungal preparations of Candida isolates from sub-biotopes of the human oral cavity. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 11(1), 82–87. <https://doi.org/10.15421/022011>
 3. Nastenko, V. (2024). Antimicrobial properties of newly synthesised aryl acyclic amino alcohols against clinical strains of enterococci. ScienceRise: Biological Science, 4 (41), 11-18. DOI: 10.15587/2519-8025.2024.325076 <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2024.325076>
 4. Nastenko, V. (2025). Antimycobacterial activity of new aryloxyethoxy-dialkylaminopropanol derivatives against reference strains of nontuberculous mycobacteria. ScienceRise: Biological Science, 1 (42), 12–17. <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2025.326435>
3. Базова установа, яка проводить впровадження: Заклад вищої освіти Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, кафедра мікробіології та паразитології з основами імунології. (протокол №15 від 02.03.2025)
4. Форма впровадження: у навчальний процес кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології, в матеріали лекцій та практичних занять, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
5. Результати застосування пропозиції за період з вересня 2024 по теперішній час. Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри мікробіології та паразитології з основами імунології на практичних заняттях
6. Ефективність впровадження: Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі забезпечує розширення уявлень та поглиблення знань здобувачів вищої освіти щодо антибіотикорезистентності серед провідних збудників інфекційних ускладнень та протимікробної активності антибіотиків та антисептичних засобів.

Відповідальний за впровадження:
д.м.н., професор

Віталій БОБІР

завідувач кафедри мікробіології
та паразитології з основами імунології
Національного медичного університету
імені О.О. Богомольця МОЗ України,
академік НАН та НАМН України,
д.мед.н., професор

Володимир ШИРОБОКОВ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з науково-педагогічної
 роботи закладу вищої освіти
 Буковинського державного
 медичного університету, доцент
 Ходоровський В.М.
 « 25 » 04 * УКРАЇНА * 2025 р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ результатів наукових досліджень

1. **Назва наукової розробки, яка впроваджується:** Антимікробні властивості четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію в умовах експерименту
2. **Установа-розробник:** Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України; 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.
Розробник: Настенко Володимир Борисович.
3. **Джерела інформації:**
 1. Настенко, В. Б., Короткий, Ю. В., Смертенко, О. А., Осипчук, Н. О., Широбоков, В. П., Чоботар, А. П. (2018). Вивчення протимікробної активності солей алкіл (γ-арил) оксидиалкіл амонію щодо референтних штабів мікроорганізмів. Мікробіологія і біотехнологія, (1), 18–27. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1\(41\).117806](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1(41).117806)
 2. Osypchuk, N. O., Nastenka, V. B., Shirobokov, V. P., & Korotkyi, Y. V. (2020). Sensitivity of antifungal preparations of Candida isolates from sub-biotopes of the human oral cavity. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 11(1), 82–87. <https://doi.org/10.15421/022011>
 3. Nastenko, V. (2024). Antimicrobial properties of newly synthesised aryl acyclic amino alcohols against clinical strains of enterococci. ScienceRise: Biological Science, 4 (41), 11–18. DOI: 10.15587/2519-8025.2024.325076 <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2024.325076>
 4. Nastenko, V. (2025). Antimycobacterial activity of new aryloxyethoxy-dialkylaminopropanol derivatives against reference strains of nontuberculous mycobacteria. ScienceRise: Biological Science, 1 (42), 12–17. <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2025.326435>
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Заклад вищої освіти Буковинський державний медичний університет МОЗ України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології (протокол № 28, від 18 квітня 2025).
5. **Форма впровадження:** у навчальний процес кафедри мікробіології, вірусології та імунології, у матеріали лекцій та практичних занять, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Результати застосування пропозиції за період з вересня 2024 по теперішній час.** Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри мікробіології, вірусології та імунології на практичних заняттях
7. **Ефективність впровадження:** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі забезпечує розширення уявлень та поглиблення знань здобувачів вищої освіти щодо антибіотикорезистентності серед провідних збудників інфекційних ускладнень та протимікробної активності антибіотиків, антисептичних засобів та похідних арил ациклічних аміноспиртів.

Відповідальний за впровадження:
 професор кафедри мікробіології, вірусології та
 імунології, д.мед.н., професор

Ігор Сидорчук

Завідувач кафедри мікробіології, вірусології та
 імунології Буковинського державного
 медичного університету, д.мед.н., професор

Святослав ДЕЙНЕКА



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної роботи
 НУОЗ України імені П.Л. Шупика,
 доктор. НАМН України, професор

Толстанов О.К.

«13» березня 2025 р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів наукових досліджень

- Назва наукової розробки, яка впроваджується:** Антимікробні властивості четвертинних солей арилокситокси діалкіл амонію в умовах експерименту
- Установа-розробник:** Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України; 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.
Розробник: Настенко Володимир Борисович.
- Джерела інформації:**
 - Настенко, В. Б., Короткий, Ю. В., Смертенко, О. А., Осипчук, Н. О., Ширококов, В. П., Чоботар, А. П. (2018). Вивчення протимікробної активності солей алкіл (г-арил) оксидиалкіл амонію щодо референтних штамів мікроорганізмів. Мікробіологія і біотехнологія, (1), 18–27. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1\(41\).117806](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1(41).117806)
 - Osyrychuk, N. O., Nastenko, V. B., Shirobokov, V. P., & Korotkyi, Y. V. (2020). Sensitivity of antifungal preparations of Candida isolates from sub-biotopes of the human oral cavity. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 11(1), 82–87. <https://doi.org/10.15421/022011>
 - Nastenko, V. (2024). Antimicrobial properties of newly synthesised aryl acyclic amino alcohols against clinical strains of enterococci. ScienceRise: Biological Science, 4 (41), 11–18. DOI: 10.15587/2519-8025.2024.325076 <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2024.325076>
 - Nastenko, V. (2025). Antimycobacterial activity of new aryloxyethoxy-dialkylaminopropanol derivatives against reference strains of nontuberculous mycobacteria. ScienceRise: Biological Science, 1 (42), 12–17. <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2025.326435>
- Базова установа, яка проводить впровадження:** Заклад вищої та післядипломної освіти Національний університет охорони здоров'я України імені П. Л. Шупика, кафедра фармації. *(протокол № 06/25 від 11.03.2025 р)*
- Форма впровадження:** у навчальний процес кафедри фармації, в матеріали лекцій та практичних занять, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
- Результати застосування пропозиції за період з вересня 2024 по теперішній час.** Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри фармації на практичних заняттях
- Ефективність впровадження:** Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі забезпечує розширення уявлень та поглиблення знань здобувачів вищої освіти щодо антибіотикорезистентності серед провідних збудників інфекційних ускладнень та протимікробної активності антибіотиків, антисептичних засобів та похідних арил ациклічних аміноспиртів.

Відповідальний за впровадження:
 завідувач кафедри фармації,
 Національного університету охорони
 здоров'я України імені П. Л. Шупика
 доктор фарм. наук,
 старший дослідник, доцент

Сергій СОЛОВЙОВ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної
та лікувальної роботи закладу
вищої освіти Вінницького
національного медичного
університету імені М. І. Пирогова



Погорілий В.В.
2025 р

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Результатів наукових досліджень

1. Назва наукової розробки, яка впроваджується: Антимікробні властивості четвертинних солей арилоксиетокси діалкіл амонію в умовах експерименту
2. Установа-розробник: Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України; 21018, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.
Розробник: Настенко Володимир Борисович.
3. Джерела інформації:
 1. Настенко, В. Б., Короткий, Ю. В., Смертенко, О. А., Осипчук, Н. О., Ширококов, В. П., Чоботар, А. П. (2018). Вивчення протимікробної активності солей алкіл (г-арил) оксидиалкіл амонію щодо референтних штамів мікроорганізмів. Мікробіологія і біотехнологія, (1), 18–27. [https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1\(41\).117806](https://doi.org/10.18524/2307-4663.2018.1(41).117806)
 2. Osypchuk, N. O., Nastenko, V. B., Shirobokov, V. P., & Korotkyi, Y. V. (2020). Sensitivity of antifungal preparations of Candida isolates from sub-biotopes of the human oral cavity. Regulatory Mechanisms in Biosystems, 11(1), 82–87. <https://doi.org/10.15421/022011>
 3. Nastenko, V. (2024). Antimicrobial properties of newly synthesised aryl acyclic amino alcohols against clinical strains of enterococci. ScienceRise: Biological Science, 4 (41), 11–18. DOI: 10.15587/2519-8025.2024.325076 <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2024.325076>
 4. Nastenko, V. (2025). Antimycobacterial activity of new aryloxyethoxy-dialkylaminopropanol derivatives against reference strains of nontuberculous mycobacteria. ScienceRise: Biological Science, 1 (42), 12–17. <http://doi.org/10.15587/2519-8025.2025.326435>
4. Базова установа, яка проводить впровадження: Заклад вищої та післядипломної освіти Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова МОЗ України, кафедра мікробіології, вірусології та імунології (протокол № 8 , від 20 лютого 2025).
5. Форма впровадження: у навчальний процес кафедри фармації, в матеріали лекцій та практичних занять, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. Результати застосування пропозиції за період з вересня 2024 по теперішній час. Матеріали використовуються в навчальному процесі кафедри фармації на практичних заняттях
7. Ефективність впровадження: Використання результатів наукових досліджень у навчальному процесі забезпечує розширення уявлень та поглиблення знань здобувачів вищої освіти щодо антибіотикорезистентності серед провідних збудників інфекційних ускладнень та протимікробної активності антибіотиків, антисептичних засобів та похідних арил ациклічних аміноспиртів.

Відповідальний за впровадження: к.б.н., доцент

Алла КРИЖАНОВСЬКА

Завідувач кафедри мікробіології
Вінницького медичного національного
університету імені М.І. Пирогова,
д.мед.н., професор

Валентин КОВАЛЬЧУК