

УДК 577.1:54.057

А. А. Шихад, М. А. Ханчевский, А. Г. Сыса, Е. Р. Грицкевич, Е. И. Квасюк

## ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АРАБИНОЗИДОВ ПУРИНОВОГО РЯДА \*

Во введении указан объект исследования – нуклеозиды, представляющие собой большое семейство природных и химически модифицированных аналогов, характеризующихся огромным структурным разнообразием. Показано, что после начала систематических исследований был обнаружен ряд структур-лидеров огромной биологической и медицинской важности, поэтому исследования потенциальной антибактериальной активности новых производных нуклеозидов являются чрезвычайно актуальными, особенно в эпоху стремительного развития антибиотикорезистентности и острой необходимости поиска альтернативных традиционным антибиотикам новых лекарственных средств. Целью исследования является оценка влияния модифицированных нуклеозидов 2-фтор-арабинофуранозиладенина (флударабина), 2-амино-6-хлор-арабинофуранозилпурина (2-NH<sub>2</sub>-6-Cl-araPur) и нуклеотида 2-фтор-арабинофуранозиладенинмонофосфата (флударабинфосфата) на условно-патогенные бактериальные культуры *B. cereus* и *P. mirabilis*. В основной части получены количественные характеристики антипролиферативной активности изученных соединений по отношению к условно-патогенным бактериальным культурам *B. cereus* и *P. mirabilis*, а также было изучено влияние синтезированных соединений на уровень активных форм кислорода (АФК) в бактериальных культурах. Указаны используемые методики для оценки выраженности окислительного стресса, анализа жизнеспособности клеточных культур, а также построения статистических моделей «доза – эффект». Установлено, что все изученные модифицированные пуриновые нуклеозиды/нуклеотиды показали дозозависимую ингибиторную активность по отношению к бактериальным культурам в экспоненциальной фазе их роста. Показано, что продукция АФК в штаммах бактерий усиливалась дозозависимым образом при культивировании бактериальных клеток в присутствии всех изученных соединений. По совокупности полученных результатов можно предположить, что усиленная выработка АФК оказывает ингибиторное влияние на рост штаммов использованных в работе бактерий. Рассчитаны параметры лог-логистических моделей «доза – эффект» и оценена их статистическая значимость. Полученные результаты могут быть использованы при создании препаратов для лечения инфекционных заболеваний.

**Ключевые слова:** антибактериальная активность, модифицированные нуклеозиды, флударабин, активные формы кислорода, лог-логистическая модель.

**Шихад Аршед Абд Али Шихад**, аспирант МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ (Беларусь); науч. рук. – А. Г. Сыса, канд. хим. наук, доц., декан факультета экологической медицины МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ (Беларусь).

**Адрес для корреспонденции:** ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь; e-mail: arshedalmnasori@gmail.com

**Ханчевский Максим Александрович**, мл. науч. сотрудник научно-исследовательского сектора МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ (Беларусь).

**Адрес для корреспонденции:** ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь; e-mail: maks.khanchevskiy@bk.ru

**Сыса Алексей Григорьевич**, канд. хим. наук, доц., декан факультета экологической медицины МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ (Беларусь).

**Адрес для корреспонденции:** ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь; e-mail: aliaksej.sysa@iseu.by

**Грицкевич Евгений Ростиславович**, канд. биол. наук, доц., доц. каф. иммунологии МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ (Беларусь).

**Адрес для корреспонденции:** ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь; e-mail: gritskevitchev@mail.ru

**Квасюк Евгений Иванович**, д-р хим. наук, проф., проф. каф. экологической химии и биохимии МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ (Беларусь).

**Адрес для корреспонденции:** ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь; e-mail: ekvasyuk@inbox.ru

**Введение.** С началом широкого использования антибиотиков в клинической практике наступила новая эра медикаментозного лечения инфекционных заболеваний. Тем не менее не прошло и столетия, как эффективность противомикробных препаратов против патогенных микроорганизмов значительно снизилась. Широкое применение антибиотиков привело к возникновению и быстрому распространению резистентности у микроорганизмов. В настоящее время все больше и больше известных и новых штаммов бактерий становятся невосприимчивыми к используемым лекарствам. Существует мнение, что человечество вступает в постантибиотическую эру, когда даже обычные инфекции или небольшие травмы могут быть опасны для жизни [1; 2]. В докладе Всемирной организации здравоохранения за 2020 г. говорится о широком распространении резистентных микроорганизмов, что значительно усложняет лечение инфекций, вызываемых не только бактериями, но и грибами, паразитами и вирусами [3]. Ежегодно около 700 тыс. человек умирают от инфекций, вызванных лекарственно-устойчивыми бактериями, и к 2050 г. это число может вырасти до 10 млн [4].

Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам может развиваться по нескольким механизмам: инактивация или деградация антибиотика ферментом (самый древний механизм, эффективный против  $\beta$ -лактамовых антибиотиков), ингибирование абсорбции или активное удаление антибиотика из клетки (часто используется против тетрациклинов, макролидов и фторхинолонов) и изменения в структуре рецептора [5]. Возможно, существуют и другие, альтернативные, механизмы. Большинство генов устойчивости локализованы в плазмидах, что делает возможной их наследуемость и горизонтальную передачу другим бактериям. В настоящее время доказана возможность приобретения устойчивости к любому известному классу антибиотиков независимо от механизма их действия [5–7].

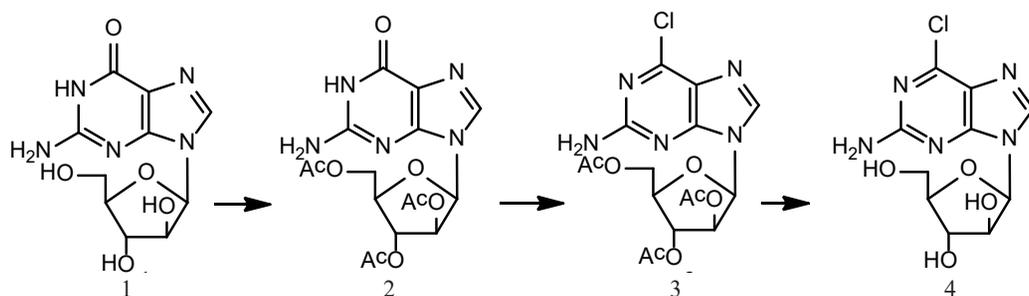
Большинство используемых в настоящее время антибиотиков были открыты до 70-х гг. прошлого века [8]. Такая низкая активность в поиске новых противомикробных соединений может быть объяснена высокими денежными и временными затратами на вывод препарата на рынок, а также ограниченным набором методов идентификации активных субстанций [9]. Кроме того, подавляющее большинство существующих антибиотиков обладают значительной цитотоксичностью, что ограничивает возможности их применения. Очевидно, что существует острая необходимость в разработке новых антибактериальных препаратов с новыми механизмами действия, которые могут быть эффективными против штаммов с множественной лекарственной устойчивостью.

Одним из малоизученных классов соединений, обладающих потенциальной антимикробной активностью, являются производные компонентов нуклеиновых кислот: нуклеозиды, нуклеотиды, а также их модифицированные аналоги. Эти соединения участвуют в большом количестве биологических процессов, включая хранение генетической информации, экспрессию генов, энергетический метаболизм и передачу сигналов. Эти процессы жизненно важны для всех живых организмов, включая бактерии. Модифицированные нуклеозиды являются одним из наиболее важных классов препаратов, используемых в клинике, преимущественно в качестве противовирусных и противоопухолевых средств [10]. Однако в последнее время появляется все больше и больше данных об их эффективности против микроорганизмов. На данный момент антимикробная активность нуклеозидов обнаружена как у ряда природных соединений, так и их синтетических аналогов [11; 12]. Антимикробные свойства также обнаружены у уже известных нуклеозидов, которые использовались или используются для лечения других заболеваний [13]. Поэтому поиск новых соединений, обладающих потенциальной антибактериальной активностью, в ряду модифицированных нуклеозидов и нуклеотидов и изучение молекулярных механизмов их действия имеют важное фундаментальное и практическое значение.

#### **Основная часть. Материалы и методы**

**Получение использованных в работе соединений.** Получение исследованных в работе соединений осуществляли с использованием подходов, описанных в [14].

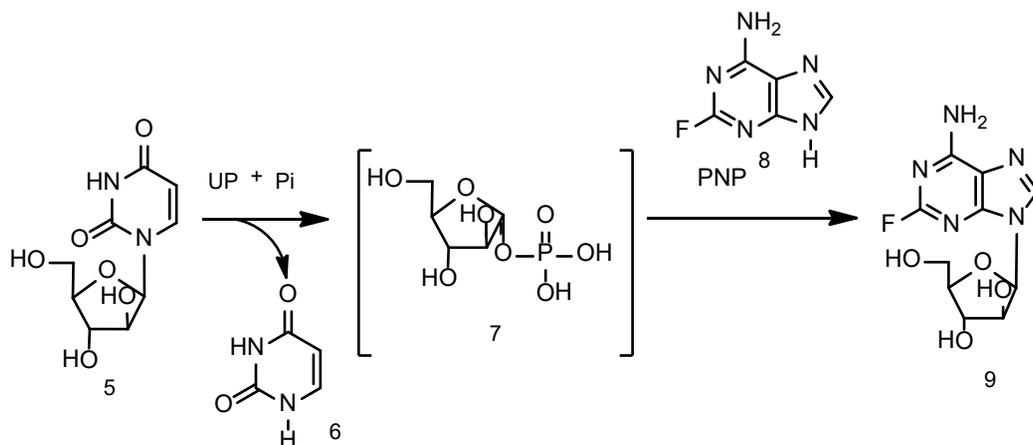
**Синтез 2-амино-6-хлор-9-(β-D-арабинофуранозил)пурина (4).** Синтез 2-NH<sub>2</sub>-6-Cl-araPur (4) проводился согласно схеме, представленной на рисунке 1.



**Рисунок 1 – Схема синтеза 2-амино-6-хлор-9-(β-D-арабинофуранозил)пурина**

Ацетилирование арабинофуранозилгуанина 1 уксусным ангидридом в ацетонитриле в присутствии триэтиламина и диметиламинопиридина в качестве катализаторов давало триацетат 2, который выделяли в кристаллическом состоянии. Обработка триацетата 2 хлорокисью фосфора в ацетонитриле в присутствии N,N-диметиланилина и бензилтриэтиламмоний хлористого при 100–110 °С и последующая стандартная обработка реакционной смеси (нейтрализация и обработка смесью «хлороформ–вода») приводили к 6-хлорпроизводному (3), которое без дополнительной очистки дезацетилировали действием раствора карбоната калия в метаноле при 50–60 °С. Последующая обработка реакционной смеси ионообменной смолой Дауэкс 50×8 (H<sup>+</sup>-форма) и активированным углем приводила к дезацетилированному 6-хлорпроизводному (4), выделенному в виде аморфного порошка.

**Синтез флударабина 9.** Синтез 2-F-araA 9 проводили согласно следующей схеме (рисунок 2).



**Рисунок 2 – Схема синтеза флударабина 9**

При проведении ферментативного синтеза флударабина реакционную смесь, состоящую из арабинофуранозилурацила 5 и 2-фторадеина 8 в калий-фосфатном буфере (pH 7.0) в присутствии уридин- и пуридиннуклеозид-фосфорилаз инкубировали при 50 °С в течение 72 ч при постоянном перемешивании. В ходе реакции арабинофуранозилурацил 5 превращался в урацил 6 и рибозофосфат 7, который и вступал в реакцию взаимодействия с 2-фторадеином 8 с образованием флударабина 9. По окончании реакции к смеси добавляли дистиллированную воду, нагревали до 90 °С и оставляли охлаждаться при 4 °С для кристаллизации флударабина. Полученный осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из горячей воды. Кристаллический осадок флударабина 9 отфильтровывали, промывали на фильтре водой, этиловым спиртом и высушивали до постоянного веса. Выход флударабина 9 составлял 43 %.

**Синтез флударабинфосфата 12.** Синтез 2-F-araAMP 12 проводили согласно следующей схеме (рисунок 3).

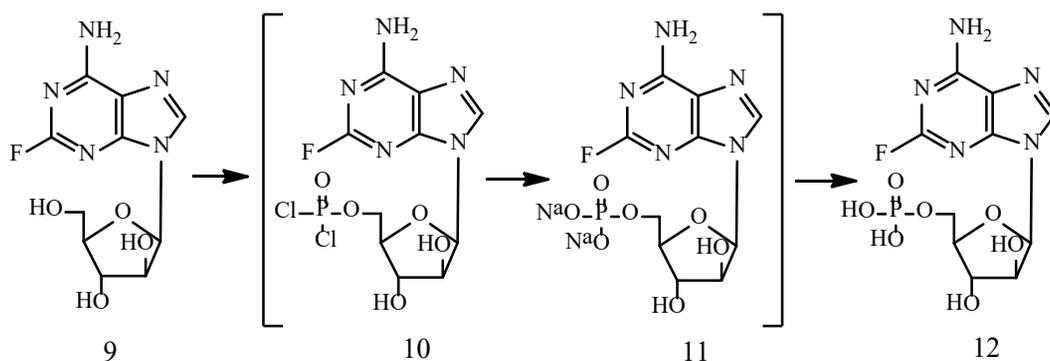


Рисунок 3 – Схема синтеза флударабинфосфата 12

К охлажденной до 0–4 °С смеси триметилфосфата и хлорокси фосфора добавляли флударабин 9 и перемешивали реакционную смесь в течение 1–2 ч. Затем реакционную смесь, содержащую фосфордихлоридат 10, выливали на колотый лед и к полученному раствору добавляли при перемешивании 10 М раствор гидроксида натрия до нейтральной реакции. Полученный раствор, содержащий натриевую соль флударабинфосфата 11, концентрировали в вакууме при температуре  $\leq 30$  °С до половины первоначального объема с помощью ротационного испарителя и наносили на термостатированную при 22–25 °С хроматографическую колонку, заполненную катионообменной смолой Дауэкс 50 W×8 (200–400 меш) в H<sup>+</sup>-форме. Колонку элюировали нагретой до 22–25 °С водой. Фракции, содержащие флударабинфосфат, собирали и помещали в холодильник на 18–20 ч. Выпавший осадок флударабинфосфата 12 отфильтровывали, промывали на фильтре водой, этиловым спиртом и высушивали до постоянного веса. Выход продукта составлял 70 %.

**Бактериальные культуры.** В работе использованы штаммы *Bacillus cereus* и *Proteus mirabilis*. Бактериальные колонии использованных в работе штаммов переносили в асептических условиях в 10 мл МПБ-содержащую коническую колбу с крышкой и инкубировали в течение 24 ч при 32 °С и 37 °С для *Bacillus cereus* и *Proteus mirabilis* соответственно. После 18–24 ч инкубации клетки центрифугировали при 6000 об/мин в течение 5 мин, надосадочную жидкость отбрасывали и клеточную фракцию ресуспендировали в фосфатном буфере (рН 7.4) с последующим центрифугированием. Далее регистрировали интенсивность поглощения при 600 нм (OD600) на спектрофотометре. Путем последовательных разведений добивались значений оптической плотности раствора в диапазоне от 0.15 до 0.2 OD600, который, как считается, содержит 108 клеток/мл. Далее полученную суспензию дополнительно разбавляли до получения концентрации 107 клеток/мл для тестирования активности исследуемых соединений.

**Определение жизнеспособности клеток.** Жизнеспособность бактериальных культур оценивали по уровню метаболизма резазурина в 96-луночных планшетах (Sarstedt, Германия) по методике [15]. Суспензию клеток объемом 10 мкл с добавленными модифицированными нуклеозидами и нуклеотидами в исследуемых концентрациях инкубировали аэробно в течение 24 ч, далее смешивали с 200 мкл резазурина в концентрации 20 мкмоль/л в фосфатном буфере (рН 7.4). После 60 мин инкубации определяли интенсивность флуоресценции резорурфина ( $\lambda_{ex} = 520$  нм,  $\lambda_{em} = 590$  нм) на планшетном ридере BioTek Instruments Inc. (США). Эффективность действия соединений для каждой концентрации оценивали в шестикратных повторах и рассчитывали среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Степень подавления клеточного роста рассчитывали как отношение значений интенсивности флуоресценции в лунках, содержащих нуклеозиды/нуклеотиды, по сравнению с контрольными лунками, не содержащими соединений.

### Определение внутриклеточного уровня активных форм кислорода (АФК).

Для определения уровня внутриклеточных АФК использовали зонд 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich, Великобритания), который используется для выявления широкого спектра АФК, включая оксид азота и перекись водорода [16]. Культуральную суспензию обрабатывали растворами исследуемых соединений в различной концентрации в присутствии DCFH-DA при конечной концентрации 5 мкм в 0,85 % физиологическом растворе и инкубировали при 37 °С аэробно в течение 24 ч. В качестве отрицательного контроля использовали бактериальные культуры без добавления исследуемых соединений. Уровень АФК определяли флуориметрически на приборе Tecan microtiter plate ( $\lambda_{ex} = 485$  нм и  $\lambda_{em} = 525$  нм). Эксперимент проводился в трех повторах.

**Статистический анализ.** Для построения моделей «доза – эффект» в настоящей работе использована лог-логистическая модель с четырьмя параметрами ( $b, c, d, e$ ) LL.4 библиотеки `glm` в среде статистических вычислений R (GraphPad Software, Inc.), которая имеет вид

$$\varphi(x) = c + \frac{d - c}{1 + e^{b(\log x - \log e)}}$$

Оцениваемые параметры моделей имеют вполне определенный физический смысл. В частности, для лог-логистической модели:

- параметры  $c$  и  $d$  определяют нижнюю и верхнюю горизонтальные асимптоты сигмоидной кривой;

- $e$  соответствует положению точки перегиба;

- $d$  – коэффициенту угла наклона в области переходного состояния.

Подгонка параметров моделей к анализируемым эмпирическим данным осуществлялась с использованием обобщенного метода минимизации суммы квадратов отклонений модельных прогнозов от наблюдаемых значений с учетом специально подбираемых весовых коэффициентов.

Статистический анализ оцениваемых параметров проводился с использованием  $t$ -критерия Стьюдента, с помощью которого проверялась гипотеза о равенстве каждого коэффициента нулю и рассчитывались  $p$ -значения, определяющие достигнутый уровень значимости. Проверка статистической значимости модели в целом осуществлялась путем ее сравнения с простой регрессией, имеющей нулевой коэффициент наклона (горизонтальная линия регрессии соответствует отсутствию зависимости «доза – эффект»).

**Результаты и обсуждение.** В работе проведена оценка влияния различных концентраций модифицированных нуклеозидов 2-фтор-арабинофуранозиладенина, 2-амино-6-хлор-арабинофуранозилпурина и нуклеотида 2-фтор-арабинофуранозиладенин монофосфата на жизнеспособность условно-патогенных бактериальных культур *B. cereus* (грамположительные) и *P. mirabilis* (грамотрицательные). Все изученные модифицированные пуриновые нуклеозиды/нуклеотиды показали дозозависимую ингибиторную активность по отношению к бактериальным культурам в экспоненциальной фазе их роста (рисунок 4).

Как видно из данных, представленных на рисунке 4, в диапазоне обозначенных концентраций ( $10^{-5}$ – $10^{-4}$  М) все исследованные соединения вызывают снижение жизнеспособности бактериальных культур. Характер кривых изменения жизнеспособности клеток в области концентраций ( $10^{-5}$ – $10^{-4}$  М) свидетельствует о том, что эффективность ингибирующего действия на рост клеток *B. cereus* снижается в ряду 2-F-araA > 2-NH<sub>2</sub>-6-Cl-araPur > 2-F-araAMP. Однако при рассмотрении рассчитанных для соединений значений ED<sub>50</sub> при их действии на клетки *B. cereus* видно, что ряд активности для соединений имеет обратный характер: (2-F-araAMP –  $5.5 \cdot 10^{-4}$  М) > (2-NH<sub>2</sub>-6-Cl-araPur –  $2.5 \cdot 10^{-3}$  М) > (2-F-araA –  $1.1 \cdot 10^{-3}$  М).

При действии тестируемых соединений в тех же концентрациях ( $10^{-5}$ – $10^{-4}$  М) на культуру клеток *P. mirabilis* ингибирующая активность соединений снижается в ряду 2-F-araAMP > 2-NH<sub>2</sub>-6-Cl-araPur > 2-F-araA. Если же рассматривать рассчитанные значения ED<sub>50</sub> для исследуемых соединений, то ряд ингибирующей активности приобретает следующий вид: (2-F-araA –  $3.8 \cdot 10^{-4}$  М) > (NH<sub>2</sub>-6-Cl-araPur –  $4.4 \cdot 10^{-4}$  М) > (2-F-araAMP –  $7.3 \cdot 10^{-4}$  М).

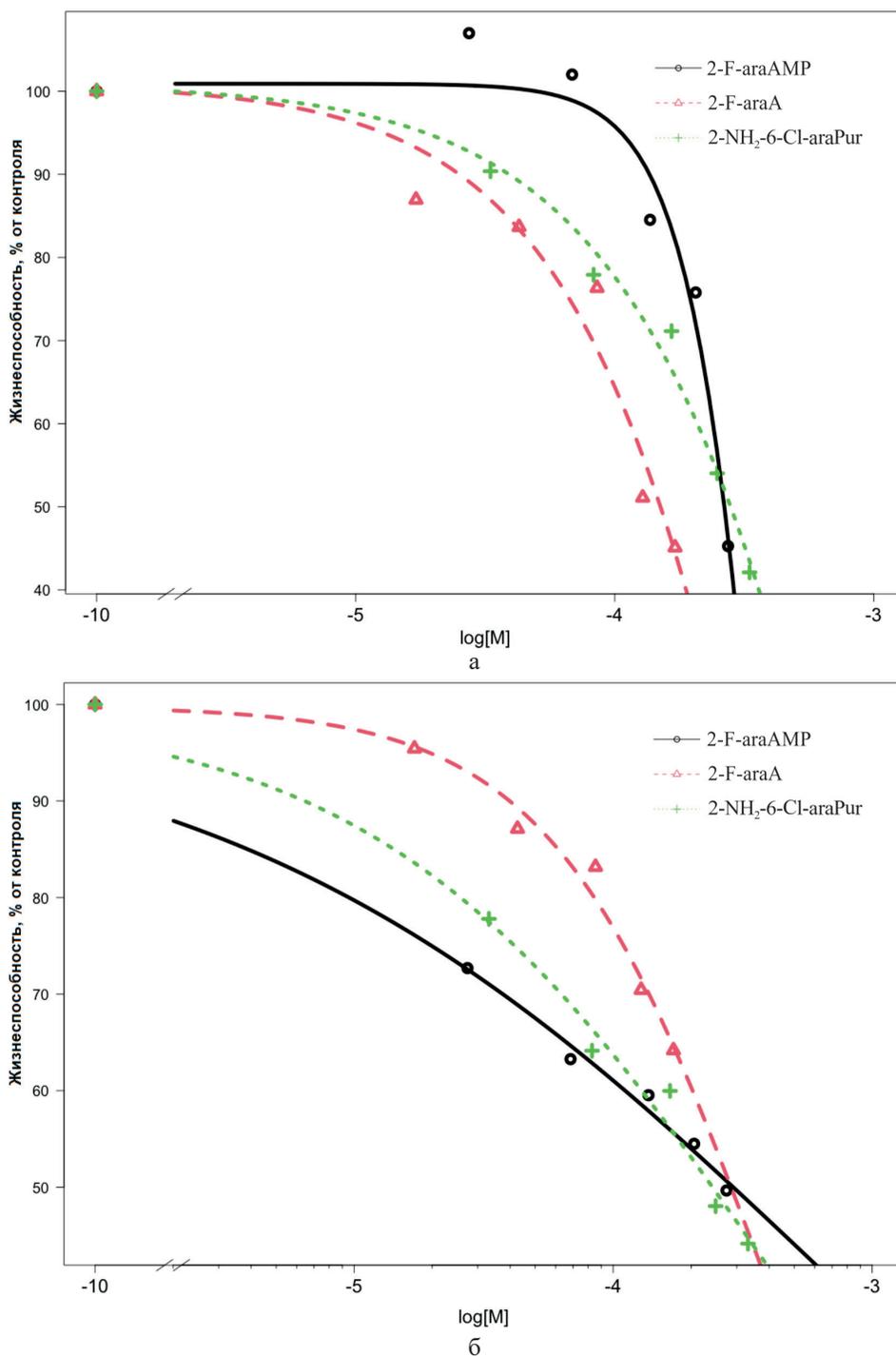


Рисунок 4 – Влияние различных концентраций 2-F-araA, 2-F-araAMP и 2-NH<sub>2</sub>-6-Cl-araPur на жизнеспособность клеток бактериальных культур *B. cereus* (а) и *P. mirabilis* (б)

Полученные данные позволяют предположить несколько большую чувствительность клеток *P. mirabilis* к низким концентрациям исследуемых соединений. При анализе ингибирующей активности соединений при их концентрации в районе  $10^{-3}$  М было обнаружено подавление роста клеток культуры *B. cereus* на 30–40 %, а для культуры клеток *P. mirabilis* – на 15–20 %, что свидетельствует о большей чувствительности клеток культуры *B. cereus* в отношении исследуемых соединений.

В работе также было изучено влияние синтезированных соединений на уровень АФК в бактериальных культурах. Известно, что в ряде случаев гибель бактериальных клеток является результатом повышения уровня АФК под действием антибактериальных препаратов. Повышенное содержание АФК может приводить к повреждению железосерных кластеров, высвобождая тем самым ионы железа  $Fe^{2+}$ , которые далее вступают в реакцию с перекисью водорода (реакция Фентона). В этом случае активируется цепной процесс образования гидроксильных радикалов, которые могут непосредственно повреждать внутриклеточную ДНК, липиды и белки.

Для проверки возможности существования описанного механизма антибактериального действия, бактериальные культуры *B. cereus* и *P. mirabilis* культивировали в присутствии изучаемых соединений в тех же концентрациях и DCFH-DA в качестве неспецифического зонда для определения уровня АФК. Показано, что уровень АФК многократно возрастал во всех бактериальных культурах при их культивировании со всеми изученными соединениями (рисунок 5).

Из данных, представленных на рисунке 5, можно сделать ряд заключений. Во-первых, флударабин оказался наиболее эффективным соединением в повышении уровня АФК при его действии на обе бактериальные культуры клеток. Во-вторых, флударабин во всех изученных концентрациях более эффективно повышал уровень АФК при действии на грамположительные клетки культуры *B. cereus*. В-третьих, для обеих бактериальных культур для всех изученных соединений экспоненциальный рост уровней АФК регистрировался после достижения 0,1 мкМ концентраций, что коррелирует со значениями  $ED_{50}$ , рассчитанными на основании экспериментальных данных по ингибированию клеточного роста. В-четвертых, из всех исследованных соединений наименьшей активирующей повышение уровня АФК активностью в случае культуры *B. cereus* обладал флударабинфосфат, а в случае культуры *P. mirabilis* – 2-амино-6-хлор-арабинофуранозилпурин.

По совокупности полученных результатов можно предположить, что усиленная выработка АФК оказывает косвенное влияние на рост штаммов изученных бактерий.

Внешняя липополисахаридная оболочка (ЛПС), присущая грамотрицательным бактериальным культурам, обеспечивает защиту от токсического воздействия экзогенных агентов. Указанная способность позволяет бактериям выживать в неблагоприятной для них внешней среде. Ранее было показано, что ЛПС представляет собой физический или химический барьер на пути различных повреждающих агентов, в том числе и активных форм кислорода [17]. Как следствие, те бактериальные штаммы, которые не продуцируют ЛПС, проявляют большую чувствительность к экзогенным АФК, чем штаммы, сохраняющие эту способность.

У большинства грамположительных бактерий отсутствует структура, аналогичная липополисахаридной оболочке грамотрицательных штаммов. Выполняя роль физического барьера, эта внешняя клеточная оболочка может также выступать в роли химической ловушки АФК, причиной чего являются входящие в ее состав ненасыщенные жирные кислоты и белки, которые, как известно, являются соединениями, активно реагирующими с АФК [18].

Следует, однако, отметить, ЛПС грамотрицательных бактерий не представляет собой жизненно важных мишеней для летального действия АФК, поскольку их можно удалить, не убивая клетки (образование сферопластов). Поскольку структура клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий представляет собой фундаментальное различие между этими клетками, как только АФК пересекают барьер, можно ожидать, что мишени и механизмы уничтожения клеток как для грамположительных, так и для грамотрицательных бактерий будут схожими или идентичными.

Полученные результаты показали, что как грамотрицательные (*P. mirabilis*), так и грамположительные (*B. cereus*) штаммы бактерий оказались чувствительными к воздействию таких модифицированных пуриновых нуклеозидов, как 2-фтор-арабинофуранозиладенин, 2-амино-6-хлор-арабинофуранозилпурин и нуклеотида 2-фтор-арабинофуранозиладенинмонофосфат. Кроме того, эти результаты свидетельствуют о наличии структурно-функциональных взаимосвязей в ряду исследованных модифицированных пуриновых арабинозидов и их биологической активностью.

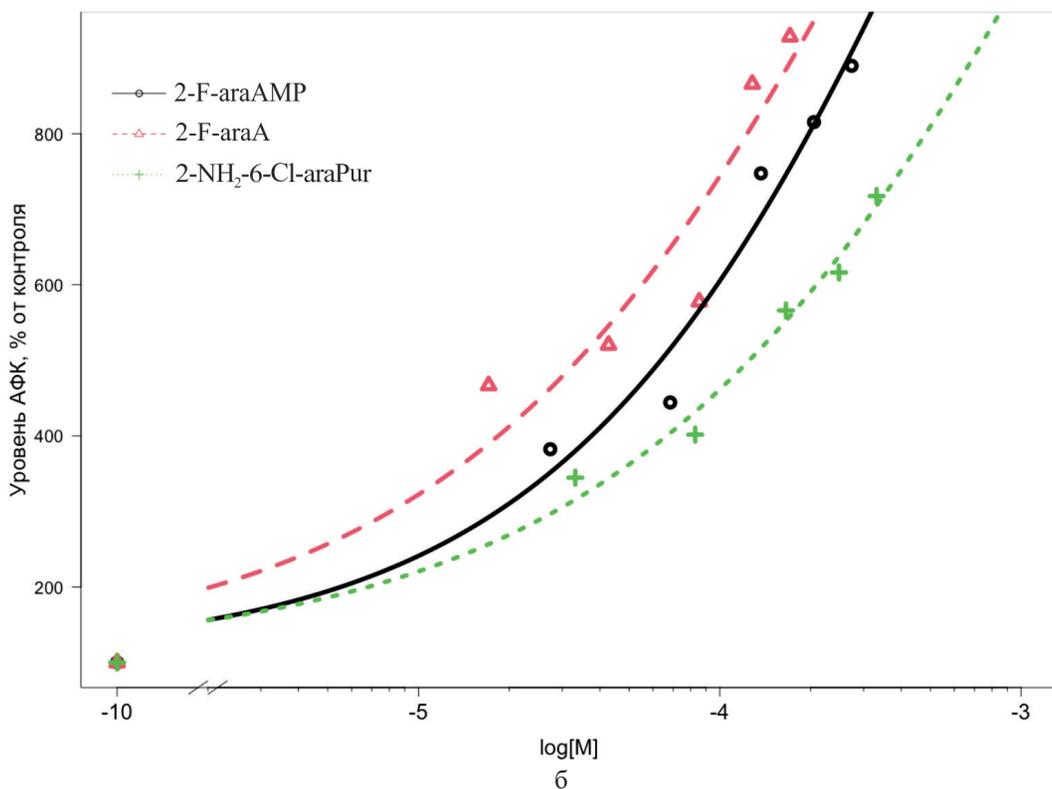
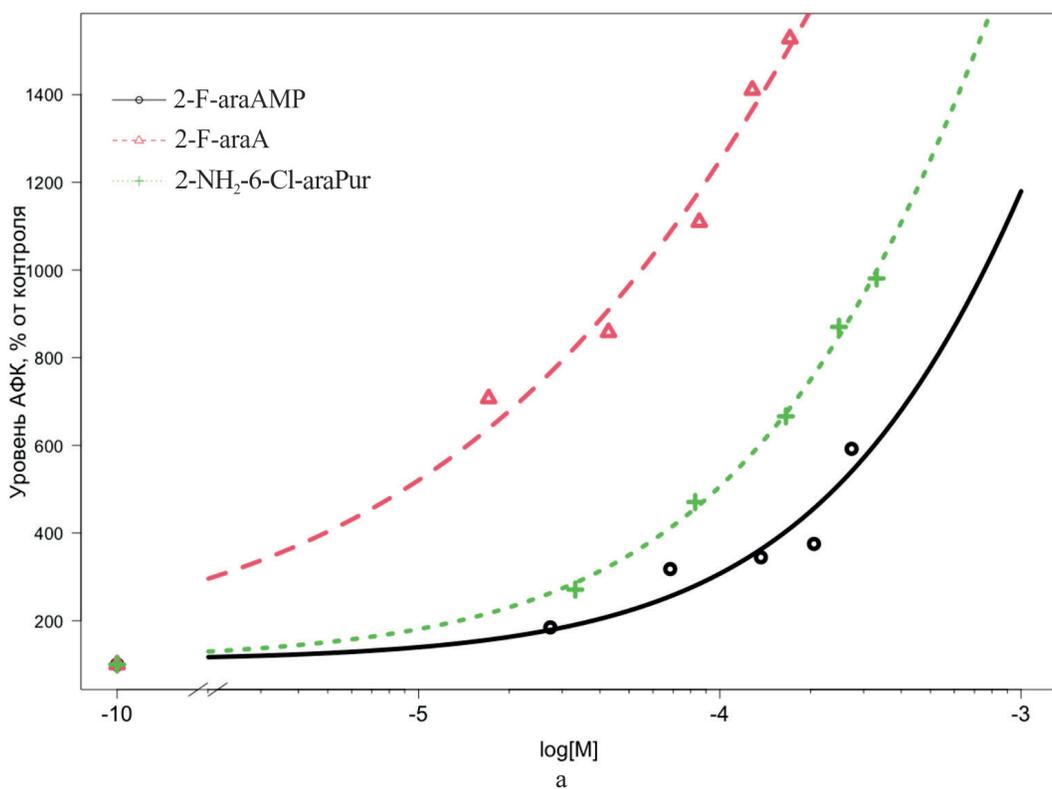


Рисунок 5 – Влияние различных концентраций 2-F-araA, 2-F-araAMP и 2-NH<sub>2</sub>-6-Cl-araPur на внутриклеточный уровень АФК в бактериальных культурах *B. cereus* (а) и *P. mirabilis* (б)

В работе показано, что продукция АФК в штаммах бактерий усиливалась дозозависимым образом при культивировании бактериальных клеток в присутствии всех изученных соединений. Наибольшее повышение уровня АФК было обнаружено при культивировании бактериальных культур в присутствии флударабина, что, однако, не совсем коррелирует с его эффектом в ингибировании роста бактериальных клеток.

**Заключение.** В работе показано, что модифицированные пуриновые нуклеозиды 2-фтор-арабинофуранозиладенин, 2-амино-6-хлор-арабинофуранозилпурин и нуклеотид 2-фтор-арабинофуранозиладенинмонофосфат являются эффективными ингибиторами роста как грамотрицательных (*P. mirabilis*), так и грамположительных (*B. cereus*) бактерий. 2-F-araA, 2-NH<sub>2</sub>-6-Cl-araPur и 2-F-araAMP также способны усиливать выработку внутриклеточных АФК. Более эффективным соединением, способным стимулировать процесс окислительного стресса путем усиления продукции АФК, а также подавлять рост клеток бактериальных культур, можно считать флударабинфосфат.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nathan, C. Antibiotic resistance-problems, progress, and prospects / C. Nathan, O. Cars // The New England journal of medicine. – 2014. – Vol. 371, No. 19. – P. 1761–1763.
2. Nathan, C. Antibiotics at the crossroads / C. Nathan // Nature. – 2004. – Vol. 431 (7011). – P. 899–902.
3. Davies, J. Origins and evolution of antibiotic resistance / J. Davies, D. Davies // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2010. – Vol. 74, issue 3. – P. 417–433.
4. Global trends in antimicrobial use in food animals / T. P. van Boeckel [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2015. – Vol. 112, No. 18. – P. 5649–5654.
5. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention / I. Roca [et al.] // New microbes and new infections. – 2015. – Vol. 6. – P. 22–29.
6. Update on the antibiotic resistance crisis / G. M. Rossolini [et al.] // Current opinion in pharmacology. – 2014. – Vol. 18. – P. 56–60.
7. Michael, C. A. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management / C. A. Michael, D. Dominey-Howes, M. Labbate // Frontiers in public health. – 2014. – Vol. 2. – 145 p.
8. Spellberg, B. New societal approaches to empowering antibiotic stewardship / B. Spellberg, A. Srinivasan, H. F. Chambers // Journal of the American Medical Association. – 2016. – Vol. 315, issue 12. – P. 1229–1230.
9. Strategies for achieving global collective action on antimicrobial resistance / S. J. Hoffman [et al.] // Bulletin of the World Health Organization. – 2015. – Vol. 93, No. 12. – P. 867–876.
10. Time for a change: addressing R&D and commercialization challenges for antibacterials / D. J. Payne [et al.] // Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences. – 2015. – Vol. 370, issue 1670. – P. 20–86.
11. Luepke, K. H. The antibiotic pipeline: reviving research and development and speeding drugs to market / K. H. Luepke, J. F. Mohr // Expert review of anti-infective therapy. – 2017. – Vol. 15, issue 5. – P. 425–433.
12. Landers, T. Is the Presidential Advisory Council on Combating Antibiotic Resistance missing opportunities / T. Landers, K. T. Kavanagh // American journal of infection control. – 2016. – Vol. 44, No. 11. – P. 1356–1359.
13. Ventola, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats / C. L. Venola // P & T: Pharmacy and therapeutics. – 2015. – Vol. 40, issue 4. – P. 277–283.
14. Koszytkowska-Stawińska, M. Multicomponent reactions in nucleoside chemistry / M. Koszytkowska-Stawińska, W. Buchowicz // Beilstein journal of organic chemistry. – 2014. – Vol. 10. – P. 1706–1732.
15. Resazurin assay for assessment of antimicrobial properties of electrospun nanofiber filtration membranes / E. Travnickova [et al.] // AMB Express. – 2019. – Vol. 9. – 183 p.
16. 4-Case studies of fluorine in drug discovery / Xing Li [et al.] // Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals / Eds. : G. Haufe, F. R. Leroux. – Cambridge : Academic Press, 2019. – P. 181–211.
17. Permeability of lipopolysaccharide-deficient (rough) mutants of *Salmonella typhimurium* to antibiotics, lysozyme, and other agents / K. E. Sanderson [et al.] // Canadian journal of microbiology. – 1974. – Vol. 20, No. 8. – P. 1135–1145.
18. Dahl, T. A. Pure singlet oxygen cytotoxicity for bacteria / T. A. Dahl, W. R. Midden, P. E. Hartman // Photochemistry and photobiology. – 1987. – Vol. 46, issue 3. – P. 345–352.

## Estimation of antibacterial activity of modified purine arabinosides

A. A. Shihad<sup>1</sup>, M. A. Khanchevski<sup>2</sup>, A. G. Sysa<sup>3</sup>, E. R. Gritskevitch<sup>4</sup>, E. I. Kvasiuk<sup>5</sup>

<sup>1</sup> International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (Belarus)  
Dolgobrodskaya St., 23/1, 220070, Minsk, Belarus; e-mail: arshedalmnasori@gmail.com

<sup>2</sup> International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (Belarus)  
Dolgobrodskaya St., 23/1, 220070, Minsk, Belarus; e-mail: maks.khanchevskiy@bk.ru

<sup>3</sup> International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (Belarus)  
Dolgobrodskaya St., 23/1, 220070, Minsk, Belarus; e-mail: aliaksei.sysa@iseu.by

<sup>4</sup> International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (Belarus)  
Dolgobrodskaya St., 23/1, 220070, Minsk, Belarus; e-mail: gritskevitch@mail.ru

<sup>5</sup> International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University (Belarus)  
Dolgobrodskaya St., 23/1, 220070, Minsk, Belarus; e-mail: ekvasyuk@inbox.ru

**Abstract.** The introduction indicates the object of study – nucleosides, which are a large family of natural and chemically modified analogs, characterized by a huge structural diversity. It is shown that after the start of systematic research, a number of leading structures of great biological and medical importance were discovered. Therefore, studies of the potential antibacterial activity of new nucleoside derivatives are extremely relevant, especially in the era of the rapid development of antibiotic resistance and the urgent need to search for new drugs alternative to traditional antibiotics. The aim of the study is to evaluate the effect of modified nucleosides 2-fluoro-arabinofuranosyladenine (fludarabine), 2-amino-6-chloro-arabinofuranosylpurine (2-NH<sub>2</sub>-6-Cl-araPur) and the nucleotide 2-fluoro-arabinofuranosyladenine monophosphate (fludarabine phosphate) on opportunistic pathogens bacterial cultures of *B. cereus* and *P. mirabilis*. In the main part, quantitative characteristics of the antiproliferative activity of the studied compounds in relation to opportunistic bacterial cultures *B. cereus* and *P. mirabilis* were obtained, and the effect of the synthesized compounds on the level of reactive oxygen species (ROS) in bacterial cultures was also studied. The methods used to assess the severity of oxidative stress, analysis the viability of cell cultures, and build statistical “dose-effect” models are indicated. It was found that all the studied modified purine nucleosides/nucleotides showed dose-dependent inhibitory activity against bacterial cultures in the exponential phase of their growth. It was shown that ROS production in bacterial strains increased in a dose-dependent manner when bacterial cells were cultivated in the presence of all the studied compounds. Based on the totality of the results obtained, it can be assumed that increased production of ROS has an inhibitory effect on the growth of strains of bacteria used in the work. The parameters of the log-logistic “dose-effect” models were calculated and their statistical significance was assessed. The results obtained can be used to create drugs for the treatment of infectious diseases.

**Keywords:** antibacterial activity, modified nucleosides, fludarabine, reactive oxygen species, log-logistic model.

## References

1. Nathan C., Cars O. Antibiotic resistance-problems, progress, and prospects. *The New England journal of medicine*, 2014, vol. 371, No. 19, pp. 1761-1763.
2. Nathan C. Antibiotics at the crossroads. *Nature*, 2004, vol. 431 (7011), pp. 899-902.
3. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, vol. 74, issue 3, pp. 417-433.
4. Boeckel van T. P. [et al.]. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, vol. 112, No. 18, pp. 5649-5654.
5. Roca I. [et al.]. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New microbes and new infections*. 2015, vol. 6, pp. 22-29.
6. Rossolini G. M. [et al.]. Update on the antibiotic resistance crisis. *Current opinion in pharmacology*, 2014, vol. 18, pp. 56-60.
7. Michael C. A., Dominey-Howes D., Labbate M. The antimicrobial resistance crisis: causes, consequences, and management. *Frontiers in public health*, 2014, vol. 2, p. 145.
8. Spellberg B., Srinivasan A., Chambers H. F. New societal approaches to empowering antibiotic stewardship. *Journal of the American Medical Association*, 2016, vol. 315, issue 12, pp. 1229-1230.
9. Hoffman S. J. [et al.]. Strategies for achieving global collective action on antimicrobial resistance. *Bulletin of the World Health Organization*, 2015, vol. 93, No. 12, pp. 867-876.

- 
10. Payne D. J. [et al.]. Time for a change: addressing R&D and commercialization challenges for antibacterials. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 2015, vol. 370, issue 1670, pp. 20-86.
11. Luepke K. H., Mohr J. F. The antibiotic pipeline: reviving research and development and speeding drugs to market. *Expert review of anti-infective therapy*, 2017, vol. 15, issue 5, pp. 425-433.
12. Landers T., Kavanagh K. T. Is the Presidential Advisory Council on Combating Antibiotic Resistance missing opportunities? *American journal of infection control*, 2016, vol. 44, No. 11, pp. 1356-1359.
13. Ventola C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: Pharmacy and therapeutics*, 2015, vol. 40, issue 4, pp. 277-283.
14. Koszytkowska-Stawińska M., Buchowicz W. Multicomponent reactions in nucleoside chemistry. *Beilstein journal of organic chemistry*, 2014, vol. 10, pp. 1706-1732.
15. Travnickova E. [et al.]. Resazurin assay for assessment of antimicrobial properties of electrospun nanofiber filtration membranes. *AMB Express*, 2019, vol. 9, 183 p.
16. Xing Li [et al.]. 4-Case studies of fluorine in drug discovery. *Fluorine in Life Sciences: Pharmaceuticals, Medicinal Diagnostics, and Agrochemicals*; Eds.: G. Haufe, F. R. Leroux. Cambridge, 2019, pp. 181-211.
17. Sanderson K. E. [et al.] Permeability of lipopolysaccharide-deficient (rough) mutants of *Salmonella typhimurium* to antibiotics, lysozyme, and other agents. *Canadian journal of microbiology*, 1974, vol. 20, No. 8, pp. 1135-1145.
18. Dahl T. A., Midden W. R., Hartman P. E. Pure singlet oxygen cytotoxicity for bacteria. *Photochemistry and photobiology*, 1987, vol. 46, issue 3, pp. 345-352.



*Уважаемые авторы!*

*Более подробно требования к оформлению материалов, а также условия для принятия материалов см. на сайте журнала*

<http://vesnik.grsu.by>

---

\* Авторы выражают благодарность Белорусскому республиканскому фонду фундаментальных исследований (грант № M20MC-043) за финансовую поддержку проведенных исследований.