

## Изучение антимикотической активности перспективных соединений ряда серебряных солей пирролопиразолов

В.В. Новикова, В.Л. Гейн, О.В. Бобровская

ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, Пермь

Контактная информация: к.ф.н. Новикова Валентина Васильевна, vnperm@yandex.ru

---

Ввиду наличия стабильной тенденции к прогрессированию резистентности наиболее значимых патогенов к антимикотическим средствам, а также проблемы импортозамещения, разработка новых отечественных противогрибковых препаратов является приоритетным направлением фармации и медицины. Исследована противогрибковая активность пяти перспективных соединений ряда серебряных солей пирролопиразолов, содержащих сульфаниламидный фрагмент, в отношении 40 клинических штаммов *C. albicans*. Выявлено два наиболее активных соединения, представляющих интерес для дальнейшего исследования и выявления фармакофорных групп.

**Ключевые слова:** противогрибковая активность, серебряные соли, *Candida albicans*.

---

### Введение

Значительный рост грибковых заболеваний связан с различными факторами – в частности, с широким применением в медицинской практике антибиотиков, увеличением количества людей, страдающих иммунодефицитами, особенно среди детей. Одной из глобальных причин являются техногенные воздействия на современные экосистемы, на биоценоз человека, что приводит к возрастанию значимости условно-патогенных микроорганизмов как этиологических факторов инфекционных процессов [2].

В структуре поверхностных микозов, как правило, преобладают кандидоз слизистых оболочек, а также дерматофитии [12, 14]. Клинико-эпидемиологический анализ данной патологии в Пермском крае [6] позволяет утверждать о значимости микромицетов как этиологических факторов поверхностных микозов.

Устойчивость грибов к антимикоти-

тикам имеет стабильную тенденцию к прогрессированию [8, 11, 13]. Селекция резистентных штаммов грибов происходит вследствие необоснованного применения противогрибковых средств, длительного использования отдельных препаратов в схеме лечения микозов.

Грибы рода *Candida* являются наиболее частой этиологической причиной поверхностных форм грибковой инфекции, сопровождающейся поражением слизистых оболочек [1, 4, 11, 13, 14]. Преобладающим видом (76,1-86% случаев) традиционно является *Candida albicans*.

С учетом современной экономической и политической ситуации, приведшей к значимым экономическим ограничениям, когда количество импортных лекарственных препаратов на российском рынке превышает 70%, а с учетом субстанций действующих веществ – 90%, остро встает вопрос об импор-

тозамещении, создании отечественных конкурентоспособных лекарственных препаратов [5]. Однако, несмотря на это, ситуация с введением в практику новых препаратов данной группы год от года ухудшается: из 184-х препаратов, зарегистрированных за последние пять лет ведомством FDA (Food and Drug Administration), только 12% были противомикробными препаратами. Факторами, ограничивающими изыскание и внедрение в практику противомикробных и, в частности, антимикотических средств, являются высокая стоимость разработки и вывода на рынок нового препарата, короткий курс приема противомикробных препаратов. В связи с указанными причинами разработка новых противогрибковых препаратов является важным и приоритетным направлением. Полученные нами ранее результаты [10] свидетельствуют о перспективности поиска эффективного антимикотического средства среди серебряных солей гетероциклических соединений.

**Цель исследования** – изучить чувствительность клинических изолятов *C. albicans* к пяти перспективным соединениям ряда серебряных солей пирролопиразолов, содержащих сульфаниламидный фрагмент, проявившим высокую антимикотическую активность в отношении типовых штаммов.

### Материалы и методы

Исследована противогрибковая активность в отношении 40-ка штаммов *C. albicans*, выделенных от пациентов многопрофильных клиник (поликлиники и стационары) г. Перми (биосубстрат – отделяемое влагалища: 20 штаммов, слизь из зева и носа: 20 штаммов), име-

ющих различный профиль чувствительности к антимикотическим препаратам.

Исследование противогрибковой активности соединений, проявивших высокую антимикотическую активность в отношении типовых штаммов *C. albicans* 885-653 и *C. albicans* 10231 (минимальная подавляющая концентрация – МПК 2-7,8 мкг/мл), проводили микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой среде (в 96-луночных планшетах) [7, 9], чувствительность каждого из штаммов определяли в двух повторях. Концентрация микробных клеток в опыте составила  $2-5 \times 10^4$  КОЕ/мл. В качестве положительного контроля использовали питательную среду без противогрибкового препарата с внесенной исследуемой культурой, качество среды контролировали с использованием референтных штаммов. В качестве отрицательного контроля использовали интактную питательную среду. Планшеты инкубировали в термостате при температуре  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Оценку роста культур проводили визуально при 40-48 и 70-72 ч инкубирования, в соответствии с рекомендациями Руководства [9]. В качестве значения МПК принимали концентрацию препарата в последней прозрачной лунке серии разведения. Полученные первичные результаты обрабатывали с использованием стандартных статистических методов, усредняя результаты, полученные в двух повторях. В качестве препарата сравнения использовали применяемый в медицинской практике флуконазол.

### Результаты и их обсуждение

Изучена противогрибковая активность 14-ти соединений ряда пирролопиразолов, содержащих сульфанила-

мидный фрагмент, из них выявлено 5 перспективных веществ, содержащих ион серебра, подвергшихся углубленному исследованию. МПК изученных соединений в отношении клинических изолятов *C. albicans* составляет 1-32 мкг/мл и более. Полученные результаты представлены в таблице.

Популяция чувствительных штаммов часто является разнородной. При этом важное значение имеет распределение по показателям МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> (рис. 1). Установлено, что все изученные соеди-

нения, кроме 97, имеют одинаковые показатели МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> в отношении исследованных штаммов *C. albicans*.

В соответствии с руководством EUCAST (The European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing), для признания штамма *C. albicans* чувствительным к флуконазолу МПК этого препарата не должна превышать 2 мкг/мл, а в случае, если МПК флуконазола превышает 4 мкг/мл, штамм *C. albicans* считается резистентным. В соответствии с критериями CLSI (Clinical and

Таблица

Чувствительность клинических изолятов *C. albicans* к изучаемым соединениям

| МПК, мкг/мл/<br>номер соединения | Количество изолятов <i>C. albicans</i> , имеющих соответствующую МПК |    |    |    |    |            |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|------------|
|                                  | 90                                                                   | 92 | 95 | 97 | 99 | флуконазол |
| 0,5                              | 0                                                                    | 0  | 0  | 0  | 0  | 6          |
| 1                                | 2                                                                    | 0  | 3  | 2  | 2  | 2          |
| 2                                | 8                                                                    | 0  | 7  | 7  | 1  | 3          |
| 4                                | 8                                                                    | 16 | 6  | 7  | 10 | 5          |
| 8                                | 13                                                                   | 15 | 14 | 8  | 16 | 6          |
| 16                               | 6                                                                    | 9  | 6  | 9  | 6  | 2          |
| 32                               | 3                                                                    | 0  | 4  | 7  | 1  | 2          |
| ≥32                              | 0                                                                    | 0  | 0  | 0  | 4  | 0          |

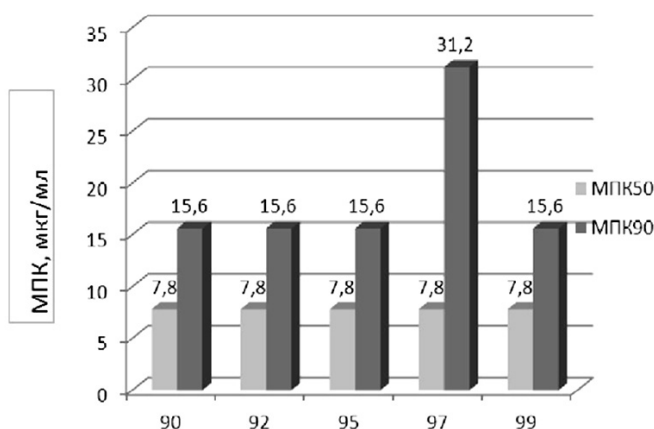


Рис. 1. МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> изучаемых соединений в отношении штаммов *C. albicans*.

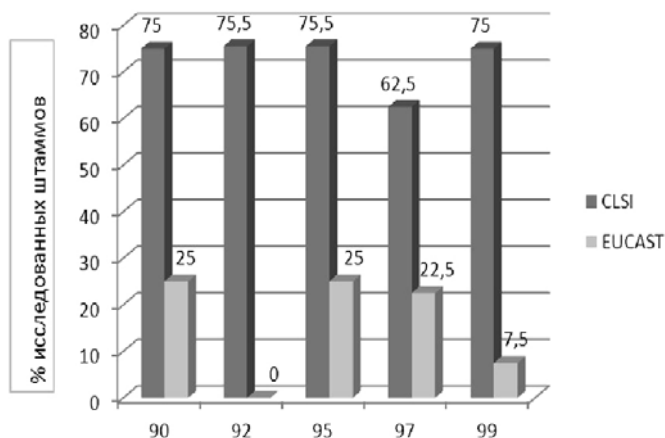


Рис. 2. Чувствительность штаммов *C. albicans* к изучаемым соединениям.

Laboratory Standards Institute), чувствительными к флуконазолу являются штаммы с МПК в диапазоне  $\leq 8$  мкг/мл [3]. Данные по чувствительности штаммов *Candida* spp. к изучаемым соединениям представлены на рис. 2.

Таким образом, наиболее перспективными – как по критериям EUCAST, так и CLSI – являются соединения 90, 95 (чувствительны 25% и 75,5% штаммов соответственно).

Острая токсичность этих веществ – LD<sub>50</sub> превышает 1200 мг/кг, соединения относятся к классу практически нетоксичных.

## Выводы

Выявлены 2 соединения ряда серебряных солей пирролопиразолов, содержащих сульфаниламидный фрагмент, представляющие интерес для дальнейшего изучения возможной модификации химической структуры, приводящей к усилению противогрибковой активности, выявления фармакофорных групп и исследования механизма их действия.

## Список литературы

1. Анкирская А.С., Муравьёва В.В., Фурсова С.А. и др. Мониторинг видового состава и чувствительности к антимикотикам дрожжеподобных грибов, выделенных из влагалища женщин репродуктивного возраста // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2006. Т. 8. № 1. С. 87-95.
2. Бухарин О.В., Усвятцов Б.Я., Хлопко Ю.А. Структурно-функциональная характеристика микросимбиоза человека // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2009. № 4. С. 4-8.
3. Веселов А.В., Козлов Р.С. Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. 2016. Т. 18. № 2. 105 с.
4. Веселов А.В., Мултых И.Г., Клясова Г.А. и др. Эпидемиология возбудителей кандидозов и их чувствительность к азолам: результаты исследования ARTEMIS Disk в России // Клини. микробиол. и антимикроб. химиотерапия. 2005. Т. 7. № 1. С. 68-76.
5. Зубов П.В., Новикова В.В. Разработка новых антибактериальных препаратов: проблемы и перспективы // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 5. С. 342.
6. Новикова В.В., Кучевасова М.В., Коломойцев А.В. Структура дерматомикозов в Пермском крае: клинико-эпидемиологический анализ // Современные проблемы науки и образования. 2016. № 2. С. 30.

7. Определение чувствительности к микроорганйзмов к антибактериальным препаратам: методические указания / МУК 4.2.1890-04. Утв. 04.03.2004.
8. **Решедько Г.К., Козлов Р.С.** Состояние резистентности к антиинфекционным препаратам в России: Практик. Рук-во по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Стречунского Л.С., Белоусова Ю.Б., Козлова С.Н. – М.: РЦ «Фармединфо». 2007.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. – М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
10. **Ухов С.В., Коньшин М.Е., Новикова В.В. и др.** Синтез и противомикробная активность серебряных солей замещенных амидов 2-иминокумарин-3-карбо-новой кислоты // Химико-фармацевтический журнал. 2004. № 4. С. 15-16.
11. **Cardo D., Horan T., Andrus M., et al.** National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. A report from the NNIS System // J. Infect. control. 2004. Vol. 32. P. 470-85.
12. **Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M.** Epidemiological trends in skin mycoses worldwide // Mycoses. 2008. Vol. 51. No. 4. P. 2-15.
13. **Marchaim D., Lemanek L., Bheemreddy S., Kaye K., Sobel J.** Fluconazole-Resistant Candida albicans Vulvovaginitis // Obstetrics & Gynecology. 2012. Vol. 120. Issue 6. P. 1407-1414. doi: <http://10.1097/AOG.0b013e31827307b2>.
14. **Ungpakorn R.** Nondermatophyte infections of the skin and nails: Implications for therapy // Abstracts of The 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. 2009. Tokyo. 224 p.

## References

1. **Ankirskaia A.S., Murav'jova V.V., Fursova S.A. i dr.** Monitoring vidovogo sostava i chuvstvitel'nosti k antimikotikam drozhzhopodobnyh gribov, vydelennyh iz vlagalishha zhenshhin reproduktivnogo vozrasta // Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. 2006. T. 8. № 1. S. 87-95.
2. **Buharin O.V., Usvjacov B.Ja., Hlopko Ju.A.** Strukturno-funkcional'naja harakteristika mikrosimbiocezoza cheloveka // Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunologii. 2009. № 4. S. 4-8.
3. **Veselov A.V., Kozlov R.S.** Invazivnyj kandidoz: sovremennye aspekty jepidemiologii,

- diagnostiki, terapii i profilaktiki u razlichnyh kategorij pacientov // Klin. mikrobiol. antimikrob. himioter. 2016. T. 18. № 2. 105 s.
4. **Veselov A.V., Mulyh I.G., Kljasova G.A. i dr.** Jepidemiologija vozбудitelej kandidozov i ih chuvstvitel'nost' k azolam: rezul'taty issledovanija ARTEMIS Disk v Rossii //Klin. mikrobiol. i antimikrob. himioterapija. 2005. T. 7. № 1. S. 68-76.
5. **Zubov P.V., Novikova V.V.** Razrabotka novyh antibakterial'nyh preparatov: problemy i perspektivy // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija. 2015. № 5. S. 342.
6. **Novikova V.V., Kuchevasova M.V., Kolomojcev A.V.** Struktura dermatomikozov v Permskom krae: kliniko-jepidemiologicheskij analiz // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija. 2016. № 2. S. 30.
7. **Opreделениеchuvstvitel'nostik mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam: metodicheskie ukazaniya / МУК 4.2.1890-04. Утв. 04.03.2004.**
8. **Reshed'ko G.K., Kozlov R.S.** Sostojanie rezistentnosti k antiinfekcionnym preparatam v Rossii: Prakt. Ruk-vo po antiinfekcionnoj himioterapii / Pod red. Strachunskogo L.S., Belousova Ju.B., Kozlova S.N. – М.: RC «Фармединфо». 2007.
9. Рукководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. – М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
10. **Uhov S.V., Kon'shin M.E., Novikova V.V. i dr.** Sintez i protivomikrobnaja aktivnost' serebrjanyh solej zameshennyh amidov 2-iminokumarin-3-karbo-novoj kisloty // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. 2004. № 4. S. 15-16.
11. **Cardo D., Horan T., Andrus M., et al.** National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. A report from the NNIS System // J. Infect. control. 2004. Vol. 32. P. 470-85.
12. **Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M.** Epidemiological trends in skin mycoses worldwide // Mycoses. 2008. Vol. 51. No. 4. P. 2-15.
13. **Marchaim D., Lemanek L., Bheemreddy S., Kaye K., Sobel J.** Fluconazole-Resistant Candida albicans Vulvovaginitis // Obstetrics & Gynecology. 2012. Vol. 120. Issue 6. P. 1407-1414. doi: <http://10.1097/AOG.0b013e31827307b2>.
14. **Ungpakorn R.** Nondermatophyte infections of the skin and nails: Implications for therapy // Abstracts of The 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. 2009. Tokyo. 224 p.

## The study of the antimycotic activity of promising compounds of silver salts pyrrolopyrazole

V.V. Novikova, V.L. Gein, O.V. Bobrovskaya

Due to the presence of a stable tendency to progression of resistance of most significant pathogens to antifungal drugs, and also the problems of import substitution, development of new locally produced antifungal drugs is a priority direction of pharmacy and medicine. Antimycotic activity of 5 perspective compounds of silver salts pyrrolopyrazole containing sulfa fragment, against 40 clinical strains of *C. albicans* was investigated. Two most active compounds interesting for further study and identification of pharmacophore groups were identified.

**Key words:** antifungal activity, silver salts, *Candida albicans*.