

МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 547 587.51:577.15/17

В.Ю. Євсюкова, І.Д. Андреева, В.В. Казмірчук

АНТИФУНГАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ 7-АЗАКУМАРИНІВ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМНУ» (м. Харків)

Дане дослідження має зв'язок із виконанням науково-дослідної роботи АМН 81/2008 – 2010, № держреєстрації 0108U001293. Виявлена нами у попередніх дослідженнях [11] за результатами первинного мікробіологічного скринінгу 54 похідних 7-азакумаринів висока протигрибкова активність 82 % досліджених сполук стала підставою для подальшого поглибленого дослідження їх протигрибкової активності.

Вступ. У останні десятиліття в Україні, як і в більшості країн світу, захворюваність на інфекційні захворювання залишається на високому рівні і боротьба з ними є одним із пріоритетних напрямків охорони здоров'я [13]. В Україні мікотична патологія займає провідне місце в структурі інфекційної захворюваності [1, 5, 7, 8].

Захворюваність на кандидоз зростає в усьому світі, і це пов'язано з широким застосуванням антибактеріальних препаратів, гормональних засобів, цитостатиків, що створюють сприятливий фон для розвитку захворювання [1, 6]. На сьогоднішній день більш 20 % населення є носіями дріжджеподібного гриба [7, 8].

За даними Національного комітету США з контролю за внутрішньолікарняними інфекціями (NNIS) за останнє десятиліття частота нозокоміальних мікозів збільшилася в 2,5 рази, а частота кандидемії зросла в 5 разів. За повідомленням NNIS, гриби роду *Candida* знаходяться на 4-м місці серед патогенів, які найбільш часто виділяються з крові, і складають 10 % усіх позитивних посівів крові. Встановлено, що розвиток кандидемії супроводжується підвищенням вірогідності летального наслідку в 2,9 рази [13].

Різні види дріжджеподібних грибів викликають до 4 % хірургічної патології, 13 % захворювань сечовивідного тракту. Серед новонароджених частота захворювань збільшилася за останні 20 років в 7 разів. Частота уrogenітального кандидозу в структурі інфекційної патології складає від 26 до 40 - 45

%. Істотно збільшилася за останні 20 років частота інфекцій, обумовлених опортуністичними грибами, і у онкологічних хворих [1, 3, 7].

Однією з найбільш поширених форм мікробної патології є кандидоз, у виникненні якого переважну роль відіграє грибок *Candida albicans*. Кандидоз займає провідне місце серед мікотичної інфекції.

За минулі два десятиліття гриби роду *Candida* з патогенів, які раніше зустрічались досить рідко, стали одними з основних опортуністичних мікроорганізмів, що викликають внутрішньолікарняні інфекції. Гриби роду *Candida* є збудниками приблизно 15 % внутрішньолікарняних інфекцій, більш 72 % всіх внутрішньолікарняних мікозів, викликають від 8 % до 15 % всіх внутрішньолікарняних інфекцій кровотоку. Від 25 % до 50 % внутрішньолікарняних кандидемій трапляється у відділеннях інтенсивної терапії та реанімації [12].

Рід *Candida* містить понад ста п'ятидесяти чотирьох видів, які відносяться до дейтероміцетів, близько двадцяти є збудниками кандидозу. З них найпоширенішим збудником кандидозу є грибок *Candida albicans*, але, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* можуть стати причиною глибокого кандидозу, іноді з летальними наслідками. *Candida parapsilosis* відрізняється здатністю викликати ендокардит. Найбільш поширеним представником роду є *Candida albicans*. Сім з них: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida (torulopsis) glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis* признані з медичної точки зору найбільш хворобоутворюючими [3, 7, 8].

Тривале використання протигрибкових препаратів супроводжується селекцією резистентних штамів грибів роду *Candida*, у зв'язку з чим впровадження в клінічну практику нових антифунгальних препаратів є

стратегічною відповіддю на зміну спектру збудників кандидозу.

Мета дослідження - визначення спектру та рівня протигрибкової активності новосинтезованих похідних 7-азакумаринів щодо музейних та клінічних тест-штамів грибів роду *Candida* та мікробіологічне обґрунтування доцільності створення на їх основі нових лікарських засобів з протимікробною дією.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження стали 19 найактивніших за результатами первинного мікробіологічного скринінгу [11] похідних 7-азакумаринів, що були синтезовані в Харківському національному фармацевтичному університеті на кафедрі органічної хімії.

Сполуки, що вивчалися, за хімічною будовою були умовно розподілені на п'ять груп: 1 дослідна група - 5-гідроксиметил-2-іміно-8-метил-2*H*-пірано[2,3-*c*]піридин-3-*N*-арикарбоксаміди; 2 дослідна група - 2-*N*²-ариліміно-5-гідроксиметил-8-метил-2*H*-пірано[2,3-*c*]піридин-3-*N*¹-арикарбоксаміди; 3 дослідна група - 2-*N*-ариліміно-5-гідроксиметил-8-метил-2*H*-пірано[2,3-*c*]піридин-3-карбоксаміди; 4 дослідна група - 5-гідроксиметил-8-метил-2-оксо-2*H*-пірано[2,3-*c*]піридин-3-*N*-арилкарбоксаміди та 5 дослідна група - 2-*N*²-ариліміно-3-*N*¹-арилкарбоксамідо-8-метил-2*H*-пірано[2,3-*c*]піридин-5-іл)-метилацетати. В залежності від радикалу, що вони містять, сполукам були надані власні коди. У якості розчинника в дослідженнях було використано поліпропіленгліколь, вихідні розчини якого доводили до концентрації 1 мг/мл.

Дослідження антифунгальної активності похідних 7-азакумаринів було проведено за допомогою 10 тест-штамів грибів роду *Candida*: *Candida pseudotropicalis* ВКПГУ 601/33, *Candida parapsilosis* ВКПГУ 488/10, *Candida kefyr* 85/2, *Candida famata* 40 б/з, *Candida famata* 18/2, *Candida catenulata* (Скляр-27), *Candida albicans* (Скляр-31), *Candida albicans* (Скляр-20), *Candida rugosa* (Скляр-2/1), *Candida albicans* АТСС 885-653. Мікробне навантаження становило 10⁵ КУО/мл. При проведенні досліджень використовували ододобові культури мікроорганізмів, які вирощували на середовищі Сабуро з додаванням 1 % глюкози [10].

Визначення протимікробної дії досліджуваних речовин проводили за допомогою метода серійних розведень у рідких поживних середовищах [2]. Визначали мінімальні фунгістатичну та фунгіцидну концентрації (МФстК та МФцК). Препаратами порівняння були ністатин та флуконазол. Всі дослідження проводили у п'яти повтореннях.

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті проведених досліджень було встановлено, що 95 % досліджених сполук проявляли високу фунгістатичну активність (МФстК к межах 6,25 – 25,0 мкг/мл) та половина даних сполук – високу фунгіцидну активність щодо тест-штаму *C. pseudotropicalis* ВКПГУ 601/33 (МФцК у інтервалі 12,5 – 25,0 мкг/мл). Решта 50 % сполук проявили відносно *C. pseudotropicalis* помірну фунгіцидну дію (МФцК 50,0 мкг/мл, співвідносно з контрольними рівнями. Фунгістатична активність всіх досліджуваних сполук була вища за таку у препаратів порівняння (МФстК ністатину та флуконазолу 50,0 мкг/мл). Найбільш чутливим тест-штам *C. pseudotropicalis* ВКПГУ 601/33 виявився до сполук 1(5) та 1(7) (МФстК – 6,25 мкг/мл).

По відношенню до тест-штаму *C. parapsilosis* ВКПГУ 488/10 65 % досліджених сполук проявили високу фунгістатичну активність (МФстК у межах 12,5 – 25,0 мкг/мл), кращу за контрольні рівні (МФстК ністатину та флуконазолу відповідно 50,0 мкг/мл та 100,0 мкг/мл). У 30 % досліджених речовин МФстК співвідносилась з флуконазолом та дорівнювала 50,0 мкг/мл. Високу фунгіцидну дію щодо *C. parapsilosis* ВКПГУ 488/10 виявили 25 % сполук (МФцК у межах 12,5 – 25,0 мкг/мл), помірну – 55 % (МФцК 50,0 мкг/мл, МФцК препаратів порівняння – 100,0 мкг/мл). У 20 % сполук спостерігалась висока антифунгальна активність із збігом фунгістатичної та фунгіцидної концентрації. Найбільш чутливими *C. parapsilosis* ВКПГУ 488/10 виявились до сполук 1(7), 1(9) та 2(1) (МФстК 12,5 мкг/мл). Серед усіх досліджених груп похідних 7-азакумаринів щодо даного тест-штаму *C. parapsilosis* ВКПГУ 488/10 найменш активними були сполуки з четвертої дослідної групи, але у 67 % їх антифунгальна активність співвідносилась, та перевищувала контроль.

У 80 % сполук, що вивчались, виявили високу фунгістатичну активність щодо до тест-штаму *C. kefyr* 85/2 (МФстК у межах 12,5 – 25,0 мкг/мл), решта 20 % сполук проявляла фунгістатичну дію у МФстК 50,0 мкг/мл (МФстК ністатину та флуконазолу 50,0 мкг/мл). Проявили високу фунгіцидну активність щодо *C. kefyr* 85/2 50 % досліджених сполук у концентрації 12,5 – 25,0 мкг/мл, 25 % речовин виявили помірну фунгіцидну активність до даного збудника (МФцК 50,0 мкг/мл, у порівнянні з контролем - МФцК флуконазолу 100,0 мкг/мл, МФцК ністатину 50,0 мкг/мл). Особливістю високої антифунгальної активності всіх досліджених сполук з четвертої та п'ятої дослідних груп похідних був збіг фунгістатичної та фунгіцидної кон-

центрації. Найменшою антифунгальною активністю щодо *S.kefyr* 85/2 володіли похідні 7-азакумаринів з третьої дослідної групи. Їх фунгістатична активність була помірною (МФстК 50,0 мкг/мл) та співвідносилась з контрольними рівнями. Бактерицидні властивості похідних даної групи були невисокими.

Високочутливим до вивчаємих похідних кумаринів та їх гетероаналогів був тест-штам *S.famata* 40 б/з. У переважній більшості сполук (95 %) МФстК знаходились в діапазоні 6,25 – 25,0 мкг/мл, що значно краще за контрольні показники (МФстК ністатину та флуконазолу 50,0 мкг/мл). Найкращими антифунгальними властивостями щодо *S.famata* 40 б/з володіли сполуки 1(5) з першої дослідної групи та сполука 2(2) – з другої групи. Фунгіцидні властивості похідних кумаринів та їх гетероаналогів щодо даного штаму були дещо гірші: 35 % досліджених сполук проявили високу фунгіцидну активність (МФцК в діапазоні 12,5 – 25,0 мкг/мл), 60 % - помірну (МФцК – 50,0 мкг/мл, МФцК препаратів контролю 100,0 мкг/мл). У порівнянні з контролем фунгістатична активність у всіх досліджених речовин та фунгіцидна – у 95 % речовин була кращою.

Високу фунгістатичну активність, кращу за контроль, щодо тест-штаму *S.famata* 18/2 виявили 80 % досліджених сполук (МФстК 12,5 – 25,0 мкг/мл), у решти 20 % сполук МФстК співвідносилась з показниками контролів та дорівнювала 50,0 мкг/мл. Висока фунгіцидна дія відносно *S.famata* 18/2 виявилась у 20 % досліджених сполук (МФцК 12,5 – 25,0 мкг/мл), у 50 % сполук МФцК дорівнювала 50,0 мкг/мл у порівнянні з МФцК препаратів контролю 100,0 мкг/мл. За антифунгальними властивостями щодо даного тест-штаму найкращими були похідні 1(1), 1(7), 1(9) з першої дослідної групи.

По відношенню до тест-штамів *S.catenulata* (Скляр-27), *S.rugosa* (Скляр-2/1) відібрані сполуки проявили дещо меншу антифунгальну активність. Високу фунгістатичну активність щодо зазначених штамів проявили 35 % досліджених сполук (МФстК 12,5 – 25,0 мкг/мл), більше половини сполук (55 – 60 %) виявляли активність у МФстК 50,0 мкг/мл (МФстК препаратів порівняння у межах 50,0 – 100,0 мкг/мл). Фунгіцидно сполуки діяли у мінімальних концентраціях 12,5 – 25,0 мкг/мл ще рідше (у 20 – 25 % експериментів). Помірну фунгіцидну активність щодо тест-штаму *S. catenulata* (Скляр-27) виявляли 30 % досліджених сполук та відносно штаму *S. rugosa* (Скляр-2/1) – 50 % (МФцК – 50,0 мкг/мл у порівнянні з МФцК препаратів контролю 100,0 мкг/мл). При порівнянні антифун-

гальних властивостей похідних різних груп між собою щодо зазначених тест-штамів максимальну протигрибкову активність встановлено у похідних п'ятої дослідної групи, причому стосовно штаму *S.rugosa* (Скляр-2/1) особливістю був збіг МФстК та МФцК. Мінімальну антифунгальну щодо штаму *S.rugosa* (Скляр-2/1) було досліджено у похідних другої дослідної групи.

Близьким за ступенем чутливості до сполук нового синтезу виявився і тест-штам *S.albicans* (Скляр-31). Високу фунгістатичну активність відносно даного штаму виявили 45 % досліджених сполук (МФстК 12,5 – 25,0 мкг/мл), решта 55 % - помірну активність співвідносно з флуконазолом (МФстК флуконазолу 50,0 мкг/мл, МФстК ністатину 100,0 мкг/мл). Високофунгіцидно діяли 20 % досліджених сполук (МФцК 12,5 – 25,0 мкг/мл), у половини сполук було досліджено помірну бактерицидну активність (МФцК 50,0 мкг/мл порівнянні з МФцК препаратів контролю 100,0 мкг/мл). Найкращою за антифунгальними властивостями щодо даного тест-штаму були похідні 7-азакумаринів з п'ятої дослідної групи.

Окрім високої активності щодо *S.albicans* АТСС 885-653, встановленої у попередніх дослідженнях при первинному мікробіологічному скринінгу [11], нами були виявлені їх високі антифунгальні можливості щодо штаму *S.albicans* (Скляр-20). У всіх досліджених сполук виявилась висока фунгістатична активність щодо даного штаму (МФстК в діапазоні 6,25 – 25,0 мкг/мл, у порівнянні МФстК флуконазолу та ністатину відповідно 50,0 мкг/мл та 100,0 мкг/мл). Більш, ніж у половині досліджених сполук МФцК знаходилась у межах 12,5 – 25,0 мкг/мл, та дорівнювала 50,0 мкг/мл у 20 % (МФцК препаратів контролю 100,0 мкг/мл). Найактивнішими щодо тест-штаму *S.albicans* (Скляр-20) виявились похідні першої, другої та п'ятої дослідних груп, причому для двох останніх був характерний збіг МФстК та МФцК. Встановлено, що найкращими антифунгальними властивостями відносно тест-штамів *S.albicans* АТСС 885-653 та *S.albicans* (Скляр-20) володіли сполуки 1(1) та 1(10) з першої групи.

Висновки. Проведені мікробіологічні дослідження нових речовин в рядах синтетичних похідних 7-азакумаринів, виявили високу протигрибкову активність щодо музейних та клінічних тест-штамів грибів роду *Candida*. У ході вивчення протигрибкової активності було встановлено, що новосинтезовані сполуки виявили високу фунгістатичну та фунгіцидну дію в концентраціях від 6,4 до 25,0 мкг/мл, що майже у чотири рази перевищували показники речовин контр-

олю. Отримані дані свідчать про високу чутливість грибів роду *Candida* до похідних 7-азакумаринів нового синтезу. Переважна більшість досліджених сполук виявили високу антифунгальну активність щодо штамів *C.pseudotropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.kefyr*, *C.famata*, *C.albicans*. Експериментальним шляхом доведено найвищу антифунгальну активність у сполук 1(1), 2(2), 4(3), 4(6), 5(1), 5(2), 5(5), 5(6).

Перспективи подальших досліджень. Проведені дослідження довели перспективність подальшого вивчення властивостей відібраних сполук з метою створення на їх основі ефективних протигрибкових засобів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Березняков И.Г. Инфекции и антибиотики / И.Г. Березняков. - Х.: Константа, 2004. - 448 с.
2. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів: Методичні рекомендації / Ю.Л. Волянський, І.С. Гриценко, В.П. Широбоков та ін.; ДФЦ МОЗ України. - К, 2004. - 38с.
3. Кисина В.И. Зависимость клинической картины кандидозного вульвовагинита от видового состава грибов рода *Candida* и эффективность флуконазола при первичной и рецидивирующей кандидозной инфекции / В.И. Кисина, Ж.В. Степанова, М.А. Мирзабекова, В.А. Курчавов // Гинекология. - 2000. - № 6(2). - С. 193-195.
4. Крестецкая С.Л. Чувствительность дрожжеподобных грибов рода *Candida* к новым производным акридина и фенантридина / С.Л. Крестецкая // Тез. конф. молодых ученых (ХМУ), Харьков, 23-25 декабря, 2002. - Х., 2002. - С.79.
5. Мирзабалаева А.К. Кандидоз гениталий и беременность / А.К. Мирзабалаева, Ю.В. Долго-Сабурова // Проблемы мед. микол. - 2002. - № 2(4). - С. 60.
6. Нетяженко В.З. Особливості застосування антибіотиків у сучасних умовах та засади раціональної антибіотикотерапії / В.З. Нетяженко, О.М. Пленова, Т.Й. Мальчевська // Мистецтво лікування. - 2003. - № 5. - С. 12-17.
7. Сміянов В.А. Проблема кандидозно-бактеріальних асоціацій при захворюваннях ЛОР-органів / В.А. Сміянов, Т.В. Іванюк // Новости медицины и фармации. - № 17. - 2007. - С. 22-23
8. Тютюнник В.Л. Вагинальный кандидоз у беременных: этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение // Фарматека. - 2003. - № 11(74). - С. 62-65.
9. Частная медицинская микробиология / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. - М. «Медицина». - 2005. - 480 с.
10. Яковлев С.В. Новые антибактериальные средства для амбулаторной практики и стационара / С.В. Яковлев // Материалы VIII Российского Национального конгресса «Человек и лекарство». - М., 2002. - с. 56-63.
11. Evsukova V.Y. Antimicrobial activity of synthetic derivatives of condensed heterocyclic compounds with pyridine fragment / V.Y. Evsukova, I.D. Andreieva, V.V. Kazmirchuk et al. // Annals of Mechnikov Institute. - 2009. - N 1. - P. 14 - 16.
12. Holzheimer R.G. Antibiotic therapy in intra - abdominal infections - a review on randomized clinical trials / R.G. Holzheimer, H. Dralle // Eur. J. Med. Res. - 2001. - Supp. 30. - № 6 (7). - P. 277-291.
13. WHO Global Burden of Disease project, 2002, version 1: - Режим доступу: <http://www.who.int/>

УДК 547 587.51:577.15/17

АНТИФУНГАЛЬНА АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 7-АЗАКУМАРИНІВ

Евсюкова В.Ю., Андреева И.Д., Казмирчук В.В.

Резюме. Методом серийных разведений в жидких питательных средах установлена высокая антифунгальная активность производных 7-азакумаринов относительно музейных и клинических штаммов грибов рода *Candida*. Результаты исследований свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения свойств производных 7-азакумаринов с целью создания на их основе эффективных противомикробных средств для профилактики и лечения заболеваний грибковой этиологии.

Ключевые слова: производные 7-азакумаринов, грибы рода *Candida*, антифунгальная активность.

UDC 547 587.51:577.15/17

ANTIFUNGAL ACTIVITY of the DERIVATIVES of 7-AZACUMARINES

Evsukova V.Y., Andreieva I.D., Kazmirchuk V.V.

Summary. The significant antifungal activity of the derivatives of 7-azacumarines against museum and clinical strains of *Candida* spp. fungi by serial dilutions method in liquid mediums was established. The results of studies of the properties of the derivatives of 7-azacumarines and development of the antimicrobial compounds on their basis for prophylaxis and treatment of diseases of mycotic etiology could be promising.

Key words: the derivatives of 7-azacumarines, *Candida* spp. fungi, antifungal activity.

Стаття надійшла 15.04.2010 р.