

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-91-98](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-91-98)
УДК 615.282:615.076.7



Оригинальная статья / Research article

Валидационные испытания питательной среды Сабуро при определении противогрибковой активности впервые синтезированных соединений методом двукратных серийных разведений

В. В. Новикова✉, Н. А. Пулина, В. Г. Лужанин, Е. Р. Курбатов

ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

✉ Контактное лицо: Новикова Валентина Васильевна. E-mail: vvnperm@yandex.ru

ORCID: В. В. Новикова – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>; Н. А. Пулина – <https://orcid.org/0000-0002-0435-0484>; В. Г. Лужанин – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>; Е. Р. Курбатов – <https://orcid.org/0000-0001-6426-7976>.

Статья поступила: 14.10.2022

Статья принята в печать: 09.12.2022

Статья опубликована: 27.12.2022

Резюме

Введение. В связи высокой распространенностью и социальной значимостью грибковых инфекций поиск новых антифунгальных препаратов является актуальным направлением развития современной фармакологии. Одним из важных компонентов доклинических микробиологических исследований, влияющих на конечный результат, являются питательные среды, используемые в процессе научного эксперимента.

Цель. Валидировать использование жидкой среды Сабуро как альтернативы среды RPMI 1640 с глутамином для оптимизации экспериментальных условий определения ПГА новых соединений микрометодом серийных разведений.

Материалы и методы. Для изучения противогрибковой активности (ПГА) новых молекул использовали микрометод двукратных серийных разведений. Изучали ПГА в отношении типового тест-штамма *Candida albicans* NCTC 885-653. Оценку валидационных параметров осуществляли согласно принципам, изложенным в ОФС.1.1.0021.18 «Валидация микробиологических методик». Для апробации валидированной методики использовали новое соединение из группы производных амидов 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановых кислот.

Результаты и обсуждение. Получены результаты, соответствующие критериям приемлемости в отношении изученных валидационных параметров – правильность, прецизионность, линейность, устойчивость, предел количественного обнаружения. Показана возможность использования среды Сабуро для определения противогрибковой активности на примере нового соединения группы производных амидов 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановых кислот.

Заключение. В связи с доказанными лучшими ростовыми свойствами испытуемой альтернативной жидкой среды Сабуро в отношении исследуемой культуры *Candida albicans* и сходимости результатов определения антифунгальной активности при использовании альтернативной и референтной сред, можно рекомендовать жидкую среду Сабуро для использования при определении ПГА впервые синтезированных соединений с использованием микрометода серийных разведений.

Ключевые слова: алидация, микрометод серийных разведений, бульон Сабуро, среда RPMI-1640 с глутамином, противогрибковая активность

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. В. В. Новикова – обоснование актуальности работы, проведение исследований, касающихся валидации микрометода серийных разведений. Н. А. Пулина – получение субстанции нового соединения группы производных амидов 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановых кислот. В. Г. Лужанин – осуществление организационных работ, подготовка текста статьи. Е. Р. Курбатов – подготовка текста статьи. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное использование», 2022 год.

Для цитирования: Новикова В. В., Пулина Н. А., Лужанин В. Г., Курбатов Е. Р. Валидационные испытания питательной среды Сабуро при определении противогрибковой активности впервые синтезированных соединений методом двукратных серийных разведений. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(4–1):91–98. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-91-98](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-91-98)

Validation Testing of Sabouraud Liquid Medium in Determining the Antifungal Activity of Newly Synthesized compounds by the Method of Two-fold Serial Dilutions

Valentina V. Novikova✉, Natalia A. Pulina, Vladimir G. Luzhanin, Evgeniy R. Kurbatov

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Perm State Pharmaceutical Academy" of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Polevaya str., Perm, 614990, Russia

✉ Corresponding author: Valentina V. Novikova. E-mail: vvnperm@yandex.ru

ORCID: Valentina V. Novikova – <https://orcid.org/0000-0003-4475-4421>; Natalia A. Pulina – <https://orcid.org/0000-0002-0435-0484>; Vladimir G. Luzhanin – <https://orcid.org/0000-0002-6312-2027>; Evgeniy R. Kurbatov – <https://orcid.org/0000-0001-6426-7976>.

Received: 14.10.2022

Revised: 09.12.2022

Published: 27.12.2022

© Новикова В. В., Пулина Н. А., Лужанин В. Г., Курбатов Е. Р., 2022

© Novikova V. V., Pulina N. A., Luzhanin V. G., Kurbatov E. R., 2022

Abstract

Introduction. Due to the high prevalence and social significance of fungal infections, the search for new antifungal drugs is an actual direction of modern pharmacology. One of the important components of preclinical microbiological studies is the culture media used in the process of experiment.

Aim. To validate the use Sabouraud liquid medium as an alternative to RPMI 1640 medium to optimize the experimental conditions for the determination of antifungal activity of new compounds by the microserial dilution method

Materials and methods. The micromethod of two-fold serial dilutions to study the antifungal activity of new molecules was used. Antifungal activity was studied against the reference test strain *Candida albicans* NCTC 885-653. The evaluation of the validation parameters was carried out according to the principles set forth in the General Pharmacopoeia Monograph.1.1.0021.18 «Validation of microbiological methods». A new compound from the group of 4-(het)aryl-2,4-dioxobutanoic acid amide derivatives was used for test the validated method.

Results and discussion. Results were obtained that meet the acceptance criteria for the studied validation parameters – trueness, precision, linearity, robustness and quantitation limit. The possibility of using Sabouraud's medium for the determination of antifungal activity was shown on the example of a new compound of the group of 4-(het)aryl-2,4-dioxobutanoic acid amide derivatives.

Conclusion. The tested alternative liquid Sabouraud medium can be recommended for use in determining the antifungal activity of the newly synthesized compounds with the microdilutions method because the proven its better growth properties for the investigated yeast strain and the convergence of the results of determining antifungal activity using alternative and reference media.

Keywords: validation, serial dilution micromethod, Sabouraud broth, RPMI-1640 medium with glutamine, antifungal activity

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Valentina V. Novikova – substantiating the relevance of the work, conducting research related to the validation of the serial dilution micromethod. Natalia A. Pulina – obtaining a substance of a new compound of the group of 4- (het) aryl-2,4-dioxobutanoic acid amide derivatives. Vladimir G. Luzhanin – implementation of organizational work, preparation of the text of the article. Evgeniy R. Kurbatov – preparation of the text of the article. All authors participated in the discussion of the results. All authors participated in the discussion of the results.

Funding. The study was carried out with the financial support of the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use", 2022.

For citation: Novikova V. V., Pulina N. A., Luzhanin V. G., Kurbatov E. R. Validation testing of Sabouraud liquid medium in determining the antifungal activity of newly synthesized compounds by the method of two-fold serial dilutions. *Drug development & registration*. 2022;11(4–1):91–98. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4\(1\)-91-98](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4(1)-91-98)

ВВЕДЕНИЕ

Широкое распространение грибковых инфекций [1–6], возникающих на фоне антибиотикотерапии, иммунодефицитных состояний, нарушения обменных процессов в условиях растущей антимикотикорезистентности обуславливает актуальность поиска новых антифунгальных препаратов [7–12]. Одним из ключевых моментов данных исследований является изучение противогрибковой активности новых молекул в лабораторных условиях на доклиническом этапе.

Важным компонентом микробиологических испытаний, влияющим на конечный результат, являются питательные среды, используемые в процессе научного эксперимента [13, 14]. Среда Сабуро широко используется в микробиологических исследованиях с целью выделения и культивирования дрожжевых и плесневых грибов [15, 16]. В исследованиях российских ученых данная среда также применяется при определении противогрибковой активности новых соединений. Однако согласно зарубежной регламентирующей документации¹ для этих целей использует-

ся питательная среда RPMI-1640 с L-глутамином (далее RPMI-1640). Согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (под ред. А. Н. Миронова, 2012 г.) [17] для макрометода серийных разведений рекомендуются обе жидкие среды, для микрометода – среда RPMI-1640. Однако при рекомендованных [17] микробной нагрузке (около 5×10^3 КОЕ/мл), режиме инкубации 27 °С в течение 24 часов и методе детекции (визуально) результаты, получаемые на среде RPMI-1640, варьируют. При этом также можно отметить нелогичность использования более низкой микробной нагрузки, рекомендуемой [17] для исследовательских целей (около 5×10^3 КОЕ/мл), при аналогичном показателе, используемом в методике, применяемой в клинической практике при оценке чувствительности клинических изолятов микромицетов к антифунгальным препаратам около 5×10^5 КОЕ/мл².

Готовая среда RPMI-1640, имея сбалансированный аминокислотный состав, в то же время имеет низкое содержание глюкозы (0,2 %), что негативно сказывается на росте микромицетов. При приготовлении среды RPMI-1640 на основе порошка с повы-

¹ EUCAST Definitive Document EDef 7.3.2: Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. Available at: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_7.3.2_Yeast_testing_definitive_revised_2020.pdf. Accessed: 21.10.2022.

² Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации (2021). Доступно по: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf>. Ссылка активна на 21.10.2022.

шенным содержанием глюкозы (2 %) исключаются термические способы стерилизации, что требует специального оборудования. Еще одним недостатком данной среды является более высокая стоимость: цена за 1 л готовой коммерческой среды составляет 1000–5600 руб. в зависимости от производителя. Стоимость сухого бульона Сабуро в пересчете на 1 л готовой среды – 560–850 руб.

Цель исследования: валидировать микрометод серийных разведений с использованием жидкой среды Сабуро как альтернативы среды RPMI-1640 с L-глутамином для оптимизации экспериментальных условий определения ПГА новых соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящем исследовании были использованы жидкая среда (бульон) Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) и жидкая среда RPMI-1640 с L-глутамином, Sigma для их сравнительной оценки и подтверждения возможности применения среды Сабуро для культивирования микромицетов с целью дальнейшего определения воздействия на них веществ с противогрибковой активностью микрометодом серийных разведений.

Оценку валидационных параметров осуществляли в соответствии с принципами фармакопейной статьи¹. В ходе эксперимента были выбраны и оценены такие параметры, как правильность, прецизионность (повторяемость), линейность, устойчивость, предел количественного определения [18].

Инокулюм готовили путем отбора пяти колоний из 18–24-часовых культур типового штамма *Candida albicans* NCTC 885-653. Колонии суспендировали в 5 мл стерильного 0,9%-го физиологического раствора. Полученную суспензию перемешивали в течение 15 с, плотность клеток устанавливали спектрофотометрически путем добавления стерильного физиологического раствора до достижения оптической плотности 0,5 по МакФарланду при длине волны 530 нм. Эта процедура давала дрожжевую суспензию от 10^6 до 5×10^6 КОЕ/мл². Далее готовили рабочую суспензию $1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. По 100 мкл указанного разведения культуры помещали в 100 мкл исследуемых сред, инкубировали в течение 24 часов при температуре 35 ± 2 °C. Далее готовили последовательные разведе-

ния в 0,9%-м физиологическом растворе с конечным разведением 1×10^{-4} и 5×10^{-4} .

Для оценки прецизионности, правильности, линейности на поверхность агар Сабуро высевали газоном 10 мкл разведения 5×10^{-4} (серия I, n), 20 мкл разведения 5×10^{-4} (серия II, 2n) и 10 мкл разведения 1×10^{-4} (серия III, 5n). Посевы осуществлялись в 5 повторах в соответствии с [18] разными сотрудниками. Чашки помещали в термостат на 24 часа при температуре 35 ± 2 °C. Учет производили путем подсчета выросших колоний. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы Statgraphics Plus, версия 5.0. Оценку полученных результатов осуществляли в соответствии с [18].

Для изучения ПГА представителя производных амидов 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановых кислот микрометодом двукратных серийных разведений использовали референсную и альтернативную питательные среды. Антифунгальную активность определяли в отношении представителей *Candida* spp.: 4 типовых штаммов (*C. albicans* NCTC 885-653, *C. krusei* РКПГУ-1472/310, *C. glabrata* РКПГУ-1485/47, *C. tropicalis* РКПГУ-1513/784) и клинических изолятов, выделенных от пациентов многопрофильных клиник (*C. albicans* – 32 штамма, *C. krusei* – 4 штаммов, *C. glabrata* – 1 штамм, *C. tropicalis* – 1 штамм). Для приготовления дрожжевой взвеси использовали суточные культуры микромицетов, выращенные на агаре Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). Концентрация дрожжевых клеток в опыте составила $2 \cdot 10^5$ КОЕ/мл.

В качестве положительного контроля использовали питательную среду с внесенной исследуемой культурой. В качестве отрицательного контроля использовали интактную питательную среду. Посевы инкубировали в термостате при температуре 35 ± 2 °C. Оценку роста проводили визуально через 24 часа инкубирования. В качестве значения МПК (минимальной подавляющей концентрации) принимали наименьшую концентрацию соединения, при которой отсутствует видимый рост тест-организма.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Правильность, выраженную в процентах восстановления микроорганизмов, определяли по формуле:

$$R = \frac{N}{N_0} \cdot 100 \%,$$

где R – процент восстановления микроорганизмов (%); N – количество выделенных клеток (КОЕ) на валидируемой среде (Сабуро); N_0 – количество выделенных клеток (КОЕ) на референсной среде RPMI-1640 (принятое опорное значение). Процент восстановления согласно [18] должен составлять не менее 70 % от референсного значения.

¹ ОФС.1.1.0021.18 «Валидация микробиологических методов». Доступно по: <https://docs.rucml.ru/feml/pharma/v14/vol1/423/> Ссылка активна на 21.10.2022.

² ГОСТ Р ИСО 16256-2015 Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Референтный метод для тестирования активности *in vitro* антимикробных препаратов в отношении дрожжевых грибов, вызывающих инфекционные заболевания. Утв. приказом Минздрава России от 27.04.2015 г. № 300-ст. Доступно по: <https://internet-law.ru/gosts/gost/59834>. Ссылка активна на 21.10.2022.

Результаты экспериментальной оценки *прецизионности* выражали соответствующим значением относительного стандартного отклонения – коэффициента вариации (CV) – по формуле:

$$CV = \frac{\sigma}{X} \cdot 100 \%,$$

где σ – стандартное отклонение для выборки; X – среднее выборочное значение. Для используемых чашечных агаровых методов при получении более 10 КОЕ приемлемым считали коэффициент вариации не более 35 %. Данные, полученные при использовании референсной и альтернативной питательных сред, представлены в таблице 1.

В ходе оценки правильности и прецизионности валидируемой методики установлено, что указанные показатели соответствуют критериям приемлемости.

Процент восстановления микроорганизмов при использовании среды Сабуро существенно превышает минимальную допустимую величину (70 %). Коэффициент вариации (случайная ошибка), используемый для оценки повторяемости метода для среды RPMI-1640 составил 23,9–27,1 %, что выше, чем для среды Сабуро – 18,3–22,4 %. Таким образом, случайная ошибка при использовании альтернативной среды ниже, чем для референсной.

Линейность. Оценивали способность используемого метода давать результат, прямо пропорциональный концентрации клеток микроорганизмов в образце на всем рабочем диапазоне, с использованием альтернативной и референсной среды. Обработку результатов проводили с помощью регрессионного анализа. Линейность считали доказанной, если коэффициент корреляции (R^2) не ниже 0,90. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

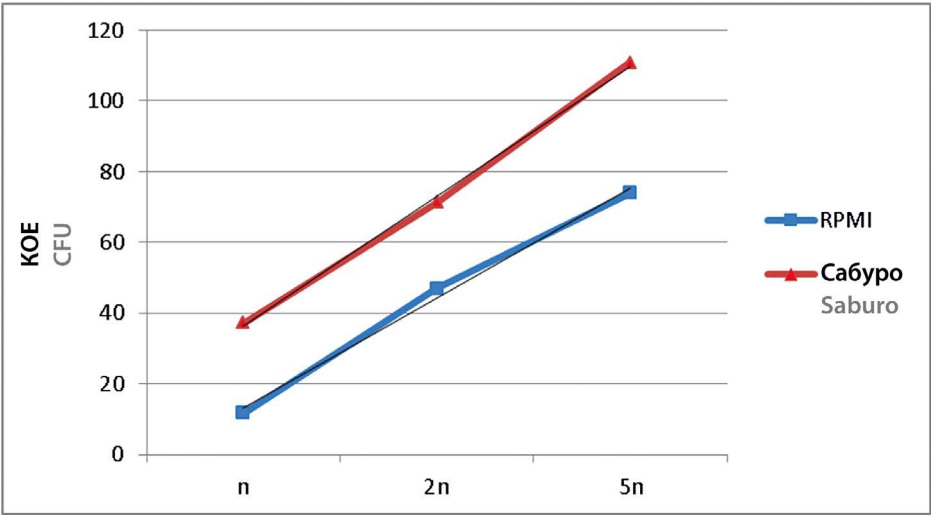


Рисунок 1. Показатели линейности валидируемого метода
Figure 1. Indicators of linearity of the method being validated

Таблица 1. Результаты определения количественного содержания жизнеспособных клеток *C. albicans* в валидируемых средах, КОЕ

Table 1. Results of quantitative determination of viable *C. albicans* cells in validated media, CFU

Питательная среда Nutrient medium	RPMI-1640			Среда Сабуро Medium Saburo		
Разведения культуры Breeding culture	I	II	III	I	II	III
Повторы Replays	13	58	75	44	90	114
	7	61	93	30	71	83
	14	33	48	48	72	131
	14	59	67	34	77	128
	11	37	87	30	46	98
Среднее Average	11,8 ± 2,9	49,6 ± 13,4	74 ± 17,7	37,2 ± 8,3	71,2 ± 15,9	110,8 ± 20,3
CV (прецизионность), % CV (precision), %	24,9	27,1	23,9	22,3	22,4	18,3
R (правильность), % R (correctness), %	–	–	–	315,2	143,5	149,7

В ходе исследования установлено, что коэффициент детерминации (R) и коэффициент корреляции (R^2) для среды RPMI-1640 составили 0,94 и 0,88, соответственно; для среды Сабуро – 0,97 и 0,94, что доказывает наличие линейности при использовании среды Сабуро.

Устойчивость. При определении устойчивости проводили сравнение результатов, полученных с использованием питательных сред различных серий и производителей [RPMI-1640 – Gibco™, Lot 1901507 (1) и Sigma Lot RNBFO725 (2); бульон Сабуро – ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия, серия 119 (1) и ООО «НПЦ «Биокомпас-С», Россия, серия 73 (2)]. Испытания проводили в 5 повторах на трех последовательных разведениях культуры (n , $2n$, $5n$ – серии I–III) с определением среднего арифметического количества жизнеспособных клеток (рисунок 2). Оценивали изменение прецизионности (коэффициента вариации) и правильности (процента восстановления микроорганизмов) результатов, полученных с использованием различных питательных сред методом однофакторного анализа (таблица 2).

Установлено, что отличия результатов статистически незначимы ($p > 0,05$), что свидетельствует об устойчивости метода с использованием обеих питательных сред (см. таблица 2).

Предел количественного определения. Для исследования использовали 3 разведения суспензии типового штамма *C. albicans* NCTC 885-653, культивируемого на соответствующих питательных средах при температуре 35 ± 2 °C в течение 24 часов: до 2×10^1 КОЕ/мл (I), 4×10^1 КОЕ/мл (II), 10^2 КОЕ/мл (III). Разведения высевали на агар Сабуро, учет осуществляли по количеству выросших колоний через 24 часа инкубирования при температуре 35 ± 2 °C. Результаты исследования представлены в таблице 1. Оценку предела количественного определения проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа. Установлено, что количество жизнеспособных клеток исследуемой культуры микроцета, выявленное в соответствующем разведении существенно выше при использовании среды Сабуро (рисунки 3, 4), чем в референсной среде ($p = 0,023$).

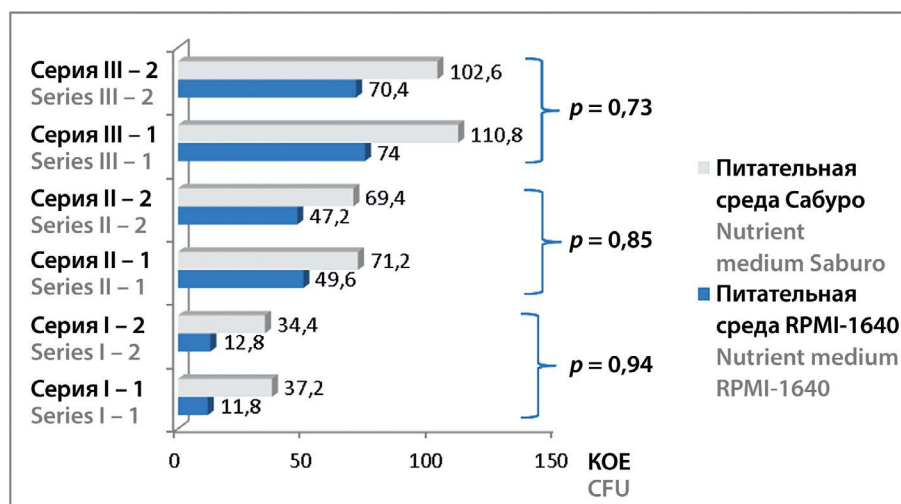


Рисунок 2. Результаты определения количественного содержания жизнеспособных клеток *C. albicans* в валидируемых средах разных производителей

Figure 2. The results of determining the quantitative content of viable *C. albicans* cells in the validated media of different series

Таблица 2. Результаты определения процента восстановления (R) и коэффициента вариации (CV) при определении устойчивости методики

Table 2. The results of determining the percentage of recovery (R , trueness) and the coefficient of variation (CV , precision) when determining the robustness of the method

Питательная среда Nutrient medium	RPMI-1640	Сабуро Saburo	RPMI-1640	Сабуро Saburo	RPMI-1640	Сабуро Saburo
Серия Series	Серия I – 1/2 Series I – 1/2		Серия II – 1/2 Series II – 1/2		Серия III – 1/2 Series III – 1/2	
CV (прецизионность), % CV (precision), %	24,9/27,8	22,3/19,4	27,1/25,2	22,4/17,0	23,9/21,4	18,3/9,7
R (правильность), % R (correctness), %	315,2/268,8		143,5/147,0		149,7/145,7	

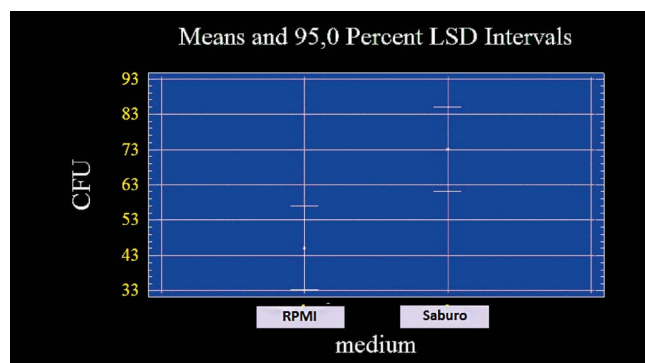


Рисунок 3. Результаты статистической оценки ростовых свойств среды Сабуро и RPMI-1640

Figure 3. Results of the statistical evaluation of the growth properties of the environment of Sabouraud and RPMI-1640

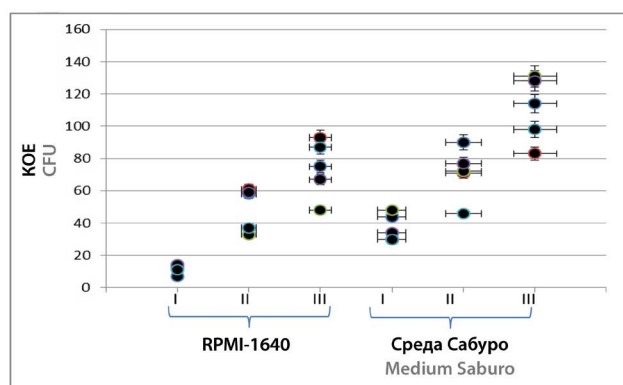


Рисунок 4. Результаты исследования предела количественно-го определения при использовании среды Сабуро и RPMI-1640

Figure 4. Quantitation limit results using Sabouraud's medium and RPMI-1640

Таким образом, предел количественного определения в отношении культуры *C. albicans* при культивировании в бульоне Сабуро ниже аналогичного показателя при культивировании на среде RPMI-1640, что свидетельствует о лучших ростовых свойствах альтернативной среды.

В связи с доказанной возможностью использования среды Сабуро в качестве альтернативы среде RPMI-1640 для определения противогрибковой активности новых соединений микрометодом серийных разведений ввиду наличия лучших ростовых свойств и более стабильных результатов, была изучена антифунгальная активность соединения группы производных амидов 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановых кислот (I) в отношении 42 представителей *Candida spp.* (типовых штаммов и клинических изолятов) в соответствии с рекомендациями [12]. Исследования осуществлялись в двух повторах. Полученные результаты (среднее арифметическое МПК) представлены в таблице 3. Изучаемое соединение проявило высокую противогрибковую активность в отношении боль-

шинства изученных штаммов *Candida spp.*, однако уступало препарату сравнения флуконазолу: МПК₅₀ соединения I составила 5,9–7,8 мг/л; МПК₉₀ – 9,8–15,6 мг/л; флуконазола – 1,5–2,9 мг/л и 11,7–23,4 мг/л соответственно. Различия в величинах МПК изучаемого соединения и флуконазола с использованием разных сред статистически недостоверны ($p = 0,078–0,121$). При этом МПК изучаемого соединения в среде Сабуро несколько выше, чем в RPMI-1640.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведены валидационные исследования в отношении возможности использования жидкой среды Сабуро (бульона Сабуро) в качестве альтернативы среде RPMI-1640 с глутамином при определении противогрибковой активности новых соединений микрометодом двукратных серийных разведений. Полученные результаты оценки валидационных параметров соответствуют критериям приемлемости. Доказаны лучшие ростовые свойства среды Сабуро в отношении исследуемой культуры микромицета. Показана возможность использования данной питательной среды для определения противогрибковой активности на примере нового соединения группы производных амидов 4-(гет)арил-2,4-диоксобутановых кислот.

ЛИТЕРАТУРА

- Denning D. W., Kneale M., Sobel J. D., Rautemaa-Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. *The Lancet infectious diseases*. 2018;18(11):339–347. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30103-8.
- Fatahinia M., Halvaezadeh M., Rezaei-Matehkolaei A. Comparison of enzymatic activities in different *Candida* species isolated from women with vulvovaginitis. *Journal de Mycologie Médicale*. 2017;27(2):188–194. DOI: 10.1016/j.mycmed.2017.01.009.
- Quindós G. Epidemiology of invasive mycoses: A landscape in continuous change. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2018;35(4):171–178. DOI: 10.1016/j.riam.2018.07.002.
- Quindós G., Gil-Alonso S., Marcos-Arias C., Sevillano E., Mateo E., Jauregizar N., Eraso E. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 2019;24(2):172–180. DOI: 10.4317/medoral.22978.
- Riera F. O., Caeiro J. P., Angiolini S. C., Vigezzi C., Rodriguez E., Icelly P. A., Sotomayor C. E. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. *Antibiotics*. 2022;11(7):877. DOI: 10.3390/antibiotics11070877.
- Vila T., Sultan A. S., Montelongo-Jauregui D., Jabra-Rizk M. A. Oral candidiasis: a disease of opportunity. *Journal of Fungi*. 2020;6(1):15. DOI: 10.3390/jof6010015.
- Гейн В. Л., Бобровская О. В., Русских А. А., Новикова В. В., Гейн О. Н., Карпенко Ю. Н., Чашина С. В., Дмитриев М. В., Янкин А. Н. Синтез и биологическая активность 5-арил-N-[[4-[[1,3-тиазол-2-ил)сульфамойл]фенил]-1-фенилпирозол-3-карбоксамидов и их солей. *Журнал общей химии*. 2019;89(4):542–551. DOI:10.1134/S0044460X19040073.
- Дмитриев М. В., Иванов Д. В., Игидов Н. М., Махмудов Р. Р., Новикова В. В., Чернов И. Н. Синтез и биологическая активность моно-и дибромпроизводных 2-амино-5-(2-арил-2-оксоэтилиден)-4-оксо-1H-4,5-дигидрофуран-3-карбоновых кислот. *Журнал общей химии*. 2018;88(7):1105–1109. DOI: 10.1134/S0044460X18070089.

Таблица 3. Сравнительная противогрибковая активность изучаемого соединения и препарата сравнения при использовании сред Сабуро и RPMI-1640, МПК, мг/л

Table 3. Comparative antifungal activity of the studied compound and the reference drug using Sabouraud and RPMI-1640 media, IPC, mg/l

Штамм Strain	Среда Сабуро Medium Saburo	RPMI-1640	Штамм Strain	Среда Сабуро Medium Saburo	RPMI-1640
	I/флуконазол I/fluconazole	I/флуконазол I/fluconazole		I/флуконазол I/fluconazole	I/флуконазол I/fluconazole
<i>C. albicans</i> (1)	3,9/2,9	2,9/1,5	441 (22)	15,6/7,8	5,9/2,9
<i>C. krusei</i> (2)	2,5/62,5	0,1/31,2	624 (23)	7,8/4,9	7,8/2,0
<i>C. glabrata</i> (3)	3,9/15,6	1,0/5,9	629 (24)	7,8/2,9	7,8/1,5
<i>C. tropicalis</i> (4)	7,8/93,5	3,9/62,5	634 (25)	3,9/2,9	3,9/1,0
55 (5)	15,6/3,9	7,8/3,9	675 (26)	7,8/1,0	3,9/0,25
67 (6)	11,7/0,5	5,9/0,3	686 (27)	7,8/0,8	3,9/0,25
105 (7)	15,6/0,7	11,7/0,3	507 (28)	3,9/1,0	2,0/0,2
113 (8)	3,9/3,9	7,8/3,9	557 (29)	3,9/1,3	2,0/0,2
133 (9)	15,6/0,5	7,8/0,25	735 (30)	7,8/23,4	7,8/11,7
180 (10)	15,6/0,5	7,8/0,3	764 (31)	7,8/46,9	7,8/15,6
187 (11)	7,8/2,4	4,2/2,0	832 (32)	7,8/2,9	5,9/1,0
201 (12)	11,7/11,7	9,8/7,8	858 (33)	7,8/2,9	5,9/1,5
208 (13)	15,6/2,3	9,8/1,0	918 (34)	7,8/3,9	7,8/1,5
219 (14)	3,9/0,5	2,9/0,5	957 (35)	15,6/2,9	9,8/0,8
229 (15)	3,9/11,7	2/7,8	960 (36)	15,6/5,8	5,9/1,25
235 (16)	11,7/0,3	9,8/0,25	981 (37)	15,6/2,9	5,9/0,8
259 (17)	15,6/3,9	9,8/2,0	983 (38)	5,9/2,0	5,9/0,5
279 (18)	11,7/7,8	5,9/1,5	1031 (39)	7,8/9,7	1,0/7,8
324 (19)	3,9/23,4	3,9/11,7	1053 (40)	7,8/5,8	3,9/2,0
329 (20)	7,8/2,9	7,8/2,0	1334 (41)	3,9/2,0	2,9/0,5
337 (21)	3,9/125	7,8/15,6	1281 (42)	5,9/2,0	7,8/0,8

- Новикова В. В., Бобровская О. В., Гейн В. Л., Селиверстов Г. В., Люст Е. Н., Махмудов Р. Р. Оценка противогрибковой и антибактериальной активности серебряных солей 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламино-сульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пирозол-3-онов. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(9):34–38. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-9-34-38.
- Bonifacio B. V., Machado Vila T. V., Masiero I. F., da Silva P. B., da Silva I. C., de Oliveira Lop T. M. Antifungal activity of a hydroethanolic extract from *Astronium urundeuva* leaves against *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:2642. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02642.
- Gamal A., Chu S., McCormick T. S., Borroto-Esoda K., Angulo D., Ghannoum M. A. Ibrexafungerp, a novel oral triterpenoid antifungal in development: overview of antifungal activity against *Candida glabrata*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11:642358. DOI: 10.3389/fcimb.2021.642358.
- Wall G., Lopez-Ribot J. L. Screening repurposing libraries for identification of drugs with novel antifungal activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020;64(9). DOI: 10.1128/AAC.00924-20.
- Шепелин А. П. Современное состояние и тенденции в разработке, производстве и применении питательных сред. *Бактериология*. 2016;1(1):42–47. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-42-47.
- Bonnet M., Lagie J. C., Raoult D., Khelaifia S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New microbes and new infections*. 2020;34:100622. DOI: 10.1016/j.nmni.2019.100622.
- Savinov V. A., Ovchinnikov R. S., Kapustin A. V., Laishevtcev A. I., Gulykin A. M. Development of a differential diagnostic nutrient medium for the express diagnosis of animal dermatophytosis. *IOP Publishing*. 2019;315(2):022071. DOI: 10.1088/1755-1315/315/2/022071.
- Baranova A. A., Georgieva M. L., Bilanenko E. N., Andreev Ya. A., Rogozhin E. A., Sadykova V. S. Antimicrobial potential of alkalophilic micromycetes *Emericellopsis alkaline*. *Applied biochemistry and microbiology*. 2017;53(6):703–710.
- Миронов А. Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных. Часть первая. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
- Гунар О. В., Сахно Н. Г., Абрамович Р. А. Основы валидации микробиологических методик фармацевтического анализа: учебное пособие. М.: РУДН; 2017. 221 с.

REFERENCES

- Denning D. W., Kneale M., Sobel J. D., Rautema-Richardson R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. *The Lancet infectious diseases*. 2018;18(11):339–347. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30103-8.
- Fatahinia M., Halvaezadeh M., Rezaei-Matehkolaei A. Comparison of enzymatic activities in different *Candida* species isolated from women with vulvovaginitis. *Journal de Mycologie Médicale*. 2017;27(2):188–194. DOI: 10.1016/j.mycmed.2017.01.009.

3. Quindós G. Epidemiology of invasive mycoses: A landscape in continuous change. *Revista Iberoamericana de Micología*. 2018;35(4):171–178. DOI: 10.1016/j.riam.2018.07.002.
4. Quindós G., Gil-Alonso S., Marcos-Arias C., Sevillano E., Mateo E., Jauregizar N., Eraso E. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 2019;24(2):172–180. DOI: 10.4317/medoral.22978.
5. Riera F. O., Caeiro J. P., Angiolini S. C., Vigezzi C., Rodriguez E., Ice-ly P. A., Sotomayor C. E. Invasive Candidiasis: Update and Current Challenges in the Management of This Mycosis in South America. *Antibiotics*. 2022;11(7):877. DOI: 10.3390/antibiotics11070877.
6. Vila T., Sultan A. S., Montelongo-Jauregui D., Jabra-Rizk M. A. Oral candidiasis: a disease of opportunity. *Journal of Fungi*. 2020;6(1):15. DOI: 10.3390/jof6010015.
7. Gein V. L., Bobrovskaya O. V., Russkikh A. A., Novikova V. V., Gein O. N., Karpenko Yu. N., Chashchina S. V., Dmitriev M. V., Yankin A. N. Synthesis and biological activity of 5-aryl-N-{4-[(1,3-thiazol-2-yl)sulfamoyl]phenyl}-1-phenylpyrazole-3-carboxamides and their salts. *Russian Journal of General Chemistry*. 2019;89(4):542–551. (In Russ.) DOI: 10.1134/S0044460X19040073.
8. Dmitriev M. V., Ivanov D. V., Igidov N. M., Makhmudov R. R., Novikova V. V., Chernov I. N. Synthesis and biological activity of mono- and dibromo derivatives of 2-amino-5-(2-aryl-2-oxoethylidene)-4-oxo-1n-4,5-dihydrofuran-3-carboxylic acids. *Russian Journal of General Chemistry*. 2018;88(7):1105–1109. (In Russ.) DOI: 10.1134/S0044460X18070089.
9. Novikova V. V., Bobrovskaya O. V., Gein V. L., Seliverstov G. V., Lyust E. N., Makhmudov R. R. Evaluation of the antifungal and antibacterial activity of silver salts of 5,6-diaryl-4-[4-(Acetylamino-sulfonyl)phenyl]-3,5-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-3-ones. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2021;84(9):34–38. (In Russ.) DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-9-34-38.
10. Bonifacio B. V., Machado Vila T. V., Masiero I. F., da Silva P. B., da Silva I. C., de Oliveira Lop T. M. Antifungal activity of a hydroethanolic extract from *Astronium urundeuva* leaves against *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Frontiers in microbiology*. 2019;10:2642. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02642.
11. Gamal A., Chu S., McCormick T. S., Borroto-Esoda K., Angulo D., Ghannoum M. A. Ibrexafungerp, a novel oral triterpenoid antifungal in development: overview of antifungal activity against *Candida glabrata*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2021;11:642358. DOI: 10.3389/fcimb.2021.642358.
12. Wall G., Lopez-Ribot J. L. Screening repurposing libraries for identification of drugs with novel antifungal activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020;64(9). DOI: 10.1128/AAC.00924-20.
13. Shepelin A. P. Current state and trends in the development, production and use of nutrient media. *Bacteriologiya*. 2016;1(1):42–47. (In Russ.) DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-42-47.
14. Bonnet M., Lagie J. C., Raoult D., Khelaifia S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New microbes and new infections*. 2020;34:100622. DOI: 10.1016/j.nmni.2019.100622.
15. Savinov V. A., Ovchinnikov R. S., Kapustin A. V., Laishevtcev A. I., Gulykin A. M. Development of a differential diagnostic nutrient medium for the express diagnosis of animal dermatophytosis. *IOP Publishing*. 2019;315(2):022071. DOI: 10.1088/1755-1315/315/2/022071.
16. Baranova A. A., Georgieva M. L., Bilanenko E. N., Andreev Ya. A., Rogozhin E. A., Sadykova V. S. Antimicrobial potential of alkalophilic micromycetes *Emericella* alkaline. *Applied biochemistry and microbiology*. 2017;53(6):703–710.
17. Mironov A. N., editor. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Moscow: Grif and K; 2012. 944 p. (In Russ.)
18. Gunar O. V., Sakhno N. G., Abramovich R. A. Basics of validation of microbiological methods of pharmaceutical analysis: a textbook. Moscow: RUDN; 2017. 221 p. (In Russ.).