

УДК 615.282.84-547.551.525.211.1

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО СОЕДИНЕНИЯ РЯДА СЕРЕБРЯНЫХ СОЛЕЙ ПИРАЗОЛ-3-КАРБОКСАМИДОВ *IN VITRO*

В.В. Новикова^{1*}, А.А. Русских¹

Резюме. Целью исследования являлось изучение противогрибковой активности нового перспективного соединения ряда пиразол-3-карбоксамидов, содержащего ион серебра, в отношении клинических изолятов *Candida* spp. микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой среде. Представлены результаты углубленного исследования данного соединения в отношении клинических штаммов *Candida albicans* – типичного патогена, вызывающего поверхностный и инвазивный кандидоз, а также в отношении реже встречаемых не-*albicans* видов *Candida* spp., проявляющих резистентность к наиболее часто используемым антимикотикам. Изученное соединение проявило высокую антифунгальную активность, в том числе в отношении полирезистентных клинических изолятов (МПК 0,03–4,6 мг/л).

Ключевые слова: кандидоз, противогрибковая активность, *Candida* spp., серебряные соли пиразол-3-карбоксамидов.

THE INVESTIGATION OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF NEW SILVER SALT OF PYRAZOL-3-CARBOXAMIDES *IN VITRO*

V.V. Novikova^{1*}, A.A. Russkih¹

Abstract. The investigation of the antifungal activity of promising new compound of some pyrazole-3-carboxamides containing the ion of silver, against clinical isolates of *Candida* spp. by means micromethod two-fold serial dilution in liquid medium was the aim of the study. The results of an in-depth study of these compound for clinical strains of *Candida albicans*, a typical pathogen that causes surface and invasive candidiasis, as well as for less frequent non-*albicans* species of *Candida* spp., showing resistance to the most commonly used antimycotics, are presented. The studied compound showed a high antifungal activity, including against multiresistant clinical isolates (MIC of 0.03 to 4.6 mg/l).

Keywords: candidiasis, antifungal activity, *Candida* spp., silver salts of pyrazole-3-carboxamides.

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

1 – Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Health of the Russian Federation, 2, Field str., Perm, 614990, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: vvpperm@yandex.ru
Тел.: 8 (342) 282 09 29

ВВЕДЕНИЕ

Клинические проявления инфекции, вызванной грибами *Candida* spp., разнообразны: от локального поражения слизистых оболочек до тяжелых форм инвазивного кандидоза с полиорганном поражением. Преобладание *Candida albicans* в этиологической структуре поверхностных и инвазивных кандидозов неоспоримо. Однако реже встречающиеся не-*albicans* виды *Candida* spp. – *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* и др. – представляют не меньший интерес для исследований с целью поиска эффективных антифунгальных средств в связи с высокой резистентностью данных видов ко многим используемым антимикотикам [1–3].

Инвазивный кандидоз (ИК) – патология, часто встречаемая у лиц с выраженной иммунодепрессией. По данным Глобального фонда по

борьбе с грибковыми инфекциями (Global Action Fund for Fungal Infections, GAFFI), ежегодно ИК регистрируется у более чем 750 000 человек и является причиной летального исхода у более чем 350 000 человек в мире [4].

Как отмечает А.В. Веселов с соавторами [5], на сегодняшний день имеется четкая тенденция снижения числа случаев ИК, вызванного *C. albicans*, и возрастание частоты выделения не-*albicans* видов. По данным европейских исследователей, доля *C. albicans*, выделенных при ИК, составляет 45,4–70%, *C. glabrata* – 9,0–21,1%, *C. parapsilosis* – 3,7–24,9%, *C. krusei* – 1,6–8%. По данным российского исследования «КРИТ» («Кандидоз в отделениях реанимации и интенсивной терапии»), доля *C. albicans*, выделенных из крови, составила только 48%, на втором и третьем местах по частоте выделения находятся *C. parapsilosis* (17%) и *C. glabrata* (14%).

В случае поверхностных форм кандидозной инфекции, в частности наиболее часто встречаемого вульвовагинального кандидоза, лидирующие позиции в этиологической структуре, помимо *C. albicans* (66–88%), занимает *C. glabrata* (3,6–35,3%), реже встречаются *C. krusei* (2–19%), *C. parapsilosis* (1,8–14,2%) [1–3, 6].

В настоящее время все острее встает проблема резистентности грибковых патогенов к используемым антимикотикам. По данным многоцентрового исследования, проведенного в период 2011–2015 гг. в шести федеральных округах России, резистентность возбудителей ИК к флуконазолу составила 12%, в том числе изолятов *Candida albicans* – 2,3%, не-*albicans* видов *Candida* – 19% [7].

По данным других исследований, показатели чувствительности *C. albicans*, выделенных из секрета влагалища [2], к флуконазолу составили только 61%, все изученные штаммы не-*albicans* видов *Candida* были резистентны к этому препарату. Установлено прогрессивное снижение чувствительности *C. albicans* к флуконазолу со 100% до 70,4% в течение семилетнего периода наблюдения [1]. В работе [8] обсуждаются низкие показатели чувствительности к флуконазолу изолятов *C. albicans*, выделенных от пациенток с вульвовагинальным кандидозом: только у 8 обследованных пациенток из 25 (32%) выделены штаммы *C. albicans*, минимальная подавляющая концентрация (МПК) флуконазола в отношении которых составила 2 мг/л, что в соответствии с критериями EUCAST и CLSI [14, 15] свидетельствует о чувствительности штамма к этому препарату. Остальные штаммы оказались резистентны или имели дозозависимую чувствительность (МПК флуконазола составила 4–128 мг/л).

По результатам наших исследований [3] зафиксированы высокие показатели резистентности изолятов *Candida spp.*, выделенных из отделяемого половых путей, к антимикотикам азолового ряда: 64,8% *C. albicans* были резистентны к клотримазолу, 88,9% – к кетоконазолу, 90,7% – к флуконазолу. Большинство (60–80%) изолятов *C. glabrata* проявили устойчивость к кетоконазолу и флуконазолу. Наиболее высокие показатели резистентности к флуконазолу и кетоконазолу выявлены у *C. krusei* – 100% изолятов.

Таким образом, в настоящее время формируется тенденция к увеличению значимости не-*albicans* видов в этиологии кандидозов. Помимо этого, остро встает проблема множественной резистентности данных патогенов, что определяет необходимость поиска соединений, обладающих противогрибковой активностью в отношении *Candida spp.*

Полученные нами ранее результаты [9, 10] свидетельствуют о возможности поиска эффективного противогрибкового средства среди серебряных солей гетероциклических соединений. Наиболее перспек-

тивным рядом можно рассматривать серебряные соли пиразол-3-карбоксамидов, проявляющих высокую антимикотическую активность в отношении типовых и клинических штаммов *Candida spp.* [11].

Целью данного исследования было изучение антифунгальной активности нового соединения ряда серебряных солей пиразол-3-карбоксамидов в отношении устойчивых изолятов *Candida spp.*

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В соответствии с ранее описанными методиками [11] получено малотоксичное соединение RA-49, содержащее ион серебра.

Исследованы 40 штаммов грибов рода *Candida*, выделенных от пациентов многопрофильных клиник (поликлиники и стационары) г. Перми (биосубстрат – отделяемое влагалища, зева, мокрота, испражнения): 36 штаммов *C. albicans*, 3 штамма *C. krusei*, 1 штамм *C. glabrata*. Для первичной оценки чувствительности выделенных штаммов грибов был использован дискодиффузионный метод – рутинный способ, используемый в практическом здравоохранении. Посевы осуществляли на агар Сабуро (производитель – ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболensk). Использовали диски ДИ-ПЛС-50-01 производства компании ООО «НИЦФ», содержащие 40 мкг амфотерицина В, 40 мкг флуконазола, 10 мкг клотримазола, 80 ЕД нистатина. Инкубированные чашки с дисками инкубировали при температуре 25±1 °С в течение 40–48 ч. Интерпретацию результатов осуществляли в соответствии с инструкцией производителя. В настоящее исследование вошли штаммы, резистентные к одному и более антимикотику.

Исследование противогрибковой активности изучаемого соединения, проявившего высокую антимикотическую активность в отношении типового штамма *C. albicans* ATCC 885-653 (МПК 0,05–0,2 мг/л), по отношению к указанным клиническим штаммам проводили микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде в 96-луночных планшетах, рекомендованным [12–15], чувствительность каждого из штаммов определяли в двух повторах. Посевы осуществляли на среду Сабуро (производитель – ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболensk). Концентрация микробных клеток в опыте составила (2–5)×10⁵ КОЕ/мл. Для положительного контроля использовали питательную среду без противогрибкового препарата с внесенной исследуемой культурой, качество среды контролировали, применяя типовые штаммы микроорганизмов в соответствии с инструкцией по применению. В качестве отрицательного контроля использовали интактную питательную среду. Планшеты инкубировали в термостате при температуре 35±1 °С [13–15]. Оценку роста культур проводили ви-

зуально через 24 часа инкубирования в соответствии с [14]. 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 повторах. В качестве препарата сравнения использовали флуконазол, выбор которого обусловлен его высокой востребованностью в клинической практике.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе настоящего исследования выявлено, что изучаемое соединение проявляет высокую противогрибковую активность в отношении представителей рода *Candida*. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Распределение популяции исследованных клинических изолятов *Candida* spp. по значениям МПК к изученным соединениям

Исследуемые соединения	Количество штаммов с соответствующими МПК (мг/л)										
	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,1	6,2	12,5	25*
Тестируемое соединение	15	2	2	0	2	1	4	4	4	2	4
Флуконазол	0	1	0	0	4	4	5	9	5	3	9

Примечание: * – 25 мг/л и более.

На основании данных о степени чувствительности (распределении значений МПК) можно рассчитать кумулятивные показатели чувствительности популяции штаммов – МПК₅₀ и МПК₉₀, которые могут быть использованы для оценки устойчивости вида к исследуемым препаратам. Установлено, что изученное соединение имеет значения МПК₅₀ и МПК₉₀, превышающие по степени активности препарат сравнения (рисунок 1).

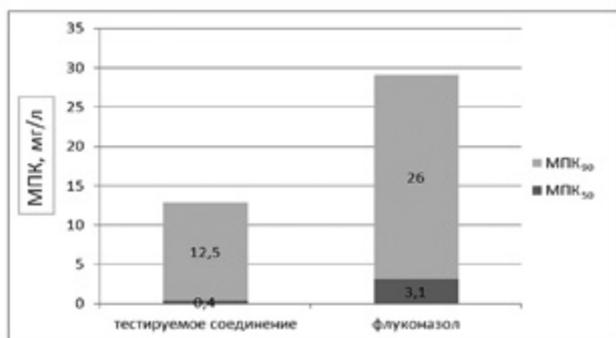


Рисунок 1. Кумулятивные показатели чувствительности популяции штаммов (МПК₅₀ и МПК₉₀) к тестируемому соединению

Ввиду типичной для не-*albicans* штаммов высокой резистентности к используемым антимикотическим

препаратам была проанализирована противогрибковая активность в отношении данных изолятов. Полученные усредненные данные представлены на рисунке 2.

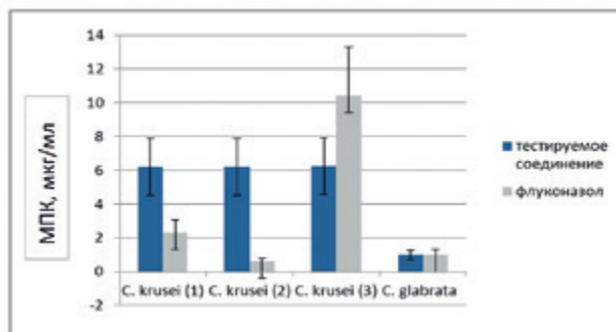


Рисунок 2. Чувствительность клинических изолятов *Candida non-albicans* к тестируемому соединению

Вследствие особой важности проблемы развития множественной устойчивости циркулирующих штаммов грибов к антимикотическим препаратам была изучена противогрибковая активность тестируемого соединения по отношению к 5 полирезистентным (устойчивым к трем и более антимикотикам) изолятам по данным дискодиффузионного метода. Установлено наличие высокой противогрибковой активности по отношению к данным штаммам (таблица 2). Все множественно резистентные штаммы были устойчивы к флуконазолу и амфотерицину, МПК тестируемого соединения же составила 0,03–4,6 мг/л. При этом можно отметить, что МПК в отношении штаммов, резистентных к клотримазолу, выше, чем в отношении изолятов, не проявляющих устойчивости к данному антимикотику.

Таблица 2.

Противогрибковая активность тестируемого соединения по отношению к полирезистентным изолятам *Candida* spp.

Исследуемый клинический штамм	Результаты чувствительности изолятов к противогрибковым препаратам по данным дискодиффузионного метода (диаметр зоны задержки роста, мм)				МПК тестируемого соединения, мг/л
	амфотерицин	нистатин	флуконазол	клотримазол	
<i>C. albicans</i> (1)	13(R**)	16(R)	15(R)	15 (S***)	0,03±0,01
<i>C. albicans</i> (2)	10(R)	17(R)	18(R)	17 (S)	0,03±0,01
<i>C. albicans</i> (3)	11(R)	16(R)	16(R)	15 (S)	0,03±0,01
<i>C. albicans</i> (4)	11(R)	20 (S)	16(R)	11 (R)	3,9±2,3
<i>C. krusei</i>	11(R)	19(S)	16(R)	10 (R)	4,6±1,5

Примечание: ** – резистентен, *** – чувствителен.

Механизм действия изучаемого соединения, возможно, связан с ингибирующим воздействием серебра на ферментные системы микроорганизмов [16]. Согласно литературным данным, атомы серебра способны связываться с тиольными группами некоторых ферментов с формированием сульфидов серебра, что приводит к нарушению метаболизма микроорганизмов [16]. Описано также образование комплексов нуклеиновых кислот с серебром, вследствие чего нарушается пространственная структура ДНК и клетка утрачивает способность к делению [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлено соединение ряда серебряных солей пиразол-3-карбоксамидов, проявляющее высокую антимикотическую активность в отношении полирезистентных штаммов *Candida* spp. представляющее интерес для дальнейшего доклинического исследования: изучения механизма антифунгального действия, скорости формирования резистентности, изучения противогрибковой активности в экспериментах *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. А.С. Анкирская, В.В. Муравьёва, С.А. Фурсова 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. И.О. Малова, Ю.А. Кузнецова. Чувствительность к антимикотикам *Candida* spp., выделенных от пациенток с хроническим рецидивирующим кандидозом урогенитального тракта // Проблемы медицинской микологии. 2013. Т. 15. № 2. С. 103.
3. В.В. Новикова, С.Г. Езов, А.И. Селиванова. Анализ видового состава и чувствительности клинических изолятов *Candida* spp. к современным антимикотикам // Медицинский альманах. 2017. № 2. С. 138–141.
4. Н.В. Васильева, И.В. Выборнова, Е.Р. Рауш. Определение чувствительности возбудителей инвазивного кандидоза к флуконазолу с использованием дисков различных производителей // Проблемы медицинской микологии. 2016. Т. 18. № 2. С. 8–11.
5. А.В. Веселов, Р.С. Козлов. Инвазивный кандидоз: современные аспекты эпидемиологии, диагностики, терапии и профилактики у различных категорий пациентов // Клини. микробиол. и антимикроб. химиотер. 2016. № 18 (2, Прил. 2). С. 1–104.
6. S. Mohanty, I. Xess, F. Hasan, A. Kapil et al. Prevalence & susceptibility to fluconazole of *Candida* species causing vulvovaginitis // Indian J Med Res. 2007. № 126(3). P. 216–219.
7. Е.Р. Рауш. Особенности возбудителей внутрибольничного инвазивного кандидоза: автореф. дис. ... к.мед.н. – СПб.: СЗГМУ им. И.И.Мечникова, 2015. 24 с.
8. D. Marchaim, L. Lemanek, S. Bheemreddy, J. Sobel Fluconazole-Resistant *Candida albicans* Vulvovaginitis // Obstetrics & Gynecology. 2012. V. 120(6). P. 1407–1414.
9. С.В. Ухов, М.Е. Коньшин, В.В. Новикова и др. Синтез и противомикробная активность серебряных солей замещенных амидов 2-иминокумарин-3-карбоновой кислоты // Химико-фармацевтический журнал. 2004. № 4. С.15–16.
10. В.В. Новикова, В.Л. Гейн, О.В. Бобровская Изучение антимикотической активности перспективных соединений ряда серебряных солей пирролопиразолов // Биомедицина. 2017. № 2. С. 66–71.
11. В.В. Новикова, В.Л. Гейн, О.В. Бобровская. Антимикотическая активность новых серебряных солей пиразол-3-карбоксамидов // Проблемы медицинской микологии. 2017. Т. 19. № 3. С. 64–66.
12. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1 / ФГБУ «НЦЭСМП» Министерства здравоохранения РФ. – М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
13. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации. 2015. URL: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/clinical-recommendations> (дата обращения 10.03.2017).
14. CLSI M27-A3. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Third Edition. Approved Standard. CLSI. – Wayne. 2008.
15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2007, EUCAST Definitive Document EDef 7.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts // Clinl Microbiol Infect. 2008. V. 14. P. 398–405.
16. L.N. Lysenkova, I.A. Godovikov, A.M. Korolev, V.N. Danilenko, et al. Synthesis and anti-actinomycotic activity of the thiocyanato derivative of oligomycin A modified in the 2-hydroxypropyl side chain // Macroheterocycles. European Journal of Medicinal Chemistry. 2011. V. 46. P. 423–428.