

УДК 615.285.7:576.8.073.3

ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНОГО ДИАЗИНОНА ПЯТД10

¹А.В. Воронков, ²С.А. Лужнова, ¹И.П. Кодониди, ²Н.М. Габитова,
¹С.А. Ловягина, ¹В.С. Сочнев

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ
Минздрава России, г. Пятигорск

²Научно-исследовательский институт по изучению лепры Минздрава России, г. Астрахань

STUDY FOR ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF PYATD10 DIAZINON DERIVATIVE

¹A.V. Voronkov, ²S.A. Luzhnova, ¹I.P. Kodonidi, ²N.M. Gabitova,
¹S.A. Lovyagina, ¹V.S. Sochnev

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of Volgograd State Medical
University, Pyatigorsk

²Leprosy Research Institute, Astrakhan
E-mail: prohor.77@mail.ru

Проведен анализ антимикобактериальной активности производного диазинона ПЯТd10 и дапсона. Способность соединения ПЯТd10 и препарата дапсон подавлять рост культуры *M.lufu* исследовали методом серийных разведений. Визуальная оценка посевов на среде Школьниковой показала, что при концентрации соединения ПЯТd10 128 мкг/мл роста микобактерий не наблюдается, в то время как минимальная подавляющая концентрация дапсона была равна 32 мкг/мл. При исследовании мазков, окрашенных по Муроhashi, под действием субстанции ПЯТd10 и препарата дапсон в тех же концентрациях, выявлено снижение содержания живых форм микобактерий. При этом доля нежизнеспособных бактерий уменьшается с увеличением разведения, но составляет не менее 35%. Таким образом, соединение ПЯТd10 проявляет антимикобактериальную активность в отношении *M. lufu*, несколько уступая по данному виду активности препарату сравнения дапсон.

Ключевые слова: производное диазинона, дапсон, *M.lufu*, противолепрозная активность.

We have carried out the analysis of antimycobacterial activity of PYATd10 diazinon derivative and dapsone. The capability of PYATd10 compound and dapsone drug to suppress the growth of *M.lufu* culture was studied by the method of serial dilutions. Visual evaluation of inoculations in medium Shkolnikova showed that there was no growth of mycobacteria with PYATd10 concentration 128 µg/ml, while minimum suppressing concentration of dapsone were equal to 32 µg/ml. Examining smears, colored according to Murhashi, under the influence of PYATd10 excipient and dapsone drug in the same concentrations, we have revealed the decrease of mycobacterial living forms content. A share of inviable bacteria decreased after the cultivation intensification, but amounts to less than 35%. Thus, the PYATd10 compound exhibits antimycobacterial activity towards *M. lufu*, being slightly inferior to the dapsone comparative drug by this type of activity.

Keywords: diazinone derivatives, dapsone, *M. lufu*, antileprotic activity.

Лидером среди препаратов, находящихся в современном арсенале противолепрозной терапии, является дапсон. Однако, наряду с высоким терапевтическим действием, препарат обладает рядом негативных эффектов, таких, как гематотоксичность, нейротоксичность, развитие тяжелых аллергических реакций и др. [5]. Кроме этого, по данным ВОЗ у 7-10% больных лепрой регистрируется вторичная, а у 3-4% – первичная резистентность к данному препарату. Таким образом, создаются предпосылки поиска новых лекарственных средств с антимикобактериальной активностью и лучшим профилем лекарственной безопасности.

В связи с этим актуальным является исследование противолепрозной активности нового производного диазинона ПЯТd10, который имеет в своей структуре фрагмент дапсона, что дает основания предполагать наличие у него антимикобактериальных свойств [2,4].

Цель работы – изучение *in vitro* противолепрозной активности производного диазинона ПЯТd10.

Изучение противолепрозной активности ПЯТd10 *in vitro* проводилось на базе ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изучению лепры» Минздрава России, г. Астрахань.

Для проведения первичного скрининга использовали культуру *M. lufu*, полученную от профессора Seydel (Германия), при содействии отдела лепры ВОЗ. Тест – штамм *M. lufu* поддерживался на среде Левенштейна-Йенсена.

Способность производного диазинона ПЯТd10 подавлять рост культуры *M. lufu* исследовали методом серийных разведений на среде Школьниковой, используемой для культивирования *M. tuberculosis* [1,3].

Метод серийных разведений предполагает создание последовательных разведений вещества в питательной среде. В данном исследовании концентрация изучаемого соединения в ряду серийных разведений убывала в геометрической прогрессии с коэффициентом 2. Навеска субстанции (4мг) растворялась в 0,5 мл димексида, затем туда вносили 4,5 мл физиологического

раствора, получая рабочий раствор с концентрацией 800 мкг/мл, из которого на среде Школьниковой готовили разведения, содержащие активное вещество в концентрациях 128 мкг/мл, 64 мкг/мл, 32 мкг/мл, 16 мкг/мл, 8 мкг/мл, 4 мкг/мл, 2 мкг/мл, 1мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл. Контролем служила пробирка, содержащая среду Школьниковой без исследуемых соединений, а также ряд серийных разведений препарата дапсон.

Для приготовления взвеси микобактерий использовали двухнедельную культуру *M. lufu*, синхронизированную холодом (+4⁰С) в течение 72 часов. Микобактериальную суспензию определённой плотности, соответствующую стандарту мутности 5 по McFarland, по 0,2 мл вносили в каждую пробирку ряда последовательных разведений изучаемых веществ, включая контроли. Посевы инкубировали в течение 10 дней при температуре +31 °С. По истечении этого срока визуально оценивали наличие роста в каждой из пробирок. Первую наименьшую концентрацию субстанции, при которой не определялся бактериальный рост, считали минимальной подавляющей концентрацией (МПК). После этого из каждой пробирки на среду Левенштейна-Йенсена высевали 0,05 мл суспензии с целью определения жизнеспособности *M. lufu*. После посева на жизнеспособность содержимое пробирок центрифугировали (1500 об/мин в течение 10 минут). Осадок делили на две части для окрашивания по методу Циля-Нильсена на кислотоустойчивость и методу Murohashi для определения соотношения жизнеспособных и «мертвых» бактерий [1].

В мазках, окрашенных по Цилю – Нильсену, просматривали 20 полей зрения, определяли соотношение кислотоустойчивых (КУМ) и некислотоустойчивых форм (НКУМ). В мазках, окрашенных по Murohashi, также просматривали 20 полей зрения, в которых определялось процентное содержание «живых» *M. lufu*. При окраске по методу Murohashi «живые» микобактерии приобретали зеленый цвет, несмотря на дополнительную окраску фуксином, сохраняли его. Погибшие клетки теряли эту

способность и имели красный цвет. В зависимости от соотношения «живых» и «мертвых» *M.lufu* в мазке судили о характере действия соединения.

Посевы на среде Левенштейна-Йенсена инкубировали в течение 10 дней при температуре +31 °С, после чего на косяке плотной среды оценивали наличие и интенсивность роста колоний. Минимальной бактерицидной концентрацией (МБК) соединения считали то его количество, после инкубации с которым на среде Левенштейна-Йенсена роста колоний *M.lufu* не наблюдалось [1].

Для статистической обработки данных использовали программу «BioStat 2009».

Визуальная оценка посевов на среде Школьниковой показала, что под действием дапсона среда оставалась прозрачной при концентрациях 128 – 32 мкг/мл, далее наблюдали появление роста. В рядах пробирок с разведениями субстанции ПЯТd10 неполную прозрачность среды наблюдали уже при концентрациях 64 – 32 мкг/мл. При увеличении разведения отмечали интенсивное помутнение, что дало основание предполагать активизацию роста микобактерий, обусловленную снижением активности производного относительно тест-штамма при меньших концентрациях (таблица 1).

Таблица 1 – Показатели визуальной оценки активности соединения ПЯТ d10 в отношении роста *M. lufu* (среда Школьниковой)

Субстанции	Концентрация субстанции, мкг/мл									
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Дапсон	-	-	-	+	+	+	++	+++	+++	+++
ПЯТ d10	-	+-	+-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Примечание: «-» - полная прозрачность среды; «+-» - неполная прозрачность среды; «+» - слабый рост; «++» - умеренный рост; «+++» - интенсивный рост.

Первичная (визуальная оценка) позволила определить МПК производного диазинона ПЯТd10 – 128 мкг/мл, в то время как для дапсона МПК была равна 32 мкг/мл.

Анализ мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену, показал, что доля КУМ в ряду разведений ПЯТd10 (по результатам 6 пересевов) составила при концентрации активного вещества 128 мкг/мл $25,4 \pm 3,2\%$, достигала $35,7 \pm 2,2\%$ при 32 мкг/мл, а при его дальнейшем снижении повышалась до $50,4 \pm 1,4\%$ – $52,6 \pm 3,8\%$ и оставалась таковой даже при минимальной концентрации.

При исследовании мазков, окрашенных по Murohashi, под действием субстанций ПЯТd10 выявлено снижение содержания живых форм микобактерий. Доля нежизне-

способных бактерий уменьшалась с увеличением разведения: насчитывалось от $20 \pm 1,1\%$ (при самых высоких концентрациях соединений) до $65,3 \pm 5,1\%$ (при минимальной концентрации) жизнеспособных форм.

Оценка наличия и интенсивности роста *M. lufu* на среде Левенштейна – Йенсена показала, что в ряду посевов с ПЯТd10 (n=6) при концентрациях 128 – 64 мкг/мл видимый рост колоний отсутствует, однако среда изменила цвет. Далее, соответственно разведениям, наблюдали увеличение интенсивности роста: от единичных до многочисленных, но атипичных колоний, образующих сплошной массив на косяке среды. Результаты исследования согласуются с полученными ранее данными [3].

Выводы

В результате исследования установлено, что новое производное диазинона - ПЯТd10 проявляет как бактериостатические, так и бактерицидные свойства в отношении *M. lufu* в концентрации 128 мкг/мл, в то время как препарат сравнения дапсон оказал бактериостатическое действие уже при 32 мкг/мл.

Исходя из того, что исследуемое соединение ПЯТd10 оказало как бактериостатическое, так и бактерицидное действие, в то время как дапсон оказал лишь бактериостатический эффект, можно предположить, что производные диазинона являются перспективным направлением поиска фармакологически активных субстанций с антимикобактериальной активностью.

Библиографический список

1. Иртуганова, О.А. Использование M.lufu для первичного отбора противолепрозных препаратов / О.А. Иртуганова, Н.Г. Урляпова // В кн.: Актуальные вопросы лепрологии. – Астрахань, 1984. – С.147-150.
2. Кодониди, И.П. Молекулярное конструирование N-замещенных производных 1,3-диазинона-4 // Фармация. – 2010. – №1. – С. 36-40.
3. Оценка антимикобактериальной активности некоторых новых производных диазинона / С.А. Лужнова, Н.М. Габитова, А.В. Воронков и др. // Фундаментальные исследования. – 2015. – №2, ч.11. – С. 2377-2380.
4. Синтез и противовоспалительная активность амидов антраниловой кислоты с фрагментами сульфаниламидов и дапсона/ В.С. Сочнев, И.П. Кодониди, Э.Т. Оганесян и др.// Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. – Пятигорск, 2013. – Вып.68. – С. 344-346.
5. Wozel, Gottfried. Dapsone in dermatology and beyond / Gottfried Wozel, Christian Blasum // Arch. Dermatol. Res. – 2014. – Vol. 306(2). – P. 103-124.

* * *

Воронков Андрей Владиславович – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: поиск веществ, обладающих эндотелиопротективной активностью, разработка путей фармакологической коррекции состояний, возникающих у лиц, испытывающих постоянное экстремальное физическое и психоэмоциональное напряжение, в том числе в спорте высоких достижений, правовые аспекты спортивной медицины, инновационные подходы в сфере постдипломного образования специалистов. E-mail: prohor.77@mail.ru.

Лужнова Светлана Алексеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научно-исследовательский институт по изучению лепры Минздрава России. Область научных интересов: поиск и разработка субстанций синтетического, растительного, животного, минерального происхождения, обладающих антибактериальной активностью, поиск корректоров дапсон-индуцированных нарушений, оптимизация схем противолепрозной терапии. E-mail: s.luzhnova@yandex.ru.

Кодониди Иван Панайотович – доктор фармацевтических наук, доцент кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: исследования в области поиска и целенаправленного синтеза новых биологически активных веществ в ряду производных 1,3-диазинона-4, изучение взаимосвязи «структура – биологическая активность». E-mail: sochnevad@gmail.com.

Габитова Нармина Муталлимага-кызы – младший научный сотрудник Научно-исследовательский институт по изучению лепры Минздрава России. Область научных интересов: поиск веществ, обладающих антибактериальной активностью, микробиологическая оценка эффективности применяемых антибактериальных препаратов в области лепрологии. E-mail: narmina85@inbox.ru.

Ловягина Светлана Александровна – аспирант кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: поиск веществ, обладающих противолепрозной активностью, изучение острой и хронической токсичности соединений, изучение противовоспалительных свойств соединений. E-mail: Svetalov91@mail.ru.

Сочнев Вадим Сергеевич – аспирант кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: синтез новых биологически активных соединений и изучение взаимосвязи «структура – биологическая активность» в ряду серосодержащих производных 1,3-диазинона-4 и их ациклических предшественников. E-mail: sochnevvad@gmail.com.