

УДК 615.285.7:576.8.073.3

## ОЦЕНКА АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДИАЗИНОНА

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

<sup>1</sup>ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изучению лепры» Минздрава России,  
Астрахань, e-mail: s.luzhnova@yandex.ru;

<sup>2</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ  
Минздрава России, Пятигорск

Проведён первичный скрининг некоторых новых производных диазинона. В связи с тем, что микобактерии лепры на питательных средах до настоящего времени вырастить не удаётся, для проведения исследования использованы *M. lufu*, имеющие идентичную с *M. leprae* чувствительность к антибактериальным препаратам. Способность ряда производных диазинона под шифрами ПЯТd1, ПЯTs2, ПЯTs6, ПЯТd10 подавлять рост культуры *M. lufu* исследовали методом серийных разведений на среде Школьникова. МПК производных диазинона ПЯТd1 и ПЯTs2 составила 8–16 мкг/мл и была сопоставима с МПК дапсона – основного противолепрозного препарата. В рядах разведений ПЯТd1 и ПЯTs2 в интервале концентраций 128–16 мкг/мл отсутствовали кислотоустойчивые формы, что было идентично при анализе соответствующих проб с дапсоном. С уменьшением концентраций всех субстанций содержание КУМ в пробах возрастало, но не превышало 50%. Наблюдали снижение содержания живых микобактерий. Доля нежизнеспособных форм уменьшалась с увеличением разведения и составляла при минимальных концентрациях 50–60%, в то время как в контроле (без воздействия) она не превышала 8–10%. По результатам исследования более активными и перспективными для дальнейших исследований оказались соединения ПЯТd1, ПЯTs2.

**Ключевые слова:** скрининг, новые производные диазинона, *M. lufu*, противолепрозная активность, минимальная подавляющая концентрация, минимальная бактерицидная концентрация

## EVALUATION OF ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY OF SOME NEW DERIVATIVES OF DIAZINON

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

<sup>1</sup>Leprosy Research Institute Ministry of Health Russia, Astrakhan, e-mail: s.luzhnova@yandex.ru;  
<sup>2</sup>Pyatigorsk medic-pharmaceutical Institute, branch of VolgGMU Ministry of Health Russia, Pyatigorsk

Primary screening of some new derivatives of diazinon was conducted. Due to the fact that Mycobacterium leprae in nutrient media so far fail to grow, *M. lufu* are used for research. *M. lufu* has identical sensitivity with *M. leprae* to antimicrobial agents. The ability of some derivatives of diazinon under ciphers PYaTd1, PYaTs2, PYaTs6, PYaTd10 to inhibit the growth culture *M. lufu* was investigated by serial dilutions in medium Shkolnikova. Minimum inhibitory concentration of derivatives of diazinon PYaTd1 and PYaTs6 was 16 mcg/ml and was comparable with the minimum inhibitory concentration of dapsone – main drug for the treatment of leprosy. Acid-forms were absent in the series of dilution PYaTd1 PYaTs2 concentration range 128–16 mcg/ml, which was identical to the analysis of the corresponding test with dapsone. With a decrease of concentrations of all substances content of acid-resistant mycobacteria in tests increases, but does not exceed 50%. It was found to decrease the numbers of living mycobacteria. Percentage of non-viable forms decreased with increasing dilution and was at minimum 50–60%, while in the control is not exceeded 8–10%. According to research derivatives PYaTd1, PYaTs2 are more active and perspective for further research.

**Keywords:** screening, new derivatives of diazinon, *M. lufu*, activity against leprosy, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration

До настоящего времени препараты сульфонового ряда остаются основными и самыми эффективными для лечения больных лепрой, хотя факт развития у *M. leprae* лекарственной резистентности теперь уже не только общепризнан, но и является, ввиду отсутствия других эффективных средств, способных заменить дапсон, значимой проблемой, требующей решения. Одним из путей решения является целенаправленный поиск высокоэффективных и безопасных соединений, обладающих высокой

антимикобактериальной активностью, синтезированных посредством использования комплексного подхода к молекулярному конструированию для получения биологически активных соединений с заданными фармакологическими свойствами [2]. В связи с этим нами был проведён *in vitro* первичный скрининг некоторых производных диазинона, синтезированных сотрудниками кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ МЗ РФ.

### Материалы и методы исследования

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 ряда производных диазинона под шифрами ПЯТd1, ПЯТs2, ПЯТd10 подавлять рост культуры *M. lufu* исследовалась методом серийных разведений [4] на среде Школьниковой, используемой для культивирования *M. tuberculosis*.

Сущность метода серийных разведений заключается в создании последовательных разведений вещества в питательной среде (в порядке геометрической или арифметической прогрессии). В наших опытах концентрация изучаемых соединений в ряду серийных разведений убывала в геометрической прогрессии с коэффициентом 2. Навеска каждой из субстанций (4 мг) 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 активные субстанции в концентрациях 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25 мкг/мл. Контролем служила пробирка, содержащая среду Школьниковой без исследуемых соединений, а также ряд серийных разведений препарата дапсона – основного препарата, применяемого при лечении лепры.

Для приготовления взвеси микобактерий использовали двухнедельную культуру *M. lufu*, синхронизированную холодом (+4°C) 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 контроль. Посевы инкубировали в течение 10 дней при температуре +31°C. По истечению 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 [3].

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 зелёный 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°C, 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.

### Результаты исследования и их обсуждение

Известно, что вырастить микобактерии лепры на питательных средах до настоящего времени не удаётся, поэтому необходим подбор из числа культивируемых бактерий тест-штамма, идентичного с *M. leprae* по чувствительности к антибактериальным препаратам. На плотных питательных средах *M. lufu* даёт рост через 4–6 недель при оптимальной температуре 31°C. Кинетика бактериального роста *M. lufu* в присутствии отдельных антибактериальных препаратов делает возможным использование этой культуры в качестве модели для исследования противолепрозной активности субстанций в опытах *in vitro* [1, 6, 7].

Визуальная оценка посевов на среде Школьниковой показала, что под действием субстанции ПЯТd1 в диапазоне концентраций 128–8 мкг/мл среда остаётся прозрачной, что предполагает практическое отсутствие роста бактерий. По мере снижения её содержания в пробирках отмечали наличие мутности до полной потери прозрачности среды (табл. 1), что было сопоставимо с действием дапсона – основного противолепрозного препарата.

Субстанция ПЯТs2 полностью подавляла рост культуры при первых четырёх разведениях, далее, по мере снижения её концентрации, наблюдали появление роста от слабого до интенсивного (табл. 1). По активности ПЯТs2 незначительно уступала препарату сравнения.

При анализе разведений с субстанцией ПЯТd10 выявлено, что среда в пробирках в диапазоне концентраций 128–32 мкг/мл оставалась прозрачной, при уменьшении содержания вещества наблюдали резкое помутнение среды, что свидетельствовало об увеличении интенсивности роста тест-культуры (табл. 1).

В рядах пробирок с разведениями субстанций ПЯТs6 неполную прозрачность среды наблюдали уже при концентрациях 64–32 мкг/мл, при снижении концентрации наблюдали интенсивный рост тест-культуры, что свидетельствовало о меньшей антимикобактериальной активности соединения (табл. 1).

Таблица 1

Показатели визуальной оценки активности субстанций 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	–	–	–	–	–	+	++	+++	+++	+++
ПЯТd1	–	–	–	–	–	+	+++	+++	+++	+++
ПЯTs2	–	–	–	–	+	++	+++	+++	+++	+++
ПЯTs6	–	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ПЯТd10	–	–	–	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Пр и м е ч а н и я : «–» – полная прозрачность среды; «+–» – неполная прозрачность среды; «+» – слабый рост; «++» – умеренный рост; «+++» – интенсивный рост.

Первичная (визуальная оценка) позволила определить МПК исследованных производных диазинона: для ПЯТd1 она составила 8 мкг/мл, для ПЯTs2 – 16 мкг/кг, ПЯТd10 – 32 мкг/мл, для ПЯTs6 – 128 мкг/мл, в то время для дапсона МПК была равна 8 мкг/мл, что свидетельствовало о сопоставимой активности первой пары субстанций и о меньшей, в сравнении с дапсоном, второй.

Анализ мазков, окрашенных по Цилю – Нильсену, показал, что в рядах разведений субстанций ПЯТd1 и ПЯTs2 в интервале концентраций 128–16 мкг/мл отсутствуют кислотоустойчивые формы, что было идентично при анализе соответствующих проб с дапсоном. С понижением концентраций действующих веществ содержание КУМ в пробах возрастало, но даже при самом большом разведении не превышало 50%. Субстанции ПЯTs6 и ПЯТd10 оказались менее активными. Доля КУМ в ряду разведений ПЯТd10 повышалась от 35 до 60%, а ПЯTs6 от 35 до 98% при концентрациях 128–0,25 мкг/мл соответственно.

При исследовании мазков, окрашенных по Муроhashi, выявлено снижение содержания живых форм микобактерий под действием всех исследованных субстанций. Доля нежизнеспособных бактерий уменьшалась с увеличением разведения как изучаемых производных диазинона, так и дапсона и составляла при минимальных концентрациях 50–60%, в то время как в контроле (без воздействия) она не превышала 8–10%. По характеру воздействия субстанция ПЯТd1 была сопоставима с дапсоном, ПЯTs2 начиная с концентрации 4 мкг/мл была менее активна: содержание жизнеспособных форм возрастало в 2–3 раза. В рядах разведений соединений ПЯTs6 и ПЯТd10 насчитывалось от 20% (при самых высоких концентрациях соединений) до 65–70% (при

минимальной концентрации) жизнеспособных форм.

Оценка наличия и интенсивности роста *M. lufu* на среде Левенштейна – Йенсена показала его полное отсутствие в пробирках, куда была пересеяна культура после предварительной инкубации на среде Школьниковой с субстанцией ПЯТd1 в диапазоне концентраций 128–8 мкг/мл (табл. 2). При применении концентраций 4,0–0,25 мкг/мл наблюдали рост атипичных колоний (от слабой до средней интенсивности соответственно повышению разведения субстанции). МБК соединения ПЯTs2 оказалась равной 128 мкг/кг, в диапазонах концентраций 64–8 мкг/мл выявлены единичные атипичные колонии, с уменьшением концентрации субстанции интенсивность роста увеличивалась (табл. 2). В посевах с соединением ПЯTs6 абсолютного бактерицидного действия не выявили: в диапазоне концентраций 128–32 мкг/мл отмечали рост единичных атипичных колоний, а далее – сплошной рост атипичных мелких колоний. В ряду посевов с ПЯТd10 при концентрациях 128–64 мкг/мл видимого роста колоний не выявлено, однако среда изменила цвет. Далее, соответственно разведениям, наблюдали повышение интенсивности роста: от единичных до многочисленных атипичных колоний, образующих сплошной массив на косяке среды (табл. 2).

Таким образом, новые производные диазинона ПЯТd1, ПЯTs2, ПЯTs6 и ПЯТd10 проявляют как бактериостатические, так и бактерицидные свойства в отношении *M. lufu* – тестовой культуры для оценки противолепрозной активности субстанций. Наиболее активными в исследованиях *in vitro* оказались ПЯТd1, ПЯTs2, что предполагает перспективность их дальнейших исследований в эксперименте.

Таблица 2

Показатели визуальной оценки активности субстанций в отношении роста *M. lufu* (среда Левенштейна – Йенсена)

Субстанции	Кол-во серий посевов (n)	Концентрация субстанции, мкг/мл									
		128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Дапсон	6	–		+				++++			
				АК				АК			
ПЯТd1	7	–					++		+++		
							АК		АК		
ПЯТd10	6	–		+	+++	++++					
				АК	АК	АК					
ПЯТs2	7	–	+				+++				
			АК				АК				
ПЯТs6	6	+			++++						
		АК			АК						

Примечания: «–» – отсутствие колоний; «+» – единичные колонии; «++» – ≤ 50%, «+++» – ≤ 75%; «++++» – ≤ 100% заселения площади косяка; АК – атипичные колонии.

### Список литературы

- Иртуганова О.А., Урляпова Н.Г. Использование *M. lufu* для первичного отбора противолепрозных препаратов // Актуальные вопросы лепрологии. – Астрахань, 1984. – С. 147–150.
- Кодониди, И.П. Молекулярное конструирование N-замещенных производных 1,3-диазинона-4 // Фармация. – 2010. – № 1. – С. 36–40.
- Малая медицинская энциклопедия. – М.: Медицина, 1991–1996.
- Навашин С.М., Фомин И.П. Справочник по антибиотикам. – М.: Медицина, 1974. – С. 54.
- Оганесян Э.Т. Целенаправленный поиск веществ с заданными фармакологическими свойствами / Э.Т. Оганесян, И.П. Кодониди, Л.П. Смирнова и др. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2009. – № 2. – С. 37–40.
- Portaels F. Unclassified Mycobacterial Strains Susceptible to Dapsone Isolated from the Environment in Central Africa // Int. J. Lepr. – 1980. – Vol. 48. – P. 330–331.
- Seydel J.K. Bacterial Growth Kinetics of «*M. lufu*» in the Presence and Absence of Various Drugs Alone and in Combination. A Model for the Development of Combined Chemotherapy Against *M. leprae*? // Int. J. Lepr. – 1982. – Vol. 50. – P. 20–30.

### References

- Irtuganova O.A., Urlyapova N.G. Ispolzovanie *M. lufu* dlya pervichnogo otbora protivoleproznykh preparatov // Aktual'nye voprosy leprologii. Astrakhan, 1984, pp. 147–150.

2. Kodonidi, I.P. Molekulyarnoe konstruirovaniye N-zameshchennykh proizvodnykh 1,3-diazinona-4 // Farmatsiya. 2010. no. 1. pp. 36–40.

3. Malaya meditsinskaya entsiklopediya. M.: Meditsina, 1991–1996.

4. Navashin S.M., Fomin I.P. Spravochnik po antibiotikam. M.: Meditsina, 1974, pp. 54.

5. Oganeyan E.T. Tselenapravlennyi poisk veschestv s zadannymi farmakologicheskimi svoystvami / E.T. Oganeyan, I.P. Kodonidi, L.P. Smirnova i dr. // Kubanskiy nauchniy meditsinskiy vestnik. 2009. no. 2. pp. 37–40.

6. Portaels F. Unclassified Mycobacterial Strains Susceptible to Dapsone Isolated from the Environment in Central Africa // Int. J. Lepr. 1980. Vol. 48, pp. 330–331.

7. Seydel J.K. Bacterial Growth Kinetics of «*M. lufu*» in the Presence and Absence of Various Drugs Alone and in Combination. A Model for the Development of Combined Chemotherapy Against *M. leprae*? // Int. J. Lepr. 1982. Vol. 50, pp. 20–30.

### Рецензенты:

Сопрунова О.Б., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой прикладной биологии и микробиологии, ФГБОУ ВПО «Астраханский государственный технический университет», г. Астрахань;

Доркина Е.Г., д.б.н., доцент, заведующая кафедрой биологической химии и микробиологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.

Работа поступила в редакцию 01.04.2015.