



В. Ю. Євсюкова

ДУ «Інститут мікробіології
та імунології
імені І.І. Мечникова
АМН України», м. Харків

© В. Ю. Євсюкова

ПЕРСПЕКТИВИ 7-АЗАКУМАРИНІВ У ПОДОЛАННІ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ПРИ НОЗОКОМІАЛЬНИХ ГРИБКОВИХ ІНФЕКЦІЯХ

Резюме. Дослідження формування резистентності сполук 7-азакумаринів відносно референтного тест-штаму *Candida albicans* ATCC 885-653 проводилося за методом пасажів. Результати досліджень свідчать про перспективність подальшого вивчення властивостей 7-азакумаринів із метою створення на їх основі ефективних протигрибкових засобів для лікування і профілактики грибкових захворювань.

Ключові слова: похідні 7-азакумаринів, *Candida spp.*, фунгістатична активність.

Вступ

Високий рівень госпітальної захворюваності і летальності від внутрішньолікарняних інфекцій, а також великі економічні витрати, до яких вони призводять, дають підстави розглядати боротьбу з ними як одну з найважливіших проблем у галузі охорони здоров'я. За останні роки збільшується частота розвитку нозокоміальних інфекцій, які частіше за все спричинені резистентною флорою. Формуванню резистентних штамів значною мірою сприяють нераціональні підходи до проведення дезінфекційних заходів у лікарняних закладах, в яких використовується обмежена кількість дезінфектантів, знижена концентрація діючих речовин у робочих розчинах, порушена технологія проведення дезінфекції, спостерігаються неправильне приготування, застосування та неналежне зберігання робочих розчинів дезінфекційних засобів [7]. Нозокоміальна флора інфікує тканини під час або після операцій, а також у процесі лікування у відділеннях хірургічного профілю та інтенсивної терапії і відрізняється резистентністю до багатьох існуючих протимікробних препаратів. Госпітальні інфекції виникають у 5—17% стаціонарних хворих [2, 3, 5].

Серед основних факторів, які призводять до розвитку грибкових уражень у пацієнтів хірургічних відділень, необхідно відзначити розширення оперативних втручань, трансплантацію органів, широке застосування внутрішньосудинних катетерів, призначення антибіотиків широкого спектра, парентеральне живлення, застосування жирових емульсій, тривалу протипухлинну терапію тощо.

Гриби є складовою частиною нормальної мікрофлори шлунково-кишкового тракту. Використання антибіотиків широкого спектра відіграє важливу роль у пригніченні конкурентної ендогенної мікрофлори, що сприяє активному розмноженню грибів і стає основною причиною стрімкого поширення грибової інфекції [2, 6]. За даними офіційної статистики, в теперішній час частота грибових інфекцій зросла до 25% [6, 8]. В Україні захворюваність на грибові ін-

фекції становить 31% [3, 6]. Саме збудники грибових захворювань все частіше стають причиною нозокоміальних інфекцій [4]. Збільшення частки виникнення грибової нозокоміальної інфекції відзначається у хворих хірургічних відділень і пацієнтів з інтенсивною терапією. Найчастіше збудниками нозокоміальних грибових інфекцій є гриби роду *Candida* [5, 6]. Серед збудників кандидозної інфекції домінує *Candida albicans*, хоча в останні роки реєструється невпинне зростання ролі інших видів грибів роду *Candida*, так званих *Candida non-albicans*. Частка основних представників *Candida non-albicans* (*Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*) складає 30% від усіх представників роду *Candida* — збудників грибових інфекцій, які найчастіше висіваються у хворих хірургічного профілю, особливо серед пацієнтів відділень реанімації та інтенсивної терапії [8].

За даними Національної системи нагляду за нозокоміальними інфекціями (NNIS), відомо, що тривале застосування судинних катетерів є причиною, що призводить до розвитку тяжких інфекційних ускладнень грибової етіології. У хворих із центральними судинними катетерами фунгімія та системний кандидоз виявляються у 3 рази частіше, ніж у пацієнтів без них. При цьому у 72% пацієнтів виділяється *Candida spp.* [2]. Установлено, що існує взаємозв'язок між розвитком системного кандидозу, який спричинений *Candida parapsilosis*, із застосуванням судинних катетерів [2, 3]. У глюкозовміщуючих розчинах штами *Candida parapsilosis* активно розмножуються та продукують велику кількість слизоподібної речовини, що пояснює наявність адгезивних властивостей цього збудника щодо пластикових поверхонь із наступним розвитком фунгімії. Відомо, що представники *Candida spp.* можуть спричинити розвиток гнійних периферійних кандидозних тромбофлебітів, виникнення яких пов'язано з попередньою колонізацією шкіри грибами, порушенням правил догляду за місцем встановлення периферійних венозних катетерів та гематогенною диссемінацією збудників з інших вогнищ

запалення, що сприяє розвитку місцевої інфекції з наступним ураженням венозної судини. Тому при виділенні з крові хворого *Candida spp.* потрібно негайно вилучати усі венозні катетери.

Грибкові ускладнення можуть розповсюджуватися також екзогенним шляхом. У ряді досліджень було встановлено, що інфікування збудниками *Candida spp.* може здійснюватися через руки медперсоналу, які колонізовані кандидами приблизно у 40% медичних працівників хірургічних відділень та інтенсивної терапії [12, 15].

Candida spp. займає четверте місце після *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* і *Enterococcus spp.* серед збудників нозокоміальної ангіогенної інфекції, і перше місце при урогенітальних інфекціях [8, 13]. Госпітальні штами *Candida spp.* характеризуються високою стійкістю до антимікотичних хіміопрепаратів [13, 14].

Призначення антимікотиків при тяжкому перебігу інфекційного процесу, що супроводжується вираженим септичним процесом, має бути терміновим, незважаючи на використання антибактеріальної терапії широкого спектра [7]. На сьогодні існує досить великий арсенал протимікробних засобів, активних відносно збудників кандидозу. Найширше у хірургії та інтенсивній терапії використовують препарати «Амфотерицин В» і «Флуконазол». Амфотерицин В — полієновий антибіотик, який має широкий спектр дії відносно різних штамів *Candida spp.*, окрім *Candida lusitanae*, та досить активно застосовується у хірургічній практиці та інтенсивній терапії з метою запобігання патологічної колонізації грибів [2, 5]. Проте амфотерицин В є високотоксичним, його застосування супроводжується пошкодженням каналцевого апарату нирок, через що його призначають у випадках кандидозної інфекції, резистентної до флуконазолу [2]. Для профілактики грибкових ускладнень лікарі широко використовують ністатин і леворин, але слід зазначити, що полієнові антибіотики для перорального застосування мало всмоктуються з кишечника. Тому спектр застосування їх досить вузький [2]. Одним із основних препаратів для лікування кандидозної інфекції є флуконазол, але проблемою при його використанні може стати розвиток резистентності у грибів роду *Candida albicans* і *Candida parapsilosis*. Крім того, флуконазол не діє на *Candida krusei* і *Candida glabrata*.

Безконтрольне використання протигрибкових препаратів є причиною розвитку кандидорезистентних штамів до антимікотиків. Тому в умовах розповсюдження антибіотикорезистентності постійно триває пошук нових протигрибкових засобів і розробляються шляхи та засоби цілеспрямованого синтезу антифунгальних речовин. Перспективними у плані пошуку високоактивних сполук із протигрибковими властивостями є синтетичні похідні 7-азакумаринів та їх гетероаналоги, які залишаються в наш час мало

вивченими. У попередніх роботах нашими пілотними дослідженнями похідних 7-азакумаринів було встановлено їх високу антифунгальну активність щодо збудників грибкових інфекцій [9]. У рамках подальшого вивчення властивостей похідних 7-азакумаринів *метою роботи* стало дослідження можливості формування стійкості грибів роду *Candida albicans* та *Candida spp.* до похідних 7-азакумаринів.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були синтетичні похідні 7-азакумаринів та їх гетероаналоги, що були синтезовані у харківському Національному фармацевтичному університеті МОЗ України на кафедрі органічної хімії. Сполуки, що вивчалися, за хімічною будовою були умовно розподілені на п'ять груп. Залежно від радикалу, що вони містять, сполукам були надані власні коди. Як розчинник використовували поліпропіленгліколь, вихідні речовини доводили до концентрації 1 мг/мл.

Вплив синтетичних похідних 7-азакумаринів та їх гетероаналогів на формування резистентності у грибів роду *Candida* досліджували *in vitro* за методом пасажів. Дослідження проводили за допомогою тест-штаму *Candida albicans* ATCC 885-653, що були надані Філією музею мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І.І.Мечникова АМН України». При дослідженні визначалася кратність збільшення мінімальної фунгістатичної концентрації (МФстК) на п'ятому, десятому, п'ятнадцятому, двадцятому, двадцять п'ятому та тридцятому пасажах.

При дослідженні формування резистентності мікроорганізмів, як препарат порівняння, використовували відомий протигрибковий антибіотик «Ністатин». Загалом було виконано по 30 пасажів мікроорганізмів на м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) з додаванням найбільш перспективних досліджуваних сполук. МПБ розливали по 2 мл в пробірки, в які додавали розчини речовин, що вивчалися, у поєднанні з препаратом контролю. Після цього додавали тест-мікроорганізми в об'ємі 0,2 мл з посівною дозою 10^5 колонієутворюючих одиниць на мл (КУО). Інкубували дослідні пробірки протягом 24 годин у термостаті при температурі 37°C. Матеріалом для кожного наступного пасажу була культура, що давала зростання на середовищі, в якому міститься найбільша кількість препарату. Культури мікроорганізмів виділяли з однієї мікробної клітини, що утворювала колонію на твердому поживному середовищі. Мікробне навантаження до музейного штаму становило 10^5 КУО/мл. Усі дослідження проводили у п'яти повтореннях.

Результати дослідження та їх обговорення

Дослідження формування резистентності *Candida albicans* ATCC 885-653 до нових похідних 7-азакумаринів було проведено в лабораторії про-



тимікробних засобів ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова АМН України» на сполуках найбільш активних щодо даного штаму з груп: похідних 5-гідроксиметил-2-іміно-8-метил-2*H*-пірано[2,3-*c*]піридин-3-*N*-арикарбоксамідів (сполуки 1(3)), похідних 2-*N*²-ариліміно-5-гідроксиметил-8-метил-2*H*-пірано[2,3-*c*]піридин-3-*N*¹-арикарбоксамідів (сполуки 2(2)) та похідних 2-*N*²-ариліміно-3-*N*¹-арилкарбоксамідо-8-метил-2*H*-пірано[2,3-*c*]піридин-5-іл)-метилацетатів (сполуки 5(5)).

Вихідні МФстК усіх досліджених сполук до початку експерименту дорівнювали 12,5 мкг/мл, а препарату — 50,0 мкг/мл. Формування резистентності штаму *Candida albicans* ATCC 885-653 до сполук 1(3), 2(2) та 5(5) відбувалося повільно, але нерівномірно. Після п'ятого та десятого пасажів вихідна МФстК не зростала у жодній з трьох досліджених сполук. Після п'ятнадцяти пасажів вихідна МФстК сполуки 5(5) продовжувала зберігатися на вихідному рівні, а у сполук 1(3) та 2(2) вона зросла у два рази. Чутливість *Candida albicans* ATCC 885-653 до сполуки 1(3) до двадцяти п'ятого пасажу не змінювалася та лише після тридцяти пасажів було зареєстровано зростання МФстК у чотири рази до 50,0 мкг/мл. Чутливість *Candida albicans* ATCC 885-653 до сполуки 2(2) після двадцяти пасажів зросла у чотири рази, після двадцяти п'яти пасажів зростання МФстК даної сполуки не спостерігалось та після тридцяти пасажів МФстК зросла у порівнянні із вихідним рівнем у вісім разів до 100,0 мкг/мл. МФстК сполуки 5(5) до п'ятнадцятого пасажу залишалася на вихідному рівні 12,5 мкг/мл. Лише після двадцяти пасажів чутливість *Candida albicans* ATCC 885-653 до сполуки 5(5) зросла у два рази (МФстК 25,0 мкг/мл), після двадцяти п'яти пасажів вона залишалася на такому ж рівні. Після тридцяти пасажів МФстК сполуки 5(5) зросла у чотири

рази і після завершення експерименту досягла 50,0 мкг/мл.

Вихідна МФстК ністатину для штаму *Candida albicans* ATCC 885-653 становила 50,0 мкг/мл. Після п'ятого пасажу вона зросла у два рази, а до десятого — перевищувала вихідний рівень у чотири рази. Після п'ятнадцятого пасажу МФстК ністатину зросла у вісім разів, після двадцятого у шістнадцять, після двадцяти п'ятого у 32 рази та залишалася на цьому рівні (1 600,0 мкг/мл) до закінчення експерименту.

Таким чином, до всіх відібраних сполук формування резистентності *Candida albicans* ATCC 885-653 відбувалося дуже повільно. По завершенні експерименту після тридцяти пасажів МФстК сполуки 2(2) зросла у вісім разів. Найбільш повільний процес формування резистентності штаму *Candida albicans* ATCC 885-653 спостерігався до сполук 5(5) та 1(3), МФстК яких по завершенні експерименту зросли лише у чотири рази. Чутливість *Candida albicans* ATCC 885-653 до ністатину знижалась набагато швидше, по завершенні експерименту після тридцяти пасажів МФстК ністатину знизилась у тридцять два рази.

Висновки

1. При багаторазових пересівах тест-штаму *Candida albicans* ATCC 885-653 на середовищах, що містили зростаючі концентрації досліджених сполук, було встановлено повільне формування резистентності у збудника грибкових інфекцій до похідних 7-азакумаринів.

2. Результати проведених досліджень свідчать про перспективність подальших досліджень антифунгальних властивостей 7-азакумаринів із метою створення на їх основі ефективних проти-грибкових засобів для лікування нозокоміальних грибкових інфекцій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Березняков И.Г. Инфекции и антибиотики / И.Г. Березняков. — Харьков: Константа, 2004. — 448 с.
2. Лупальцев В.И. Актуальные вопросы в решении проблемы внутригоспитальной инфекции / В.И. Лупальцев // Укр. журнал хірургії. — 2008. — №1. — С. 26—28.
3. Багирова Н.С. Дрожжевые грибы: идентификация и резистентность к противогрибковым препаратам в онкогематологическом стационаре / Н.С. Багирова, Н.В. Дмитриева // Инфекции и антимикробная терапия. — 2001. — Т. 3, №6. — С. 178—182.
4. Гельфанд Б.Р. Кандидозная инфекция в хирургии и интенсивной терапии / Б.Р. Гельфанд, В.А. Гологорский, Е.Б. Гельфанд // Инфекции и антимикробная терапия. — Т. 2, №1. — С. 92—93.
5. Клясова Г.А. Микотические инфекции: клиника, диагностика, лечение / Г.А. Клясова // Инфекции и антимикробная терапия. — 2000. — Т. 6, №6. — С. 184—189.
6. Нозокомиальная грибковая инфекция в хирургии и интенсивной терапии: состояние проблемы / Б.Р. Гельфанд, В.А. Гологорский, Е.Б. Гельфанд, Г.В. Лисенко // Consilium Medicum. — 2001. — Т. 3, № 11.
7. Сергеев А.Ю. Кандидоз. Природа инфекции, механизмы агрессии и защиты, лабораторная диагностика, клиника и лечение / А.Ю. Сергеев. — М., 2000. — 472 с.
8. Таран В. Дезінфектологічні аспекти проблеми / В.Таран // СЕС профілактична медицина. — 2007. — №4. — С. 54—57.
9. 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. — №1. — P. 14—16.
10. *Candida* infection: Outcome and Attributable ICU Costs in Critically Ill Patients / R. K. Pelz, S. W. Hendrix, S. M. Swoboda [et al.] // Intensive Care Med. — 2000. — Vol.15. — P. 542—547.

11. *Fluconazole* therapy for *Candida albicans* urinary tract infections in infants / V. Triolo, M. Gari-Toussaint, F. Casagrande [et al.] // *Pediatr. Nephrol.* — 2002. — Vol. 17, № 7. — P. 550—553.

12. *Fungal Infections in Patients with Severe Acute Pancreatitis and the Use of Prophylactic Therapy* / J. Waele, D. Vogelaers, S. Biot [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* — 2003. — Vol. 37. — P. 208—213.

13. *Prolonged fluconazole prophylaxis is associated with persistent protection against candidiasis-related*

death in allogeneic marrow transplant recipients: long-term follow-up of randomized, placebo-controlled trial / K. A. Marr, K. Seidel, M. A. Slavin [et al.] // *Marr, — Blood.* — 2000. — Vol. 96. — P. 2055—2061.

14. *Schwartz B.S.* Daptomycin treatment failure for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* infective endocarditis: impact of protein binding / B. S. Schwartz // *Pharmacother.* — 2008. — Vol. 42. — P. 289—290.

15. *Wey S.B.* A guide to infection Control in the hospital / S. B. Wey, B. Furgi // *BC. Desker.Ink.* — 1998. — P. 154—158.

ПЕРСПЕКТИВИ 7-АЗАКУМАРИНОВ В ПРЕОДОЛЕННІ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ПРИ НОЗОКОМІАЛЬНИХ ГРИБКОВИХ ІНФЕКЦІЯХ

В. Ю. Евсюкова

Резюме. Исследование формирования резистентности соединений 7-азакумаринов относительно референтного тест-штамма *Candida albicans* ATCC 885-653 проводилось методом пассажей. Результаты исследований показали перспективность дальнейшего изучения особенностей 7-азакумаринов с целью создания на их основе противогрибковых средств для лечения и профилактики грибковых заболеваний.

Ключевые слова: производные 7-азакумаринов, *Candida spp.*, фунгистатическая активность.

PROSPECTS OF 7-AZACUMARINES IN OVERCOMING ANTIBIOTICS RESISTENS AT NOZOKOMIAL MYCOTIC INFECTIONS

V. Yu. Evsyukova

Summary. Research of forming of resistants of connections of 7-azacumarines in relation to a reviewer test-culture *Candida albicans* ATSS 885-653 was conducted the method of arcades. The results of researches showed perspective of further study of features of 7-azacumarines with the purpose of creation on their basis of antimycotic facilities for treatment and prophylaxis of mycotics diseases.

Key words: derivatives of 7-azacumarines, *Candida spp.*, fungistatic activity.