

З. С. Суворова, Н. О. Вринчану

Антифунгальна дія сполуки КВМ-194 на моделі інфікування зразків нігтьових пластинок *Aspergillus niger*

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: антифунгальна дія, похідне арилаліфатичних аміноспиртів, оніхомікоз, *Aspergillus niger*

Онїхомікози є досить складною для лікування проблемою, їхня частка в загальній патології нігтьової пластинки складає близько 25–30 %. Онїхомікози обумовлюють близько 50 видів патогенних й умовно-патогенних грибів: у першу чергу дерматомицети роду *Trichophyton*, дріжджоподібні гриби роду *Candida*, міцеліальні (*Scopulariopsis spp.*, *Scytalidium spp.*, *Acremonium spp.*, *Fusarium spp.*) та інші гриби [1–4]. Основними збудниками ураження нігтів є дерматомицети, їхня частка за онїхомікозів складає 76,9–91,3 %, інших міцеліальних грибів – 8–14 %, дріжджоподібних – 0,7–8,3 %. Відмічається зростання ролі грибів роду *Aspergillus* в етіології онїхомікозів, що створює проблеми в діагностиці та лікуванні [5].

На розвиток мікотичної інфекції впливають різні фактори: здоров'я людини, зокрема, стан імунної системи, наявність супутніх захворювань, вік тощо. Так, онїхомікози виявляють у 67,0 % пацієнтів з імуносупресією, у 26,0 % хворих на цукровий діабет, у 30 % людей старшого віку (> 60 років) [6]. За аналізу спектра збудників встановлено, що тільки в 0,8 % пацієнтів онїхомікози були зумовлені дерматофітами (моноінфекція), у більшості випадків (45,7 %) відмічалось поєднання дерматомицетів та інших грибів, у 3,7 % – приєднуються дріжджоподібні гриби [7].

Передумовою розвитку мікозів може бути механічна травма та порушення бар'єрної функції епітелію. Одним з найважливіших факторів, який призводить до виникнення та розвитку

онїхомікозу, є порушення кровообігу кінцівок, що може бути зумовлено серцевою недостатністю, облітеруючим ендартеріїтом, варикозом вен, синдромом Рейно, лімфостазом тощо. Так, онїхомікози стоп виявлені в 38 % хворих з хронічною венозною недостатністю [8].

Протягом останнього десятиліття відбулися певні зміни в підходах до терапії онїхомікозів, зокрема, використовуються нові антифунгальні препарати системної дії – тербінафін з класу алліламінів, ітраконазол та флуконазол – з класу тріазолів [9–11]. Проте, незважаючи на застосування в клінічній практиці таких ефективних лікарських засобів, у частини хворих результат лікування залишається незадовільним. У багатьох випадках неефективність проведеної терапії може бути пов'язана з відсутністю впливу на супутні чинники, що сприяють розвитку онїхомікозу (порушення кровообігу, іннервації, ендокринного статусу, функції імунної системи), в інших випадках це зумовлено проявами побічних ефектів медикаментозних засобів, а також відмовою від проведення антифунгальної терапії. Недостатня ефективність проведеної терапії часто пов'язана з резистентністю збудників до сучасних антифунгальних препаратів [12].

Враховуючи вищезазначене, актуальним є пошук нових сполук з антифунгальною дією та розробка на їхній основі ефективних і безпечних лікарських препаратів. У цьому плані на увагу заслуговують похідні арилаліфатичних аміноспиртів. Представники цієї групи сполук проявляють широкий спектр фармакологічної активності – адреноблокуючу [13–15], антибактеріальну [16], антифунгальну [17], противірусну

дію [18], антиоксидантний [19], імуномодулюючий [20, 21], мембраностабілізуючий [19], нейропротекторний ефекти [22].

Мета дослідження – вивчити антифунгальний ефект похідного арилаліфатичних аміноспиртів КВМ-194 за умови мікотичного ураження нігтьової пластинки.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на взірці зрізаної нігтьової пластинки, ураженої *Aspergillus niger* (модель інфікування зразків нігтьової пластинки) [23], з використанням нового похідного арилаліфатичних аміноспиртів – сполуки КВМ-194.

Експерименти проведені з використанням зрізаних нігтів у здорових добровольців. Усі нігтьові пластинки перевірено на відсутність мікотичного ураження (промиті дистильованою водою, простерилізовані в УФ-камері протягом 30 хв та проінкубовані на паперовому фільтрі, змоченому 0,9 % фізіологічним розчином протягом 20 діб за 28 °С у стерильних чашках Петрі).

Ефективність сполуки КВМ-194 досліджували за такими схемами:

- профілактичною – сполуку вносили в рідке поживне середовище Сабуро з взірцем зрізаної нігтьової пластинки, одноразово за 1 год до інфікування;
- лікувально-профілактичною – сполуку вносили одноразово в рідке поживне середовище Сабуро, одночасно з інфікуванням взірця зрізаної нігтьової пластинки;
- лікувальною – сполуку вносили одноразово через 3 доби після інфікування зразків нігтьової пластинки.

Взірці нігтьових пластинок перенесли в стерильні бокси з рідким поживним середовищем Сабуро в об'ємі 2,0 мл і наносили на них сполуку КВМ-194 у відповідних концентраціях. У дослідженнях використані 0,25 %, 0,10 % і 0,05 % розчини сполуки КВМ-194.

Експерименти проведено з використанням 3-добової культури *A. niger*, вирощеної на щільному поживному середовищі Сабуро. Посівна доза становила 10^5 конідій/мл. Щільність інокуляту оцінювали спектрофотометрично. Термін інкубації – 7 днів за температури 30 °С. Ефективність сполуки КВМ-194 визначали візуально й оцінювали за наявністю/відсутністю росту *A. niger* на взірцях зрізаних нігтьових пластинок. Спостереження проводили щоденно. На 3, 4, 5, 6 і 7 добу робили фотографії взірців нігтьової пластинки, використовуючи світловий мікроскоп ZEISS Primo Star (Zeiss, Німеччина), та висівали з поверхні на щільне середовище Сабуро.

Досліди супроводжувались відповідними контролями: контроль за станом інтактних зразків нігтьової пластинки; контроль за ростом культури на взірці нігтьової пластинки в рідкому середовищі Сабуро без сполуки. Експерименти були проведені в трьох повторах.

Результати та їх обговорення. Відсутність мікотичного ураження на зрізах здорових нігтів підтверджено мікроскопічно (рис. 1 А). Інтактний зразок нігтьової пластинки був без механічних пошкоджень, гіфи та конідії не виявлено.

Інфікований *A. niger* взірець нігтьової пластинки на 3 добу спостереження

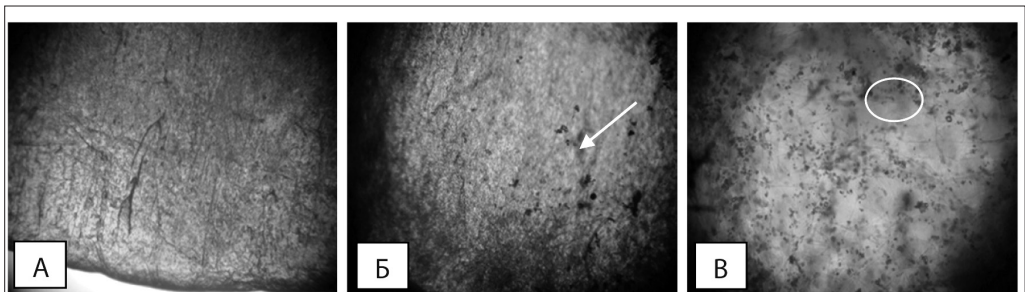


Рис. 1. Мікроскопія нігтьових зрізів: А – інтактний нігтьовий зріз; Б – інфікований нігтьовий зріз, 3 доба спостереження; В – інфікований нігтьовий зріз, 7 доба спостереження. Світлова мікроскопія, об. $\times 40$

Примітка. «↑» – гіфи міцелію гриба, «О» – конідієносці з конідіями.

був вкритий гіфами міцелію, конідії та конідієносці не виявлялись (рис. 1 Б). На 4 та 5 добу спостереження відмічається формування конідієносців з конідіями на гіфах гриба *A. niger*, були наявні різоморфи – скупчення паралельно орієнтованих гіф свідчить про посилення адаптації гриба до мінімізованого субстрату росту. На 6 та 7 добу спостерігали помірний конідіогенез за наявності скупчення пігментованих конідій, які мали субсферичну або еліпсоїдальну форму (рис. 1 В).

Дані щодо ефективності похідного арилаліфатичних аміноспиртів КВМ-194 за профілактичного режиму на моделі інфікування зразків нігтьових пластинок *A. niger* наведено на рисунку 2.

Результати проведених експериментів (рис. 2) свідчать, що сполука КВМ-194 у профілактичному режимі виявляє антифунгальний ефект, у концентрації розчину 0,05 % на 3 добу спостереження на зразках нігтьових пластинок гіфи гриба не виявляються. На 4 добу має місце розвиток міцелію, на 5–7 добу інтенсивність росту сягає рівня контролю.

За одноразового нанесення на взірці нігтьових пластинок сполуки КВМ-194 у концентрації розчину 0,1 % ріст *A. niger* на зразках не виявлявся впродовж перших 6 діб. На 7 добу експерименту відмічається поява поодиноких гіф міцелію гриба *A. niger* (рис. 2).

Таким чином, проведені експерименти свідчать, що сполука КВМ-194 у профілактичному режимі за одноразового застосування попереджує інфікування взірців нігтьової пластинки *A. niger*. Тривалість інгібуючого ефекту складає 3 доби та 6 діб у разі застосу-

вання 0,05 і 0,1 % розчинів сполуки відповідно.

Отримані результати лікувально-профілактичної ефективності похідного арилаліфатичних аміноспиртів КВМ-194 на моделі інфікування зразків нігтьових пластинок *A. niger* наведено на рисунку 3.

Отримані дані свідчать, що 0,05 % розчин сполуки КВМ-194 затримує ріст гриба на 3 доби. На 5–6 добу експерименту спостерігається поява поодиноких гіф міцелію (рис. 3). Разом з тим слід відмітити, що сполука в зазначеній концентрації затримує час утворення міцелію; розгалуження гіф і початок конідієгенезу відбувається тільки на 7 добу.

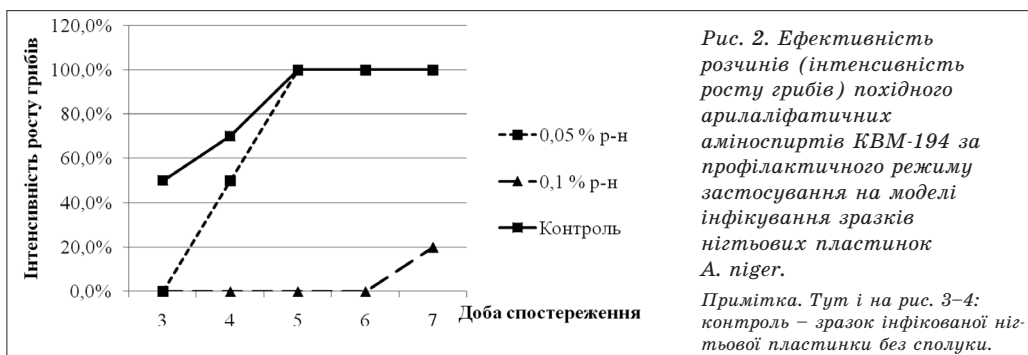
Розчин сполуки КВМ-194 у концентрації 0,1 % проявляє інгібуючу дію, ріст гриба *A. niger* не спостерігається впродовж 5 діб спостереження. На 6–7 добу за мікроскопії на взірцях нігтьових пластинок відмічається поява поодиноких гіф, починає формуватися міцелій (рис. 3).

Таким чином, проведені експерименти на моделі інфікованих зразків нігтьових пластинок *A. niger* свідчать про наявність лікувально-профілактичного ефекту 0,1 % розчину сполуки КВМ-194.

Результати дослідження ефективності похідного арилаліфатичних аміноспиртів КВМ-194 у лікувальному режимі відображені на рисунку 4.

Дані, наведені на рисунку 4, свідчать, що взірець нігтьової пластинки, інфікований *A. niger*, на 3 добу після інфікування вкритий гіфами міцелію, конідії відсутні.

Розчин сполуки КВМ-194 у концентрації 0,1 % затримував ріст, впливав



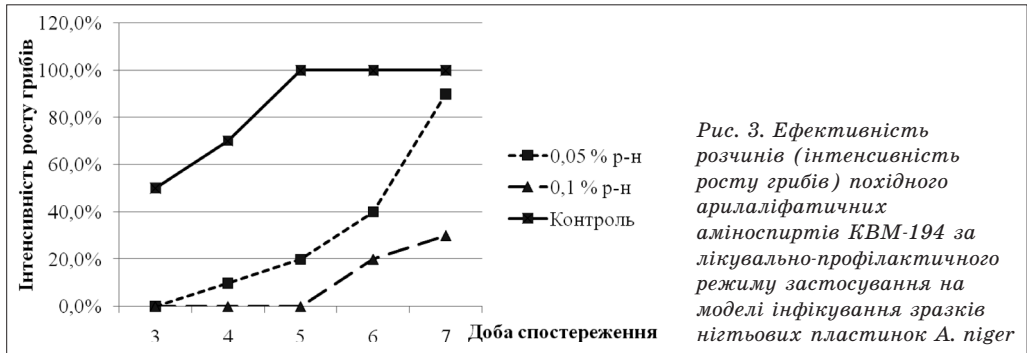


Рис. 3. Ефективність розчинів (інтенсивність росту грибів) похідного арилаліфатичних аміноспиртів КВМ-194 за лікувально-профілактичного режиму застосування на моделі інфікування зразків нігтьових пластинок *A. niger*

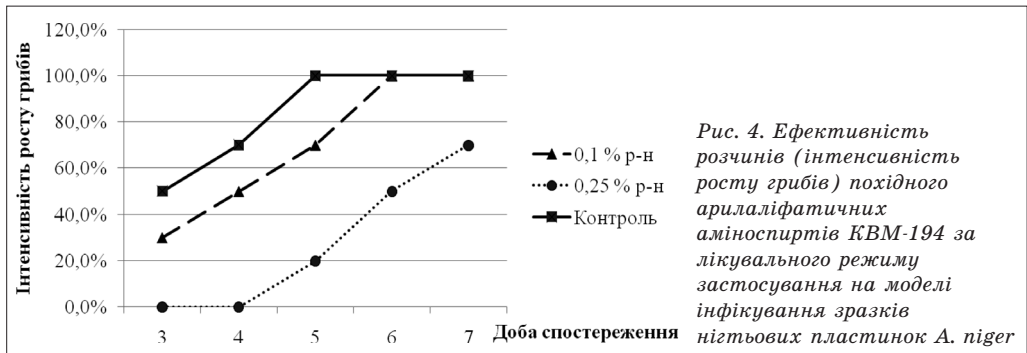


Рис. 4. Ефективність розчинів (інтенсивність росту грибів) похідного арилаліфатичних аміноспиртів КВМ-194 за лікувального режиму застосування на моделі інфікування зразків нігтьових пластинок *A. niger*

на формування міцелію та конідій; впродовж перших 2 діб після внесення ці грибні елементи не утворювались. З третьої доби ріст гриба *A. niger* відновлюється (рис. 4). Упродовж 4 і 5 доби реєструвалося збільшення кількості та щільності міцелію *A. niger*, а на 6–7 добу (рис. 4) спостерігали повноцінний ріст міцелію та формування конідій культури гриба.

У разі нанесення на зразок нігтьової пластинки 0,25 % розчину сполуки КВМ-194 розвиток міцелію гриба *A. niger* не спостерігається впродовж 4 діб, лише на 5 добу відновлюється ріст міцелію гриба. Упродовж 6 та 7 доби реєструвалося збільшення кількості та щільності міцелію гриба (рис. 4). 0,25 % розчин сполуки КВМ-194 порушує структуру гіф та затримує конідогенез гриба *A. niger*.

Таким чином, проведені експерименти свідчать, що сполука КВМ-194 за одноразового внесення в інкубаційне середовище зі зразками нігтів, інфікованих *A. niger*, у концентрації розчину 0,1 % призводить до пригнічення життєдіяльності гриба впродовж 2 діб, у концентрації 0,25 % – 4 діб.

Отже, отримані дані демонструють, що нове похідне арилаліфатичних амі-

носпиртів КВМ-194 виявляє виразну антифунгальну дію за умов застосування для попередження розвитку мікозу та його лікування. Перспективність ряду похідних арилаліфатичних аміноспиртів як нових антифунгальних засобів потребує проведення поглиблених досліджень антимікробної активності, зокрема, визначення їхньої активності відносно дерматоміцетів.

Висновки

1. Сполука КВМ-194 проявляє виразну антифунгальну активність, попереджує інфікування взірців нігтьової пластинки *A. niger*, тривалість ефекту складає 3 та 6 діб залежно від концентрації.
2. За умов лікувально-профілактичного режиму застосування сполука КВМ-194 (0,1 % розчин) порушує ріст гриба *A. niger*; упродовж 5 діб спостереження гіфи міцелію та конідії на нігтьових зрізах не утворюються.
3. Сполука КВМ-194 (0,1 і 0,25 % розчини) виявляє антифунгальні властивості за лікувального режиму застосування, затримку росту *A. niger* спостерігали впродовж 2 і 4 діб відповідно.

1. Ариевич А. М. Патология ногтей / А. М. Ариевич, Л. Т. Шецирули. – Тбилиси, 1976. – С. 294.
2. Клиническая дерматовенерология. Руководство для врачей в 2 т.; под ред. Ю. К. Скрипкина, Ю. С. Бутова. – Москва : Изд-во ГЭОТАР-Медиа, 2009. – Т. 1. – С. 720; Т. 2. – С. 928.
3. Рукавишникова В. М. Микозы стоп / В. М. Рукавишникова. – Москва : «Эликс Ком», 2003. – С. 330.
4. Сергеев А. Ю. Грибковые инфекции (руководство для врачей) / А. Ю. Сергеев, Ю. В. Сергеев. – Москва, 2003. – С. 185–193.
5. Беличков А. Н. Опыт лечения онихомикоза орунгалом методом пульс-терапии / А. Н. Беличков // Рос. журн. кож. и вен. бол. – 2001. – № 2. – С. 38–40.
6. Иванова Ю. А. Клинические особенности микозов стоп, кистей и онихомикозов у ВИЧ-инфицированных пациентов / Ю. А. Иванова, О. В. Райденко // Проблемы медицинской микологии. – 2011. – Т. 13, № 4. – С. 18–12.
7. Коляденко В. Г. Плісеневі гриби – етіопатогенетичне значення у виникненні та розвитку мікозів. Міф чи реальність? Еволюція наукових досліджень / В. Г. Коляденко, В. І. Степаненко // Укр. журн. дерматол., венерол., косметол. – 2001. – № 1. – С. 41–48.
8. Онихомикозы: современные представления об этиологии, эпидемиологии, методах терапии (огляд літератури) [Електронний ресурс] / Т. В. Медведева, Л. М. Леина – Режим доступу: <http://www.rusmedserv.com/mycology/html/onihomic.htm>.
9. Сергеев Ю. В. Онихомикозы. Грибковые инфекции ногтей / Ю. В. Сергеев, А. Ю. Сергеев. – Москва : Гэотар медицина, 1998. – 126 с.
10. Рукавишникова В. М. Микозы стоп / В. М. Рукавишникова. – Москва : МСД, 1999. – 317 с.
11. Скрипкин Ю. К. Результаты клинического изучения дифлюкана у больных онихомикозом / Ю. К. Скрипкин, Ж. В. Степанова, И. А. Воробьева // Вестн. дерматол. и венерол. – 2001. – № 2. – С. 63–65.
12. Медведева Т. В. Сравнительная характеристика системных антимикотиков в терапии микозов кистей и стоп с онихомикозом: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук: спец. 03.00.24 «Микология» 14.00.11 «Кожные и венерические болезни» / Медведева Татьяна Владимировна; ГОУ ДПО «Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования МЗ Российской Федерации». – Санкт-Петербург, 2004. – 24 с.
13. Pat. № 1098642 USA. Diamino-propanol-compounds for treating ischemia / Subroto Chatterjee; – заявитель Johns Hopkins University. – № 19990937409; заявл. 22.06.1999; опубл. 4.03.2007.
14. Vanillylamide-based propanolamine derivative displays alpha/beta-adrenoceptor blocking and vasodilating properties / J. L. Yeh, J. R. Wu, C. C. Chiu [et al.] // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2002. – V. 39, № 6. – P. 803–813.
15. Варатян Р. С. Синтез новых потенциальных β-адреноблокаторов аминoproпанолевого ряда / Р. С. Варатян, Э. А. Адамян, М. А. Шейранян // Химический журнал Армении. – 2003. – Т. 56, № 3. – С. 87–91.
16. Pat. № WO/2007/058639. Antibacterial agents / Yerramilli V S N Murthy; – заявитель Idexx Lab Inc, Yerramilli V S N Murthy. – № PCT/US2005/029602; заявл. 23.08.2005; опубл. 4.10.2007.
17. Kondoh O. Piperazine propanol derivative as a novel antifungal targeting 1,3-beta-D-glucan synthase / O. Kondoh, Y. Inagaki, H. Fukuda [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2005. – V. 28, № 11. – P. 2138–2141.
18. DiCuollo C. J. The metabolism of 3-((5-methyl-5H-as-triazino(5,6-b)-indol-3-yl)amino)-1-propanol (SK&F 21687). A Potent antiviral / C. J. DiCuollo [et al.] // Xenobiotica. – 1973. – V. 3, № 3. – P. 171–178.
19. Антиоксидантные и антирадикальные свойства новых аминокислотных производных аминоспиртов / М. Г. Малакян, Л. А. Вардеванян, Д. Э. Егизарян [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Т. 44, № 8. – С. 19–21.
20. Pat. № 20110118210, USA. Aminopropanol derivatives / Albert Rainer, Francotte Eric, Zecri Frederic, Zollinger Markus. – № US 13/015,825; заявл. 28.08.2003; опубл. 19.05.2011.
21. Pat. № 7625950, USA. Amino-propanol derivatives as sphingosine-1-phosphate receptor modulator / Hinterding Klaus, Spanka Carsten, Zecri Frédéric. – № US 10/554556; заявл. 29.03.2004; опубл. 1.12.2009.
22. Пат. № 23451, Україна. Засіб для лікування порушень пам'яті / Зайцев Л. М., Короткий Ю. В., Красавцев І. І. [та ін.]. – № 94063487; заявл. 16.06.1994; опубл. 29.12.1999, Бюл. № 8.
23. Онихомикоз (диагностика, этиология, эпидемиология, лечение) / А. В. Руденко, Э. З. Коваль, П. П. Рыжков, Е. А. Заплавская. – Киев : ЧП ВМБ, 2007. – 302 с.

З. С. Суворова, Н. О. Вринчану

Антифунгальна дія сполуки KBM-194 на моделі інфікування зразків нігтьових пластинок *Aspergillus niger*

Дослідження антифунгального ефекту розчинів похідного арилаліфатичних аміноспиртів KBM-194 проводили на взірці зрізаної нігтьової пластинки, ураженої *Aspergillus niger* (модель інфікування зразків нігтьової пластинки).

Встановлено, що сполука KBM-194 на моделі інфікування зразків нігтьових пластинок *Aspergillus niger* виявляє ефективність у профілактичному, лікувально-профілактичному та лікувальному режимах.

Внесення розчинів сполуки KBM-194 в інкубаційне середовище за одну годину до інфікування взірців нігтьових пластинок затримує ріст та розмноження гриба упродовж 3 діб та 6 діб за концентрації

0,05 і 0,1 % відповідно. У разі дослідження розчинів сполуки КВМ-194 у лікувально-профілактичному режимі (внесення одночасно з інфікуванням) у концентрації 0,1 % розвиток гриба не спостерігається впродовж 5 днів, за 0,05 % – реєструється порушення утворення міцелію, розгалуження гіф і конідіогенезу. У лікувальному режимі (внесення сполуки через 3 доби після інфікування) розчини сполуки КВМ-194 пригнічують ріст гриба упродовж 2 діб – за концентрації 0,1 %, понад 4 доби – за концентрації 0,25 %.

Проведені експерименти свідчать про перспективність похідних арилаліфатичних аміноспиртів як нових антифунгальних засобів і необхідність проведення поглиблених досліджень антимікробної дії сполуки КВМ-194, зокрема, визначення її активності відносно дерматомицетів.

Ключові слова: антифунгальна дія, похідне арилаліфатичних аміноспиртів, оніхомікоз, *Aspergillus niger*

З. С. Суворова, Н. А. Врынчану

Антифунгальное действие соединения КВМ-194 на модели инфицирования образцов ногтевых пластинок *Aspergillus niger*

Исследование антифунгального эффекта растворов производного арилалифатичных аминспиртов КВМ-194 проводили на срезах ногтевой пластинки, пораженной *Aspergillus niger* (модель инфицирования образцов ногтевой пластинки).

Установлено, что соединение КВМ-194 на модели инфицирования образцов ногтевых пластинок *Aspergillus niger* проявляет эффективность в профилактическом, лечебно-профилактическом и лечебном режимах.

Внесение растворов соединения КВМ-194 в инкубационную среду за один час до инфицирования срезов ногтевых пластинок задерживает рост и размножение гриба на протяжении 3 и 6 суток при концентрации 0,05 и 0,1 % соответственно. При исследовании растворов соединения КВМ-194 в лечебно-профилактическом режиме (внесение одновременно с инфицированием) в концентрации 0,1 % развитие гриба не наблюдается на протяжении 5 дней, при 0,05 % – регистрируется нарушение образования мицелия, разветвления ги́ф и конидиогенеза. В лечебном режиме (внесение соединения через 3 суток после инфицирования) соединение КВМ-194 подавляет рост гриба на протяжении 2 суток – при концентрации 0,1 %, более 4 суток – при концентрации 0,25 %.

Проведенные эксперименты свидетельствуют о перспективности производных арилалифатичных аминспиртов в качестве новых антифунгальных средств и необходимости проведения углубленных исследований антимикробного действия соединения КВМ-194, в частности, определение активности относительно дерматомицетов.

Ключевые слова: антифунгальное действие, производное арилалифатических аминспиртов, онихомикоз, *Aspergillus niger*

Z. S. Suvorova, N. A. Vrynchanu

Antifungal activity of the compound KVM-194 in a model of infection of nail plate samples by *Aspergillus niger*

Investigation of the antifungal activity of solutions of the derivative of arylaliphatic aminopropanols KVM-194 was carried out on the nail plate samples by infected *Aspergillus niger* (model of infection of nail plate samples).

The data obtained suggest the compound KVM-194 efficacy in a model of infection of nail plate samples by *Aspergillus niger*. Compound was tested in the preventive, «treatment-preventive» and treatment regimens.

1 hour exposure of 0,05 % and 0,1 % KVM-194 prior inoculation resulted in the inhibition of *A. niger* growth on the nail plate samples for 3 and 6 days respectively. Investigation of KVM-194 action in the «treatment-preventive» regimen (compound was added simultaneously with inoculum) showed alterations of mycelium formation, hyphal branching and conidiogenesis at the 0,05 %. Increase of a concentration to the 0,1 % led to the inhibition of fungal growth during 5 days. KVM-194, tested in the treatment mode (compound was added 3 days after infection), inhibited fungal growth for 2 days at the 0,1 %; the effect of KVM-194 at 0,25 % lasted more than 4 days.

The results obtained indicate the promises of arylaliphatic aminopropanol derivative as a new antifungal compound as well as the prospects of the further investigation of the KVM-194 antimicrobial effect, particularly, its action on dermatomycetes.

Key words: antifungal action, derivative of arylaliphatic aminopropanols, onychomycosis, *Aspergillus niger*

Надійшла: 21 листопада 2017 р.

Контактна особа: Суворова Зінаїда Сергіївна, молодший науковий співробітник, лабораторія фармакології протимікробних засобів, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 83 32.
Електронна пошта: suvorovazina@gmail.com