

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СУЛЬФАНИЛАМИДА И ДИАМИНОПИРИМИДИНА

**Букреева Е.М., Лосицкая О.С., Зими́на Я.В., Самохвалова И.В., Самофалов А.С.,
Завидовская К.В., Краснов А.А.**

ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия, e-mail: btf@pochta.ru

Проблема лечения гнойно-септических заболеваний далека от разрешения и в современных условиях представляет определенные трудности в связи с появлением резистентных и полирезистентных форм микроорганизмов к имеющимся антибактериальным препаратам. В последние годы повысился интерес к наиболее рациональному использованию уже известных лекарственных средств, а также к возможности их химической модификации. Поэтому целью исследования явилось изучение биологической активности производных сульфаниламида и диаминопиримидина *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: инфицированная рана, антимикробные препараты, химическая модификация.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF SOME SULFONAMIDES AND DERIVATIVES DIAMINOPYRIMIDINA

**Bukreyeva E.V., Lositskaya O.S., Zimina Y.V., Samokhvalova I.V., Samofalov A.S.,
Zavidovskaya K.V., Krasnov A.A.**

Kursk State Medical University, Kursk, Russia, e-mail: btf@pochta.ru

The problem of treatment of purulent-septic diseases is far from being solved and at the moment is presenting some difficulties due to the appearance of microorganisms resistant and poly-resistant to the antibacterial drugs available. In recent years the interest to the most rational application of well-known drugs as well as to the possibility of their chemical modification has increased. Therefore, our investigation has aimed to study the specific features of new complex compounds of metals with some antimicrobial drugs *in vitro* and *in vivo*.

Key words: infected wound, antimicrobial drugs, chemical updating.

Несмотря на обилие имеющихся на фармацевтическом рынке медикаментозных средств для местного лечения гнойных ран и трофических язв, желаемая степень ранозаживляющего эффекта препаратов до сих пор не достигнута. Поэтому весьма актуальны исследования в этой области, основной целью которых является получение новых, более эффективных препаратов, так как лечение гнойных ран остается на сегодняшний день одной из актуальных проблем хирургии. Количество больных с этой

патологией по-прежнему не уменьшается. Нагноение ран составляет 11-62,2 % в структуре госпитальной инфекции в хирургической клинике [1]. Особенно остро стоит проблема лечения гнойных ран, а также пролежней и трофических язв у лиц с сахарным диабетом, хронической венозной недостаточностью, облитерирующими заболеваниями сосудов, иммунодефицитами.

В связи с появлением резистентных и полирезистентных форм микроорганизмов к имеющимся антибактериальным препаратам значительно повысился интерес к повышению эффективности уже используемых лекарственных средств и расширению спектра действия. Антибактериальные химиотерапевтические средства, кроме антибиотиков, представлены также препаратами других классов химических веществ с различным механизмом антимикробного действия.

В настоящее время достаточно широко используются комбинированные препараты, в состав которых обычно входят два антимикробных средства, иногда три. Такой выбор сочетаний предусматривает: потенцирование активности по сравнению с действием одного препарата в монотерапии; расширения спектра действия, включая активность и в отношении резистентных штаммов к тому или другому компоненту в сочетании; возможность снижения частоты развития лекарственной устойчивости к определенной группе антимикробных препаратов; улучшение переносимости лекарств, уменьшение частоты и тяжести побочных реакций, и в первую очередь за счет снижения лечебных доз препаратов.

Одним из таких препаратов, который привлек наше внимание, является котримоксазол, представляющий собой сочетание сульфаниламида с производным диаминапириимидина, потенцирующего действие сульфаниламида. Кроме того, производные сульфаниламида помимо антибактериальной активности характеризуются и антипротозойным действием.

Производные сульфаниламида являются «основоположниками» этиотропного лечения бактериальных инфекций, в том числе в монотерапии. В связи с огромными успехами в синтезе новых высокоэффективных и малотоксичных антимикробных препаратов в других классах химиотерапевтических веществ значение производных сульфаниламида существенно уменьшилось, но, тем не менее, ряд препаратов этой группы остаются в арсенале врачей и при хорошей переносимости при легких и среднетяжелых формах инфекции могут применяться в монотерапии в соответствии с чувствительностью возбудителя инфекции. К недостаткам производных сульфаниламида относится достаточно быстрое развитие к ним лекарственной устойчивости бактерий по типу плазмидной, быстрое распространение лекарственно-устойчивых штаммов,

перекрестная устойчивость в пределах данной группы препаратов, высокие лечебные дозы для производных сульфаниламида короткого действия, ряд побочных реакций.

Другой группой химиотерапевтических средств, нарушающих нормальный синтез фолиевых кислот, являются производные диаминопиримидина. Спектр их действия включает большую группу грамположительных и грамотрицательных бактерий и простейших. К производным диаминопиримидина также достаточно быстро развивается лекарственная устойчивость. Существенной при сочетании производных диаминопиримидина с производными сульфаниламида является возможность снижения дозировок каждого из препаратов. Производные диаминопиримидина могут потенцировать по принципу двойной мишени активность соединений других классов химиотерапевтических веществ: хинолонов, фторхинолонов, тетрациклинов и др., но наиболее практическое значение они приобрели как потенциаторы действия производных сульфаниламидов.

В связи с этим с помощью химической модификации нами были получены производные сульфаниламида и диаминопиримидина с целью наиболее рационального использования этих веществ. Поэтому целью исследования явилось изучение биологической активности новых производных *in vivo* и *in vitro*.

Для решения поставленных задач применен комплекс микробиологических, иммунологических, физико-химических методов.

Антибактериальную активность лигандов, а также их комплексных соединений и лекарственных форм, приготовленных на их основе, в отношении факультативно анаэробных микроорганизмов определяли *in vitro* методом диффузии в агар (Государственная Фармакопея, XI изд-е, 1990). В соответствии с рекомендациями ВОЗ и ГФ для оценки активности новых биоконплексов в качестве тест-культур использовали штаммы факультативно-анаэробных бактерий и грибов из коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича (Москва): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 10702, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* NCTC 2625.

Биологическую активность биоконплексов *in vivo* изучали на белых мышах (весом 18-20 г) при моделировании стафилококковой инфекции. Для этого мышей внутрибрюшинно заражали суточной агаровой культурой *Staphylococcus aureus* № 554, в дозе, вызывающей гибель 50 % мышей в течение 7 суток (1×10^7 микробных тел/мл), и через сутки после заражения в течение 7 дней ежедневно внутримышечно вводили

исследуемые препараты. Терапевтическую эффективность биоконплексов оценивали по выживаемости животных.

Для оценки состояния антиинфекционной защиты организма определяли: фагоцитарный индекс, фагоцитарное число, завершенность фагоцитоза [2], показатели активности кислородзависимых и кислороднезависимых бактерицидных систем нейтрофилов [3, 4], уровень сывороточного лизоцима [5], бактерицидную активность сыворотки крови [5], показатели спонтанных Е-РОК [6]. Все полученные данные подвергнуты статистической обработке с определением критерия Стьюдента.

Основным подходом в создании лекарственных средств антимикробного назначения является поиск мягкодействующих на организм человека лекарственных препаратов, не оказывающих резких изменений основных функций организма и обладающих лечебным эффектом, но при этом не вызывающих резистентность у микроорганизмов.

Однако возможности для открытия новых групп препаратов, по мнению многих исследователей, практически исчерпаны и поэтому основные усилия должны быть направлены на повышение биологической активности имеющихся лекарственных средств. Химическая модификация – один из путей повышения биологической активности и расширения спектра их действия.

Для химической модификации нами были выбраны два производных сульфаниламида и диаминопиримидина, обладающих химиотерапевтической активностью при инфекциях, вызванных грамположительными и грамотрицательными бактериями, некоторыми простейшими, хламидиями и оказывающих бактериостатическое действие.

Бактерицидный эффект этих соединений связан с двойным блокирующим действием на метаболизм бактерий. Производное сульфаниламида нарушает биосинтез дигидрофолевой кислоты, а производное диаминопиримидина блокирует следующую стадию метаболизма-восстановления дигидрофолевой кислоты в необходимую для развития микроорганизмов тетрагидрофолиевую кислоту. Выбор производного сульфаниламида в качестве компонента вызван тем, что он имеет одинаковую скорость элиминации с производным диаминопиримидина.

Препарат эффективен в отношении стрептококков, палочки дизентерии, брюшного тифа, кишечной палочки, протей и неэффективен в отношении микобактерий туберкулеза, спирохет, синегнойной палочки. Эти данные явились предпосылками к химическому синтезу и изучению антимикробной активности новых производных сульфаниламида (шифр соединений: Sm, Sm-27, Sm-29, Sm-30) и диаминопиримидина (шифр соединений: Tmp, Tmp-27, Tmp-29, Tmp-30).

Проведенные исследования показали, что химическая модификация изучаемых лиганд позволяет увеличивать их антимикробную активность (таблица 1). Изучаемые новые производные сульфаниламида и диаминопиримидина в отношении всех изученных тест-микробов проявляли более высокую антимикробную активность по сравнению с лигандами, так как в отношении изучаемых микроорганизмов значимо увеличивался.

Таблица 1

Антимикробная активность лиганд и новых производных в отношении факультативно анаэробных микроорганизмов

Тест-культура	Диаметр зоны задержки роста бактерий препаратами в мм (M±m)							
	Sm	Sm-27	Sm-29	Sm-30	Tmp	Tmp-27	Tmp-29	Tmp-30
S.aureus 209-P	16,0±0,4	30,1±0,4	34,4±0,5	36,2±0,5	17,1±0,3	32,2±0,4	32,5±0,3	35,4±0,4
S. aureus ATCC 25923	18,0±0,3	31,2±0,3	33,4±0,3	35,5±0,4	17,6±0,2	34,0±0,3	33,1±0,4	36,2±0,3
B. subtilis ATCC 6633	12,0±0,2	28,0±0,3	27,1±0,4	29,2,±0,3	12,4±0,2	27,9±0,2	28,4±0,5	28,9±0,3
E.coli ATCC 25922	19,6±0,3	34,7±0,4	35,8±0,4	50,1±0,5	23,4±0,3	38,7±0,3	40,2±0,4	39,5±0,3
P. aeruginosa ATCC 27853	13,1±0,2	23,8±0,3	25,6±0,4	24,2±0,3	8,1±0,2	25,4±0,2	27,4±0,3	29,3±0,4
C. albicans NCTC 2625	8,2±0,2	20,1±0,4	24,3±0,3	23,5±0,2	8,0±0,3	21,9±0,4	25,1±0,2	25,2±0,3

Примечание: Sm- лиганд (производное сульфаниламида); Sm-27, Sm-29, Sm-30 – химически модифицированные производные сульфаниламида; различие данных по отношению к лиганду достоверны ($p < 0,05$); Tmp – лиганд (производное диаминопиримидина); Tmp-27, Tmp-29, Tmp-30 – химически модифицированные производные диаминопиримидина; различие данных по отношению к лиганду достоверны ($p < 0,05$).

Это можно объяснить тем, что химическая модификация исходных лиганд позволяет получить соединения, оказывающие влияние на специфическую активность лиганд.

Очень важной характеристикой антибактериальных препаратов являются их характер действия (бактерицидный или бактериостатический) и определение минимальной бактерицидной концентрации. Это связано с тем, то увеличение концентрации, как производного сульфаниламида, так и производного диаминопиримидина, может сопровождаться различными побочными эффектами: невропатией, аллергическими реакциями, диареей. Поэтому важно было, чтобы синтезированные новые производные по минимальной бактерицидной концентрации, как минимум, не уступали исходному лиганду. Определение минимальных подавляющих концентраций для изучаемых производных сульфаниламида и диаинопиримидина

выявило их изменение в диапазоне от 0,31 мг/мл до 2,5 мг/мл в отношении исследованных штаммов.

Поскольку далеко не всегда антимикробное действие препарата, установленное *in vitro*, совпадает с его активностью в живом организме, нами было проведено изучение протективной активности новых производных в опытах на мышах при внутрибрюшинном их заражении культурой *S. aureus*.

Проведенные исследования позволили установить, что при лечении синтезированными производными Sm-27, Sm-29, Sm-30 и Tmp-27, Tmp-29, Tmp-30 выживаемость животных составила от 90,5 % до 98,5 % соответственно.

Поскольку одним из неперенных условий эффективной терапии инфекционных процессов является адекватный иммунологический ответ, то представляло интерес изучение воздействия новых производных на показатели антиинфекционной защиты организма экспериментальных животных.

Введение животным химически модифицированных сульфаниламида и диаминопиримидина оказывало существенное влияние на формирование гуморального иммунного ответа, индуцированного эритроцитами барана, о чем свидетельствовало увеличение количества антителообразующих клеток почти в 2 раза.

Одним из важных факторов антиинфекционной защиты, определяющим дальнейшее развитие инфекционного процесса, является ее неспецифическое звено. Полученные результаты исследования влияния новых производных на фагоцитарную активность лейкоцитов показали, что более высокие значения активности фагоцитоза отмечены в группах животных, которым вводили новые производные, так как у них фагоцитарный индекс значительно превышал показатели как контрольной группы, которым вводили физиологический раствор, так и групп, которым вводили лиганды. Показатели НСТ-стимулированного теста, бактерицидной активности сыворотки крови также характеризовались статистически более высокими значениями в группах опытных животных по сравнению с группами контроля.

Таким образом, проведенные исследования показали, что химически модифицированные производные сульфаниламида и диаминопиримидина обладают наиболее выраженным антимикробным действием в отношении изученных тест-штаммов микроорганизмов по сравнению с исходными лигандами; высокой терапевтической активностью при экспериментальной стафилококковой инфекции, заключающейся в достоверном снижении смертности лабораторных животных; оказывают стимулирующее действие на факторы неспецифической резистентности

(фагоцитоз, бактерицидную активность сыворотки крови) и гуморального иммунного ответа.

Список литературы

1. Кузин М.И., Костюченко Б.М. Раны и раневая инфекция – руководство для врачей. – М.: Медицина, 1990. – 188 с.
2. Дорофейчук В.Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом // Лаб. дело. – 1968. – № 1. – С. 28–30.
3. Пигаревский В.Е. Лизосомально-катионный тест (Метод. рек.). – М.: НИИЭМ АМН СССР, 1979. – 57 с.
4. Теплова С.Н. Оценка факторов неспецифической защиты организма от инфекции в клинической практике (Метод. рек.). – Челябинск, 1978. – 57 с.
5. Дорофейчук В.Г. Определение активности лизоцима нефелометрическим методом // Лаб. дело. – 1968. – № 1. – С. 28–30.
6. Gerne N.K., Henry C., Nordin A.A. et al. Plaque techniques for recognising individually antibodyforming cells // Methods in Immunology and Immunochemistry / Ed. C.A. Williams and M.W. Chase. – New York: Academic Press, 1976. – Vol. 5. – P. 335–370.

Рецензенты:

Калуцкий П.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО КГМУ Минздравсоцразвития России, г. Курск.

Ляшев Ю.Д., д.м.н., профессор кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО КГМУ Минздравсоцразвития России, г. Курск.

Работа получена 25.08.2011.