

# ПРОТИВОМИКРОБНЫЕ СРЕДСТВА

DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-9-34-38

## ОЦЕНКА ПРОТИВОГРИБКОВОЙ И АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СЕРЕБРЯНЫХ СОЛЕЙ 5,6-ДИАРИЛ-4-[4-(АЦЕТИЛАМИНОСУЛЬФОНИЛ)ФЕНИЛ]-3,5-ДИГИДРОПИРРОЛО[3,4-*c*]ПИРАЗОЛ-3-ОНОВ

В. В. Новикова<sup>1</sup>, О. В. Бобровская<sup>1</sup>, В. Л. Гейн<sup>1</sup>,  
Г. В. Селиверстов<sup>1</sup>, Е. Н. Люст<sup>1</sup>, Р. Р. Махмудов<sup>2</sup>

Приведены результаты изучения противомикробной (противогрибковой и антибактериальной) активности и острой токсичности пяти новых соединений ряда серебряных солей 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-3-онов. Установлено, что два исследуемых соединения (2а и 2б), являясь практически нетоксичными ( $LD_{50} > 1200 - > 1600$  мг/кг), проявляют выраженную противогрибковую и умеренную антибактериальную активность в отношении большинства изученных штаммов: *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *S. abony*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*. Соединение 2в оказывает выраженный антибактериальный эффект, что дает основания для дальнейшего изучения механизмов выявленной противомикробной активности.

**Ключевые слова:** 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-3-оны; серебряные соли; острая токсичность; противогрибковая активность; антибактериальная активность.

## ВВЕДЕНИЕ

Конденсированные системы, включающие фрагменты пиррола и пиразола, обладают антимикробной, противовоспалительной, противовирусной, анальгетической, ноотропной и гипогликемической активностью [1, 5, 10, 11].

Принимая во внимание большую значимость производных пирролопиразолов, поиск новых биологически активных лекарственных препаратов на их основе является актуальным.

Ранее нами было показано, что при взаимодействии 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-3-онов (1а-д) с эквимольным количеством серебра нитрата в смеси этанол — ДМФА (2:1) образуются их серебряные соли (2а-д) [2, 3] (рисунок).

В результате проведенных исследований установлено, что натриевые соли пирролопиразолов обладают низкой противомикробной активностью (МПК 250 – 1000 мг/л) [2]. Введение в структуру пирроло[3,4-*c*]пиразол-3-онов ионов серебра с образованием их серебряных солей (2а-д) приводит к резкому усиле-

нию биологического действия в отношении изучаемых культур микроорганизмов [2, 3].

В данной работе приведены результаты углубленного изучения противогрибковой и антибактериальной активности 5 серебряных солей 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-3-онов (2а-д).

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования явились серебряные соли 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-*c*]пиразол-3-онов (2а-д), полученные нами ранее по методике [2, 3]. Соединения 2а-д синтезированы сотрудниками кафедры общей и органической химии ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия. Ход реакций и степень чистоты полученных соединений контролировали методом ТСХ на пластинках Silufol VV-254 в системе хлороформ-метанол (80:15), проявитель — УФ-облучение. Структура синтезированных соединений (2а-д) подтверждена данными масс-спектрометрии, ЯМР <sup>1</sup>Н и ИК-спектроскопии [2, 3].

Противогрибковую и антибактериальную активность полученных соединений (2а-д) определяли микрометодом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде [8]. Для определения антибактериальной активности использовали питательный бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболонск), для определения противогрибковой активности — бульон Сабуро (ФБУН

<sup>1</sup> ФГБУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России, Россия, 614000, Пермь, ул. Полевая, 2.

<sup>2</sup> Федеральное ФГБУ ВО Пермский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15.

ГНЦ ПМБ, г. Оболensk). Для приготовления взвеси дрожжевых культур применяли двухсуточные культуры, выращенные на агаре Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболensk). Для определения антибактериальной активности использовали типовые суточные культуры, выращенные на питательном агаре (ГРМ-агар, ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболensk). Концентрация микробных клеток в опыте составила  $2 - 5 \cdot 10^5$  КОЕ/мл (для бактерий),  $2 - 5 \cdot 10^4$  КОЕ/мл (для грибов). В качестве положительного контроля использовали питательную среду с внесенной исследуемой культурой. В качестве отрицательного контроля использовали интактную питательную среду. Посевы инкубировали в термостате при температуре  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 40–48 ч (для грибов),  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24 ч — для бактерий. Оценку роста в соответствии с [8] проводили визуально. В качестве значения МПК (минимальной подавляющей концентрации) принимали концентрацию соединения в последней прозрачной лунке серии разведения. Антибактериальный эффект изучаемого соединения сравнивали с действием сульфацила (сульфацила) (ЗАО ПФК “Обновление”, г. Новосибирск), который является исходным веществом в синтезе соединений и аналогом по структуре. Кроме того, в качестве эталона сравнения использовали диоксидин (1 % раствор, производитель ОАО “Новосибхимфарм”). Антифунгальный эффект исследуемых соединений сравнивали с действием флуконазола (производитель ЗАО “Медисорб”, г. Пермь).

Скрининг проводили в отношении типовых штаммов Государственной коллекции патогенных микроорганизмов *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Candida albicans* NCTC 885–653 [2, 3]. Углубленное исследование антибактериальной и противогрибковой активности осуществляли в отношении типовых штаммов бактерий *Staphylococcus epidermidis* ATCC № 14990, *Enterococcus faecalis* ATCC № 29212, *Klebsiella pneumoniae* NCTC № 5055, *Proteus vulgaris* № HX 19/222, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC № 9027, *Salmonella abony* № 103/39, *Bacillus cereus* ATCC № 10702, а также в отношении типовых штаммов — дрожжевых грибов рода *Candida* Государственной коллекции патогенных грибов *C. tropicalis* РКПГУ-1513/784, *C. krusei* РКПГУ-1472/310, *C. glabrata* РКПГУ-1485/47. Также была изучена антифунгальная активность соединений **2а** и **2б** в отношении 45 клинических изолятов грибов рода *Candida*, выделенных у пациентов многопрофильных клиник (биосубстрат — отделяемое влагаллица — 20 штаммов, слизь из зева и носа — 20 штаммов, другой биоматериал — 5 штаммов), имеющих различный профиль чувствительности к антимикотическим препаратам.

Острую токсичность соединений (**2а-д**) изучали согласно [8] на 60 белых нелинейных мышах обоего пола массой 16–18 г (питомник “Пушино”, Московская обл.). Исследуемое соединение вводили внутри-

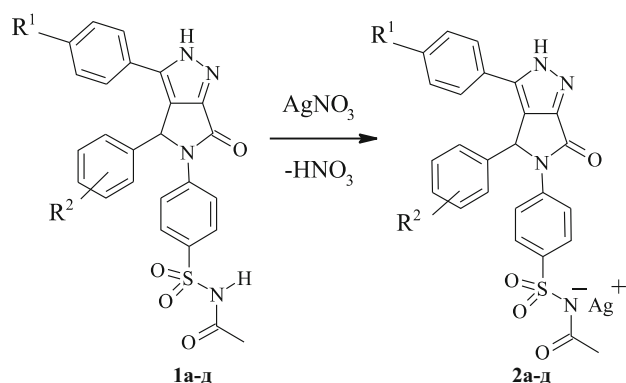


Схема синтеза серебряных солей 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пиразол-3-онов  
Примечание: R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = 4-Cl (**2а**), R<sup>1</sup> = Br, R<sup>2</sup> = H (**2б**), R<sup>1</sup> = Br, R<sup>2</sup> = 2-NO<sub>2</sub> (**2в**), R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>O, R<sup>2</sup> = 4-Cl (**2г**), R<sup>1</sup> = CH<sub>3</sub>O, R<sup>2</sup> = 2-NO<sub>2</sub> (**2д**).

брюшинно однократно в виде взвеси в 2 % крахмальной слизи в возрастающих дозах. Регулярно фиксировали общее состояние и поведение животных, состояние шерстного покрова, определяли массу тела. В каждой группе животных учитывали число смертельных исходов за весь срок наблюдения. Исследования проведены в соответствии с правилами, принятыми Международными рекомендациями (этическим кодексом) по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [6].

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом однофакторного дисперсионного анализа с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2010, StatGraphicsPlus 5.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что ЛД<sub>50</sub> соединений (**2а-д**) составляет от > 1200 мг/кг до > 1600 мг/кг [2, 3]. Согласно классификации токсичности препаратов соединения

Таблица 1. Результаты скрининга противомикробной активности соединений в отношении типовых штаммов

Соединение	МПК, мг/л		
	<i>S. aureus</i> ATCC № 6538-P	<i>E. coli</i> ATCC № 25922	<i>C. albicans</i> NCTC № 885-653
<b>2а</b>	2,0 <sup>*,**</sup>	1,0 <sup>*,**</sup>	2,0–4,0 <sup>*</sup>
<b>2б</b>	3,9–7,8 <sup>*,**</sup>	15,6 <sup>*,**</sup>	2,0 <sup>*</sup>
<b>2в</b>	2,0 <sup>*,**</sup>	1,0 <sup>*,**</sup>	7,8 <sup>*</sup>
<b>2г</b>	31,2 <sup>*,**</sup>	31,2 <sup>*</sup>	3,9–7,8 <sup>*</sup>
<b>2д</b>	62,5 <sup>*</sup>	31,2 <sup>*</sup>	3,9 <sup>*</sup>
Сульфациламид (сульфацил)	500,0	1000,0	1000,0
Диоксидин (1 % раствор)	62,5	31,2	-
Флуконазол	-	-	2,0

Примечание: \* различия с активностью сульфациламида статистически достоверны при  $p \leq 0,05$ ; \*\* различия с активностью диоксидина (1 % раствор) статистически достоверны при  $p \leq 0,05$ .

(2а-д) относятся к классу практически нетоксичных веществ [4] и являются менее токсичными, чем диоксидин и флуконазол, ЛД<sub>50</sub> которых 750 мг/кг [12] и 1273 мг/кг [13], соответственно.

Результаты изучения противомикробной активности в отношении скрининговых штаммов микроорганизмов представлены в табл. 1 [2, 3]. В случае разных значений, получаемых в двух повторах, показан диапазон МПК.

Установлено наличие достоверно более высокой противомикробной активности ( $p < 0,05$ ) изучаемых соединений в отношении всех скрининговых культур микроорганизмов, по сравнению с аналогом по структуре сульфациламидом (сульфацилом). Соединения 2а-в также обладают достоверно более выраженным

антибактериальным эффектом, чем аналог по действию — диоксидин 1 %, в связи с чем данные вещества были протестированы на расширенный спектр бактерий. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Установлено, что данные соединения обладают антибактериальной активностью в отношении большинства изученных штаммов. Отмечается достоверно более высокая противомикробная активность ( $p < 0,05$ ) соединений 2а-в в отношении изученных штаммов *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *B. cereus*, а также соединения 2в в отношении *K. pneumoniae* и *P. vulgaris*, чем активность эталона сравнения (1 % раствор диоксидина). Соединение 2в проявляет более выраженную активность в отношении всех изученных штаммов бактерий.

Таблица 2. Антибактериальная активность изучаемых соединений

Соединение	МПК, мг/л						
	<i>S. epidermidis</i> ATCC № 14990	<i>E. faecalis</i> ATCC № 29212	<i>B. cereus</i> ATCC № 10702	<i>S. abony</i> № 103/39	<i>K. pneumoniae</i> NCTC № 5055	<i>P. vulgaris</i> HX № 19/222	<i>P. aeruginosa</i> ATCC № 9027
2а	31,2*	31,2*	7,8*	31,2	31,2	3,9*	31,2*
2б	7,8*	62,5*	15,6*	15,6	31,2	15,6	15,6*
2в	1,0*	3,9*	2,0*	7,8	3,9*	1,0*	3,9*
Диоксидин (1 % раствор)	500	500	31,2 – 62,5	7,8	15,6 – 31,2	7,8	500

Примечание: \* различия с активностью диоксидина (1 % раствор) статистически достоверны при  $p \leq 0,05$ .

Таблица 3. Острая токсичность и отношение МПК к токсичности (ЛД<sub>50</sub>) изучаемых соединений

Соединение	2а	2б	2в	Диоксидин	Флуконазол
ЛД <sub>50</sub> , мг/кг, внутрибрюшинно	> 1300	> 1600	> 1200	750*	1273*
		МПК/ЛД <sub>50</sub>			
<i>B. cereus</i> ATCC 10702	0,006	0,0098	0,0017	0,042	-
<i>S. aureus</i> ATCC 6538-P	0,001	0,0049	0,0017	0,083	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,0007	0,0098	0,0008	0,046	-
<i>C. albicans</i> ATCC 885-653	0,0015	0,0013	0,0065	0,6667	0,0016
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0,024	0,0098	0,0034	0,6667	-
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	0,024	0,0049	0,0008	0,6667	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,024	0,0388	0,0033	0,6667	-
<i>K. pneumoniae</i> NCTC № 5055	0,024	0,0195	0,0033	0,02	-
<i>P. vulgaris</i> HX № 19/222	0,003	0,0098	0,008	0,01	-
<i>S. abony</i> № 103/39	0,024	0,0098	0,0065	0,01	-

Примечание: \* данные литературы [12, 13].

Таблица 4. Противогрибковая активность соединений 2а и 2б в отношении типовых штаммов *Candida spp*

Соединение	МПК, мг/л		
	<i>C. tropicalis</i> РКПГУ-1513/784	<i>C. krusei</i> РКПГУ-1472/310	<i>C. glabrata</i> РКПГУ-1485/47
2а	2,0 – 3,9*	7,8 – 15,6*	31,2 – 62,5
2б	15,6*	31,2*	7,8*
Флуконазол	62,5	62,5	15,6

Примечание: \* различия с активностью флуконазола статистически достоверны при  $p \leq 0,05$ .

Таблица 5. Противогрибковая активность соединений **2a** и **2b** в отношении клинических изолятов *Candida spp*

Соединение	МПК, мг/л							
	0,5	1,0	2,0	3,9	7,8	15,6	31,2	62,5 и более
	количество изолятов <i>Candida spp</i> , имеющих соответствующую МПК							
<b>2a</b>	4	2	5	4	5	10	7	8
<b>2b</b>			2	6	20	14	2	1
Флуконазол	2,0 – > 64,0*							

Примечание: \* данные литературы [9].

Одним из критериев возможности рассмотрения полученных соединений как потенциальных лекарственных препаратов является их токсичность. Результаты определения острой токсичности изучаемых соединений, а также отношение МПК к токсичности (ЛД<sub>50</sub>), отражающее эффективность и безопасность веществ, представлены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, соединение **2a** минимум в 1,7 раз менее токсично, чем диоксидин, соединение **2b** — минимум в 2,1 раз, соединение **2в** — минимум в 1,6 раз. Острая токсичность флуконазола и соединений **2a** и **2в** сопоставима, а соединение **2b** минимум в 1,25 раз менее токсично, чем флуконазол. Минимальный диапазон отношения МПК к токсичности, отражающий эффективность действия, по отношению к бактериальным культурам выявлен у соединения **2в** — от 0,0008 до 0,0065, по отношению к культуре дрожжевых грибов — у соединения **2b** (0,0013), в то время как у диоксидина и флуконазола аналогичные показатели значительно хуже.

Из-за наличия высокой противогрибковой активности соединений **2a** и **2b** в отношении скринингового штамма *C. Albicans* была изучена их антимикотическая активность в отношении других типовых штаммов микромицетов (табл. 4).

Установлено, что соединение **2a** обладает высокой противогрибковой активностью в отношении изученных штаммов *C. tropicalis* и *C. krusei*, соединение **2b** — в отношении штамма *C. glabrata*. При этом отмечается достоверно более высокая антифунгальная активность обоих соединений ( $p < 0,05$ ) в отношении всех изученных штаммов микромицетов, чем активность флуконазола, кроме случая действия соединения **2a** на штамм *C. glabrata*.

Следующим этапом исследования стало тестирование соединений на клинических изолятах *Candida spp*. МПК изученных соединений в отношении изолятов *C. albicans* сопоставима с препаратом сравнения и составляет 0,5 – 62,5 мг/л. Полученные результаты представлены в табл. 5.

Популяция чувствительных штаммов часто является разнородной. При этом важное значение имеют кумулятивные показатели чувствительности популяции штаммов — МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub>, которые могут быть использованы для оценки устойчивости вида к исследуемому препарату [7]. Установлено, что МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub>

соединения **2a** в отношении исследованных штаммов *Candida spp* составляет 15,6 и 62 мг/л, соответственно, соединения **2b** — 7,8 и 15,6 мг/л, соответственно. Минимальная разница между МПК<sub>50</sub> и МПК<sub>90</sub> (смежные разведения) соединения **2b** свидетельствует о низком потенциале формирования резистентности микромицетов к данному соединению.

Изученные соединения **2a-в** являются практически нетоксичными, проявляющими высокую антибактериальную и противогрибковую активность, что дает основания для дальнейшего изучения механизмов выявленного действия с последующим внедрением в клиническую практику.

## ВЫВОД

Серебряные соли 5,6-диарил-4-[4-(ацетиламиносульфонил)фенил]-3,5-дигидропирроло[3,4-с]пирозол-3-онов являются практически нетоксичными соединениями (ЛД<sub>50</sub> > 1200 – > 1600 мг/кг), проявляющими высокую антибактериальную активность (в 8 – 500 раз превышает таковую для сульфетамида,  $p \leq 0,05$ ) и противогрибковое действие (в 2 – 16 раз превышает активность флуконазола,  $p \leq 0,05$ ).

## ЛИТЕРАТУРА

1. О. В. Бобровская, В. Л., Гейн, Г. В. Селиверстов и др., *Журн. общ. хим.*, **87**(12), 1957 – 1964 (2017).
2. В. Л. Гейн, О. В. Бобровская, Г. В. Селиверстов и др., Патент РФ 2698328, Бюл. № 24 (2019).
3. В. Л. Гейн, О. В. Бобровская, Г. В. Селиверстов и др., Патент РФ 2706357, Бюл. № 32 (2019).
4. Н. Ф. Измеров, И. В. Саноцкий, К. К. Сидоров, *Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном воздействии (справочник)*, Медицина, Москва (1977).
5. М. А. Марьясов, Гейн В. Л., *Тетрагидропиррол-2,3-дионы*, ПГФА, Пермь (2013).
6. *Международные рекомендации (этический кодекс) по проведению медико-биологических исследований с использованием живых животных*, Совет международных научных организаций CIOMS, Geneva (1985).
7. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: метод. указ. МУК 4.2.1890-04. (2004).
8. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, (А. Н. Миронов -ред.), М. (2012).
9. R. A. Cordeiro, E. Carlos, et al., *Med. Mycol.*, **51**(1), 53 – 59 (2013); doi: 10.3109 / 13693786.2012.692489
10. R. R. Mallikarjuna, J. Sreeramulu, L. K. Ravindranath, et al., *J. Chem. Pharm. Res.*, **4**(1), 272 – 278 (2012).

11. E. V. Sureshkumar, R. R. Mallikarjuna, P. Phebe, et al., *Der Pharm. Chem.*, **4**(2), 707 – 713 (2012).
12. U. S. National Library of Medicine; <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/dioxydine>, дата обращения 19.03.2020.
13. U. S. National Library of Medicine; <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/name/fluconazole>, дата обращения 19.03.2020.

Поступила 28.03.20

## ASSESSING THE ANTIFUNGAL AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SILVER SALTS OF 5,6-DIARYL-4-[4-(ACETYLAMINOSULFONYL)-PHENYL]-3,5-DIHYDROPYRROLO[3,4-*c*]PYRAZOL-3-ONES

V. V. Novikova<sup>1</sup>, O. V. Bobrovskaya<sup>1</sup>, V. L. Gein<sup>1</sup>, G. V. Seliverstov<sup>1</sup>,  
Ye. N. Lyust<sup>1</sup>, and R. R. Makhmudov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Perm State Pharmaceutical Academy, ul. Polevaya 2, Perm, 614000 Russia

<sup>2</sup> Perm State University, ul. Bukireva 15, Perm, 614990 Russia

Results of studying the antimicrobial (antifungal and antibacterial) activity and acute toxicity of five new silver salts of 5,6-diaryl-4-[4-(acetylaminosulfonyl)phenyl]-3,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrazole-3-ones are presented. It was found that two compounds, being almost non-toxic, exhibited pronounced antifungal and moderate antibacterial activity (LD<sub>50</sub> 1200 – 1600 mg/kg), against majority of the strains studied (*S. epidermidis*, *E. faecalis*, *S. abony*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*), and one compound produced significant antibacterial effect. These results give grounds for further study of the mechanisms of revealed antimicrobial activity.

**Keywords:** 5,6-diaryl-4-[4-(acetylaminosulfonyl)phenyl]-3,5-dihydropyrrolo[3,4-*c*]pyrazol-3-ones; silver salts; acute toxicity; antifungal activity; antibacterial activity.

