

УДК 577.338:577.123.36

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ИМИДАЗОЛА НА ПАРАМЕТРЫ РОСТА И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГРИБОВ РОДА *CANDIDA*

© 2004 О.Н. Нечаева,¹ Н.А. Кленова,² П.П. Пурыгин,³ Е.А. Шубина,⁴
Н.Ю. Хохлова⁵

Осуществлен синтез этилимидазол-1-илкарбоксимидата и этилбен-
зимидазол-1-илкарбоксимидата и исследована их антигрибковая актив-
ность. Показано, что исследуемые соединения обладают фунгиостати-
ческим действием по отношению к грибам рода *Candida*.

Введение

В настоящее время все большее значение приобретают заболевания, вы-
зываемые условно-патогенными микроорганизмами. Это явление связано с
возросшей силой воздействия факторов окружающей среды: химические за-
грязнения, радиация, нерациональное использование антибиотиков и гормо-
нальной терапии, что приводит к снижению иммунного ответа и неспеци-
фической резистентности человека.

Одним из показателей увеличивающейся за последние годы несостоя-
тельности иммунной защиты организма человека являются хронические и
локальные кандидозы, вызываемые условно патогенными грибами из рода
Candida [1].

Распространенность и опасность кандидозных инфекций обуславливает
необходимость поиска новых, обладающих высокой эффективностью и без-

¹Нечаева Ольга Николаевна (labazova@mail.ru), кафедра органической химии Са-
марского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павло-
ва, 1.

²Кленова Наталья Анатольевна, кафедра биохимии Самарского государственного
университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

³Пурыгин Петр Петрович (purygin2002@mail.ru), кафедра органической химии Са-
марского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павло-
ва, 1.

⁴Шубина Елена, кафедра биохимии Самарского государственного университета,
443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

⁵Хохлова Наталья Юрьевна, кафедра теплофизики и экологической физики Самар-
ской государственной академии путей сообщения, 443066, Россия, г. Самара, 1-й Безы-
мянный пер., 18.

опасных для человека препаратов. Известно, что этим требованиям отвечают препараты, созданные на основе имидазола [2–5]. Несмотря на наличие широкого спектра фунгицидных имидазольных препаратов и антибиотиков, действующих непосредственно на кандиды, поиск новых средств лечения грибковых инфекций является актуальным, так как дрожжеподобные грибки обладают способностью быстро вырабатывать резистентность по отношению к химическим соединениям [6, 7].

Целью настоящего исследования стал синтез и изучение антигрибковых свойств этилимидазол-1-илкарбоксимидата ($\text{ImC}(\text{NH})\text{OEt}$) и этилбензимидазол-1-илкарбоксимидата ($\text{BzImC}(\text{NH})\text{OEt}$).

1. Методика химического эксперимента

Этилимидазол-1-илкарбоксимидат. Очищенный путем возгонки в вакууме 1-цианимидазол (0.10 г, 0.11 ммоль) растворяли в абсолютном этаноле (10 мл), реакцию проводили при нагревании на водяной бане при температуре 62–64 °С в течение 2.5 ч. Избыток этанола упаривали на ротаторном испарителе при температуре 40 °С и давлении 20 мм рт. ст. Полученный осадок растворяли в абсолютном бензоле (2 мл), добавляли петролейный эфир (2 мл). Выпавший осадок отфильтровывали на фильтре Шотта, фильтрат упаривали. Этилимидазол-1-илкарбоксимидат получали в виде белых расплывающихся на воздухе кристаллов. Т. пл. 68–69 °С, спектральные характеристики соответствуют литературным данным [8].

Этилбензимидазол-1-илкарбоксимидат. 1-Цианобензимидазол (0.10 г, 0.07 ммоль) растворяли в абсолютном этаноле (10 мл), реакционную смесь нагревали на водяной бане при температуре 62–64 °С в течение 3 ч. Избыток этанола упаривали на ротаторном испарителе при температуре 40 °С и давлении 20 мм рт. ст. Полученный продукт очищали аналогично этилимидазол-1-илкарбоксимидату. Этилбензимидазол-1-илкарбоксимидат получали в виде белых расплывающихся на воздухе кристаллов. Т. пл. 79.5–80.5 °С спектральные характеристики соответствуют литературным данным [8].

2. Методика постановки микробиологического исследования

Объектом исследования служил штамм дрожжеподобных грибов рода *Candida*, представленный Самарской областной санэпидстанцией. Культура грибов поддерживалась на скошенной агаровой среде Сабуро при температуре 8 °С с периодическим пересевом один раз в месяц.

Определение видовой принадлежности и патогенности штамма. Определение видовой принадлежности грибов рода *Candida* проводили путем микроскопирования прижизненных препаратов, окрашенных раствором

Люголя, используя микроскоп С-11, увеличение 15×90. Кроме того, видовую принадлежность подтверждали по способности использовать источники углерода и по отношению к молекулярному кислороду, высевая на среды Гисса, содержащие 2% лактозы, мальтозы, сахарозы, глюкозы, маннита.

Для определения патогенности (по гемолитической активности) проводили посев на кровяной агар и расчет зоны лизиса, а также посев на среду 199 для культуры тканей, так как патогенные кандиды характеризуются образованием на данной среде истинного мицелия, хламидоспор и RB-фактора (ростовых трубочек) [9].

Расчет параметров роста. В качестве среды культивирования использовали жидкую среду Сабуро, приготовленную путем добавления к 1% пептонному бульону 4% глюкозы и антибиотика фурациллина в концентрации 100 мкг/мл. Выращивание проводили в 5 мл среды, содержащей азоловые производные в концентрации 200, 250 и 300 мкг/мл (растворитель — 60 % этиловый спирт). Взятые концентрации соответствовали применяемым терапевтическим дозам антигрибкового препарата клотримазола, относящегося к азоловым соединениям. Контрольные пробы содержали соответствующий опытным пробам объем растворителя. Объем добавленного растворителя составлял 40, 50, 60 мкл/мл.

Инкубацию проб проводили в термостате при температуре 37 ± 1 °C в течение 12 часов. Скорость роста оценивали по изменению оптической плотности (ОП) через каждые 0.5 часа ($\lambda = 600$ нм) в стерильной кювете (0.5 см) [10]. Параметры роста культуры рассчитывали по общепринятым методам [11, 12]. Прирост биомассы определяли как разность между максимальной и исходной плотностью клеточной суспензии. Удельную скорость роста рассчитывали по формуле:

$$\mu = (\ln X_t - \ln X_0) / (t - t_0),$$

где X_t и X_0 — плотности клеточной суспензии в моменты времени соответственно t и t_0 [12].

Время удвоения биомассы (t_d) определяли как:

$$t_d = \ln 2 / \mu.$$

Величину лаг-периода (длительность начальной фазы роста) оценивали по формуле:

$$T = t - (\ln X_r - \ln X_0) / \mu,$$

где T — время продолжения лаг-периода, t — момент времени, в который суспензия достигает определенной плотности X_r [12].

Время выхода клеток в стационарную фазу определяли графически [11].

Определение общего микробного числа и морфологических изменений грибов рода *Candida*. Для определения числа живых клеток культуру кандид высеивали в жидкой среде Сабуро в течение трех суток в термостате при температуре 37 ± 1 °C, 0.1 мл суспензии разводили в

100 мл дист. воды и 0.01 мл разведенной суспензии распределяли по поверхности агаризованной среды Сабуро [9]. Вновь проводили выращивание в тех же условиях в течение трех суток. Общее число живых клеток определяли по формуле:

$$N = n \times 1000,$$

где n — число выросших грибковых колоний, а 1000 — кратность разведения клеточной суспензии.

Параллельно с определением общего числа живых клеток проводили визуальный и микроскопический контроль культуры кандид.

Статистическую обработку данных проводили используя критерий Стьюдента—Фишера. Данные считали достоверными при уровне значимости $P < 0.05$ [13].

3. Результаты микробиологического исследования

Определение видовой принадлежности и патогенности штамма рода *Candida*. Микроскопирование прижизненных препаратов показало, что клетки данного штамма имеют округлую или овально-вытянутую форму и располагаются в пространстве в виде скоплений с отходящими от них нитями псевдомицелия, что характерно для всех патогенных видов *Candida*. Наличие хламидоспор с плотной двойной оболочкой на концах нитей псевдомицелия позволило сделать предположение о том, что данный штамм относится к самому патогенному для человека виду *Candida albicans* [9].

Посев на среды Гисса показал способность данного штамма использовать глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу и маннит с образованием кислых продуктов брожения [14]. Патогенность грибков подтверждало наличие гемолитической активности, диаметр зоны лизиса составил 0.7 ± 0.2 см. Наличие RB-фактора (фактора Рейнольда—Брауна), выраженное в образовании нитей истинного мицелия и ростовых трубочек на среде 199 для культуры тканей, также свидетельствовало о принадлежности штамма грибков к виду *Candida albicans* [9]. Сбраживание сахарозы указывало на принадлежность данного штамма к разновидности *Candida albicans*—*Candida stellatoidea*.

Влияние имидазольных производных на параметры роста исследуемого штамма кандид. Клетки-штаммы оказались чувствительными к воздействию исследуемых соединений, так как культивирование грибков в среде Сабуро с ImC(NH)OEt и VzImC(NH)OEt в концентрациях 200, 250 и 300 мкг/мл приводило к сдвигам ростовых показателей. Общая тенденция к ингибированию роста культуры кандид наблюдалась после 4,5 часов культивирования, причем почти не наблюдалась дозозависимость.

Существенное воздействие на рост кандид оказывал сам растворитель — 60% этиловый спирт, мы наблюдали достоверное уменьшение прироста био-

массы в пробах, содержащих 40, 50 и 60 мкл/мл этилового спирта на 21, 22 и 29% соответственно. Токсическое действие этанола на клетку проявляется прежде всего в нарушении энергетического обмена и непосредственном влиянии на структуру и физико-химические свойства клеточных мембран. При повышении концентрации спирта его молекулы, внедряясь в мембрану, необратимо разрушают ее архитектуру, вызывая диссоциацию липопротеиновых комплексов и освобождая недоступные до этого активные центры протеинов (мембранных ферментов и молекул-переносчиков) [15].

Однако, несмотря на обнаруженное микостатическое действие этанола, добавление в среду 1% растворов ImC(NH)OEt и VzImC(NH)OEt в 60% спирте достоверно снижало прирост биомассы по сравнению с пробами, содержащими только этанол (рис. 1). Нами было обнаружено, что ImC(NH)OEt достоверно уменьшает прирост биомассы в среднем на 16% ($P < 0.01$), а действие VzImC(NH)OEt оказывается сильнее, он уменьшает прирост биомассы в среднем на 33% по отношению к пробам, содержащим только этиловый спирт.

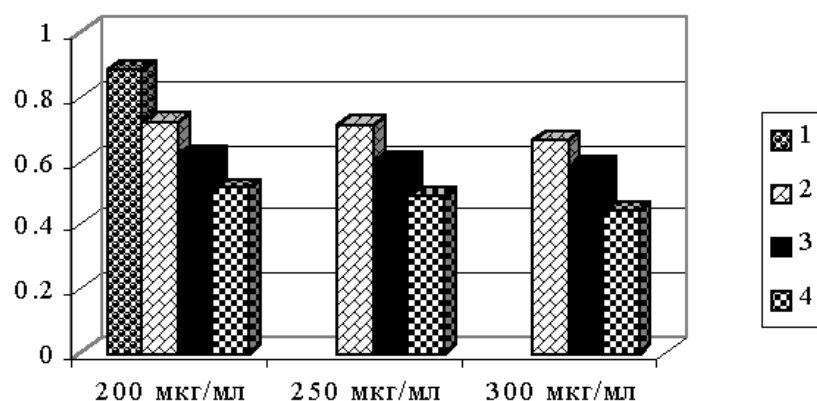


Рис. 1. Влияние этилимидазол-1-илкарбоксимидата и этилбензимидазол-1-илкарбоксимидата в концентрациях 200, 250 и 300 мкг/мл на прирост биомассы (ед. ОП) за 12 часов культивирования: 1 — контроль; 2 — влияние 60% спирта (40, 50 и 60 мкл/мл); 3 — влияние этилимидазол-1-илкарбоксимидата; 4 — влияние этилбензимидазол-1-илкарбоксимидата

При изучении основных параметров роста нами было обнаружено постепенное снижение удельной скорости роста (μ) грибов, наиболее выраженное под действием VzImC(NH)OEt. Кроме того, наблюдалось увеличение времени удвоения биомассы (t_d). При инкубировании штамма с ImC(NH)OEt время удвоения биомассы растет в среднем на 14%, а с VzImC(NH)OEt — на 18% ($P < 0.05$).

Воздействие азольных производных на показатели роста кандид также выражалось в увеличении периода адаптации (лаг-фаза) и уменьшении времени выхода в стационарную фазу (S-фаза) (рис. 2).

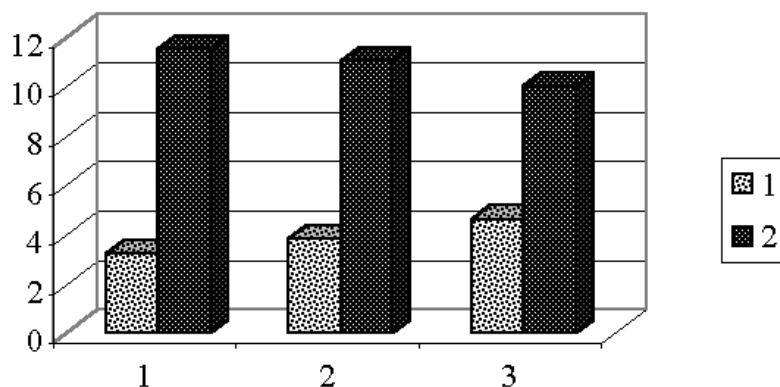


Рис. 2. Влияние этилимидазол-1-илкарбоксимидата и этилбензимидазол-1-илкарбоксимидата в концентрации 300 мкг/мл на длительность лаг-фазы (1) и время выхода культуры кандид в стационарную фазу (час); (2) 1 — контроль (60% этанол); 2 — этилимидазол-1-илкарбоксимидат; 3 — этилбензимидазол-1-илкарбоксимидат

При подсчете грибковых колоний нами не было выявлено достоверных отличий между числом колоний, выросших из контрольных клеток грибов, и между числом колоний, образованных клетками из опытных проб. Из этого можно сделать вывод, что исследуемые вещества обладают скорее фунгиостатическим, а не фунгицидным действием. Однако отмечается замедление роста колоний, уменьшение их диаметра, изменение формы, цвета колоний. Клетки, не обработанные веществами, образовывали характерные для *C. albicans* колонии типа "капли майонеза" светло-желтого цвета [10]. Клетки, подвергнутые воздействию ImC(NH)OEt и BzImC(NH)OEt, образовывали колонии с серовато-желтым оттенком "разжиженной" консистенции. Культура *C. albicans* под влиянием изученных азольных соединений диссоциировала на капсульные, или S-формы, и бескапсульные — R-формы, что свидетельствует о снижении патогенности штамма. Известно, что R-формы не патогенны. Контрольные пробы образовали только гладкие капсульные колонии S-формы.

Основным механизмом фунгиостатического действия изученных соединений, возможно, является быстрое проникновение их в мембрану из-за достаточной гидрофобности, что нарушает работу мембраноассоциированных ферментов, особенно АТФ-аз. Это приводит к потере клеткой необходимого метаболического фонда: ионов, аминокислот, фосфатов. Наиболее гид-

рофобный этилбензимидазол-1-илкарбоксимидаат оказывал достоверно большее фунгиостатическое действие.

На основании вышеизложенных данных можно рекомендовать дальнейшее изучение биологической активности вновь синтезируемых соединений на основе имидазола. Это способствует не только поиску новых, более эффективных препаратов, но и позволяет установить определенные закономерности по связи химического строения и биологической активности препаратов.

Литература

- [1] Реброва Р.Н., Чистякова И.С., Серебренникова И.И. Грибы рода *Candida* у здоровых людей // Вестник дерматологии. 1990. №3. С. 62–65.
- [2] Кошкин П.Н. Медицинская микология. Л.: Наука, 1962. С. 89–101.
- [3] Новые фармакологические препараты / Под ред. Н.Д.Машковского, М.: Медицина, 1987. 56 с.
- [4] Меджаян А.Л., Тер-Захарян Ю.З., Пароникян Р.М. и др. Антибактериальное и противоцистозное действие некоторых производных имидазола // Биологические свойства природных соединений. Ереван, 1962. С. 52–54.
- [5] Черепенко Т.И., Сапожникова И.Р. Фунгицидная активность производных бензимидазола // Физиологически активные вещества. Киев: Наукова думка, 1978. №10. С. 24–25.
- [6] Антоньев А.А., Бульвахнер Л.А., Глазкова Л.К. и др. Грибы рода *Candida*. М.: Медицина, 1985. С. 35–41.
- [7] Бриан Л.Е. Резистентность и чувствительность микроорганизмов к химиопрепаратам. М.: Медицина, 1982. 74 с.
- [8] Пурыгин П.П., Паньков С.В., Беякова Н.А. и др. Реакции 1-цианимидазола и 1-цианобензимидазола с алифатическими спиртами // ЖОХ. 2002. Т. 72. Вып. 8. С. 1369–1371.
- [9] Лещенко В.М. Лабораторная диагностика грибковых заболеваний. М.: Медицина, 1982. 140 с.
- [10] Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследованиям / Под ред. Н.О.Биргера. М.: Медицина, 1982. 311 с.
- [11] Ждан-Пушкина С.М. Основы роста культур микроорганизмов. Л.: Изд-во ЛГУ, 1983. 94 с.
- [12] Паников Н.С. Кинетика роста микроорганизмов: общие закономерности. М.: Наука, 1982. 206 с.
- [13] Фролов Ю.П. Математические методы в биологии. ЭВМ и программирование. Самара: Изд-во СамГУ, 1997. 120 с.

- [14] Руководство к лабораторным занятиям по микробиологии / Под ред. Л.Б. Борисова. М.: Медицина, 1979. 52 с.
- [15] Островский Ю.М. Этанол и обмен веществ. Минск: Наука и техника, 1982. 64 с.

Поступила в редакцию 09/VII/2004;
в окончательном варианте — 09/VII/2004.

**SYNTHESIS AND ANALYSIS OF IMIDAZOLE
DERIVATIVES EFFECT ON PARAMETERS
OF GROWTH AND MORPHOLOGICAL
CHARACTERISTICS OF FUNGUSES
OF A KIND OF CANDIDA**

© 2004 O.N. Nechaeva⁶ N.A. Klenova⁷ P.P. Purygin⁸ E.A. Shubina⁹
N.Y. Khokhlova¹⁰

Ethylimidazol-1-ylcarboximide and ethylbenzimidazol-1-ylcarboximide are synthesized and their antifungal activity is analysed. It is shown that the studied chemical compounds have fungistatic activity in relation to fungi of a kind of *Candida*.

Paper received 09/VII/2004.

Paper accepted 09/VII/2004.

⁶Nechaeva Olga Nikolaeva (labazova@mail.ru), Dept. of Organic Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

⁷Klenova Natal'ya Anatol'evna, Shubina Elena, Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

⁸Purygin Pyotr Petrovich (purygin2002@mail.ru), Dept. of Organic Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

⁹Shubina Elena, Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

¹⁰Khokhlova Natal'ya Yur'evna, Dept. of General and Theoretical Physics, Samara State Academy of Railway Communication, Samara, 443066, Russia.