

С.А.Лужнова¹, М.Ю.Юшин¹, А.В.Воронков²,
С.А.Осыченко², Н.М.Габитова¹, Е.А.Юртаева¹

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНОГО 1,3-ДИАЗИНОНА-4 СОЕДИНЕНИЯ ПЯТd1 IN VIVO

¹НИИ по изучению лепры, Астрахань; ²Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал Волгоградского государственного медицинского университета

Цель. Исследовать противолепрозную активность производного 1,3-дiazинона-4 соединения под лабораторным шифром ПЯТd1 на модели интраплантарного заражения мышей и оценить характер его антибактериального действия. **Материалы и методы.** Исследование специфической активности проводили *in vivo* на экспериментальной модели лепры, предложенной Shepard C.C., которая предполагает осуществление интраплантарного заражения мышей суспензией микобактерий, приготовленной из лепром или аутопсийной ткани нелеченного больного лепрой, или из тканей экспериментальных мышей, ранее зараженных *Mycobacterium leprae* от нелеченных больных. Исследование проведено на 120 мышах линии СВА, зараженных М. leprae (VIII пассаж) от больного М. Дапсон и соединение ПЯТd1 животным вводили на следующий день после заражения вместе с кормом в дозе 25 мг/кг в течение 4,5; 6; 9; 11 месяцев. Мышей делили на 3 группы: контроль (зараженные без лечения), сравнения (зараженные, получавшие дапсон), опытная (зараженные, получавшие ПЯТd1). По истечению контрольного срока мышей забивали под хлороформным наркозом. Из подушечек лап готовили суспензию для подсчета микобактерий. Мазки окрашивали по Цилю—Нильсону. **Результаты.** Через 4,5 мес. интенсивность размножения инфекта под действием дапсона и ПЯТd1 была снижена в сравнении с контролем в 18 — 25 раз. После 6-месячного курса — на 50 — 75%, через 9 месяцев — на 85 — 90%. Через 11 месяцев у мышей, получавших ПЯТd1, наблюдали интенсивное подавление размножения микроорганизмов: «урожай» в лапах был в 70 раз ниже, чем в контроле. В группе, получавшей дапсон, выявлено снижение количества микобактерий в 20 — 25 раз, что было статистически достоверно менее эффективно, чем в условиях применения ПЯТd1. **Заключение.** Новое производное 1,3-дiazинона-4 под шифром ПЯТd1 способно активно подавлять размножение М. leprae, что свидетельствует о его специфической антимикобактериальной активности и обуславливает перспективность его дальнейшего исследования.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 18—22

Ключевые слова: противолепрозная активность, производное 1,3-дiazинона-4 ПЯТd1, модель Shepard C.C., М. leprae

С.А.Лужнова¹, М.Ю.Юшин¹, А.В.Воронков²,
С.А.Осыченко², Н.М.Габитова¹, Е.А.Юртаева¹

EXPERIMENTAL STUDY OF SPECIFIC ACTIVITY OF 1.3-DIAZINON-4 COMPOUND PYAd1 DERIVATIVE IN VIVO

¹Research Institute for Leprosy, Astrakhan; ²Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute — Branch of Volgograd State Medical University, Russia

Aim. Study anti-leprosy activity of a 1.3-diazinon-4 compound derivative under the laboratory code PYAd1 on the model of intra-plantar infection of mice and evaluate the character of its antibacterial effect. **Materials and methods.** Study of specific activity was carried out *in vivo* on the experimental model of leprosy, proposed by Shepard C.C., that assumes execution of intra-plantar infection of mice with a suspension of mycobacteria, produced from lepromas or autopsy tissue of a non-treated leprosy infected, or from tissues of experimental mice, previously infected with *Mycobacterium leprae* from non-treated patients. The study was carried out on 120 CBA line mice infected with *M. leprae* (VIII passage) from patient M. Dapsone and PYAd1 compound were

administered to animals next day after the infection with forage at a dose of 25 mg/kg for 4.5, 6, 9 and 11 months. The mice were split into 3 groups: control (infected without treatment), comparison (infected, receiving dapsone), experimental (infected, receiving PYaTd1). After the control term the mice were euthanized under chloroform anesthesia. Suspensions for quantification of mycobacteria were prepared from paw pads. Smears were stained by Ziehl—Nilsson. *Results.* After 4.5 months the intensity of infect reproduction under the effect of dapsone and PYaTd1 was reduced compared with control by 18 — 25 times. After a 6-month course — by 50 — 75% and after 9 months — by 85 — 90%. After 11 months in mice that had received PYaTd1, an intensive suppression of microorganism reproduction was observed: the yield in paws was 70 times lower than in control. In the group that had received dapsone, a reduction of the number of mycobacteria by 20 — 25 times was detected, it was significantly less effective than under the conditions of PYaTd1 administration. *Conclusion.* A novel 1,3-diazinon-4 derivative under the code PYaTd1 can actively suppress reproduction of *M. leprae*, that gives evidence regarding its specific anti-mycobacterial activity and determines perspectives of its further studies.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 18—22

Key words: anti-leprosy activity, 1,3-diazinon-4 derivative PYaTd1, Shepard C.C. model, *M. leprae*

ВВЕДЕНИЕ

Первый из сульфонов — дапсон был синтезирован в 1908 году, однако его антибактериальные свойства были впервые выявлены лишь в 1937 году при экспериментальной инфекции у мышей, вызываемой *Streptococcus pyogenes*. Определенная в эксперименте терапевтическая доза препарата оказалась неприменимой в клинике, т. к. была близка к токсической. Позднее была выявлена способность дапсона подавлять развитие экспериментального туберкулеза у морских свинок. Только в 1943 г. Faget и др. сообщили об успешном применении его при лепре [6].

До настоящего времени препараты сульфонового ряда остаются основными средствами лечения лепры. Однако они не лишены ряда существенных недостатков. Сроки лечения больных остаются длительными, наблюдаются токсические осложнения (гемолитическая анемия, агранулоцитоз, нейротоксичность и др.), растет первичная и вторичная резистентность к дапсону [7]. В связи с тем, что проблема лечения больных лепрой полностью не решена, изыскание новых соединений, обладающих противолепрозной активностью, сохраняет свою актуальность.

Результат первичного скрининга, проведенного нами *in vitro* в отношении *M. lufu* — тестовой культуры для первичного отбора противолепрозных препаратов [4], показал, что производное 1,3-дiazинона-4 под лабораторным шифром ПЯTd1 проявляет специфическую антимикобактериальную активность. В опытах на животных показано, что при хроническом ежедневном внутрижелудочном введении (30 дней) ПЯTd1 не вызывает гибели крыс, изменения их веса и массового коэффициента внутренних органов [3] и, в отличие от дапсона, не оказывает токсического влияния на морфофункциональные характеристики эритроцитов и мегакариоцитопоэза [2]. Это обуславливает перспективность исследования его специфической активности *in vivo*.

В связи с этим, целью нашей работы явилось исследование противолепрозной активности производного 1,3-дiazинона-4 соединения под лабораторным шифром ПЯTd1 на модели интраплантарного заражения мышей [9] и оценка характера его действия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование специфической активности проводили *in vivo* на экспериментальной модели лепры, предложенной Shepard С.С. [9], которая предполагает осуществление интраплантарного заражения мышей суспензией микобактерий, приготовленной из лепром или аутопсийной ткани нелеченного больного лепрой, или из тканей экспериментальных мышей, ранее зараженных *M. leprae* от нелеченных больных, т.е. «из лапки в лапку».

Дапсон и соединение ПЯТd1 животным вводили вместе с кормом. Для обеспечения постоянного поступления препарата в организм мышей готовили кормолекарственную смесь путем смешивания комбикорма с исследуемым веществом. Для приготовления кормолекарственной смеси использовали специальный роторный миксер «Rotomixer» (Англия). На 1 кг сухого комбикорма добавляли 100 мг вещества (дапсона), получая, таким образом, смесь, содержащую 0,01% соединения ПЯТd1 (или дапсона) при введении мышам в дозе 25 мг/кг. Введение препарата с пищей считается наиболее оптимальным, так как этим достигается постоянная его концентрация в крови животных. Метод позволяет добиться адекватных результатов в ходе исследования. Учитывая, что мышь в сутки съедает около 5 г сухого корма, и это зависит от ее веса, который меняется с возрастом, такой способ введения вещества позволяет обеспечить строгий контроль за дозой, поступающей в организм [1]. Использование кормолекарственных смесей рекомендовано ВОЗ в качестве стандартного метода введения лекарственных препаратов, испытываемых на противолепрозную активность. В данном случае использовали максимально эффективную дозу 25 мг/кг (МЭД) [8], сопоставимую по воздействию с дозой, применяемой при лечении дапсоном больных лепрой людей (100 мг в сутки).

Работа выполнена на 120 мышах линии СВА. Животные были заражены *M. leprae* (VIII пассаж) от больного *M.* Каждой мышке интраплантарно вводили 0,03 мл суспензии, содержащей 10^4 микробных тел. Мышей делили на три группы: 1 — контроль (зараженные, не получавшие специфического лечения); 2 — сравнения (зараженные, получавшие дапсон); 3 — опытная (зараженные, получавшие соединение ПЯТd1). Дапсон и соединение ПЯТd1 начинали вводить на следующий день после заражения. Через 4,5; 6; 9 и 11 месяцев с начала эксперимента по 10 животных из каждой группы забивали под хлороформным наркозом, отсекали правую заднюю лапу, из которой готовили суспензию для подсчета микобактерий. Для этого тщательно срезали ткани подушечки отсеченной лапки, измельчали ножницами. Измельченные ткани перетирали в фарфоровой ступке, добавив 2,0 мл дистиллированной воды. Полученную суспензию центрифугировали 3 мин при 1000 об/мин для осаждения грубых тканевых частиц, из супернатанта готовили мазок для подсчета микобактерий. Для приготовления мазка использовали специальные предметные стекла с нанесенными на них кругами площадью 1 см^2 . В середину каждого круга помещали 10 мкл 0,1% раствора альбумина в дистиллированной воде, добавляли 10 мкл исследуемой суспензии *M. leprae*. Жидкости смешивали и равномерно распределяли по поверхности круга так, чтобы наружный край мазка касался внутреннего края окружности круга. Мазок высушивали на воздухе и фиксировали над пламенем горелки, окрашивали по Цилю–Нильсону.

Подсчет количества микобактерий проводили по методу Shepard С.С. [10] под микроскопом с использованием иммерсионного объектива в любых 20 полях зрения по диаметру каждого круга. На каждую суспензию готовят по 3 мазка (на одном стекле), следовательно, общее число полей зрения, сосчитанных для каждой суспензии, составляет 60.

Все манипуляции проводили согласно [5].

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью программ Biostat 2009. Показатель достоверности различий определяли по t-критерию Стьюдента.

Динамика размножения *M. leprae* в подушечках лап мышей при различных курсах терапии (кол-во $\times 10^8$ /мл)

Группы	Длительность введения			
	4,5 мес.	6 мес.	9 мес.	11 мес.
Контроль	2,66 ± 0,7	5,18 ± 1,0	105,7 ± 3,7	350,0 ± 51,3
Дапсон	0,12 ± 0,03**	1,26 ± 0,4*	16,5 ± 7,8*	15,2 ± 4,3***
ПЯТd1	0,12 ± 0,025**	2,4 ± 0,6*	12,5 ± 3,5*	4,9 ± 0,98***#

Примечание: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001 относительно контроля; # P < 0,05 относительно дапсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования, проведенные *in vivo* на экспериментальной модели лепры Shepard С.С., показали следующие результаты (табл.).

Как видно из табл., у мышей, зараженных *M. leprae* и не получавших лечения, «урожай» микобактерий в лапах через 4,5 месяца с начала эксперимента был значительно выше, чем у животных в условиях введения препаратов. Уровень интенсивности размножения инфекта в группах, получавших дапсон и новое производное 1,3-диазинона-4, была идентичной. Среднее количество микобактерий в 1 мл суспензии, полученной из ткани лап мышей, было снижено в сравнении с контролем в 18 — 25 раз. Через 6 месяцев со времени заражения количество микобактерий у контрольных животных продолжало нарастать. В группах, получавших лечение, степень обсемененности была ниже в 2 — 5 раз.

Активность дапсона на данном этапе исследования была выше соединения ПЯТd1, однако статистически достоверной разницы между показателями в этих группах не наблюдали.

Через 9 месяцев после начала эксперимента популяция микобактерий в лапах мышей относительно показателей 6 месяцев увеличилась в 20 раз, при введении мышам дапсона — в 13 раз, а при применении соединения ПЯТd1 — только в 5 раз. Интенсивность воздействия дапсона и соединения ПЯТd1 на размножение инфекта была сопоставимой.

Через 11 месяцев в условиях применения ПЯТd1 наблюдали интенсивное подавление размножения микроорганизмов: «урожай» в лапах был в 70 раз ниже, чем в контроле. В группе, получавшей дапсон, выявлено снижение количества микобактерий в 20 — 25 раз, что было статистически достоверно менее эффективно.

До настоящего времени исследование основных биологических аспектов *M. leprae*, включая их метаболизм и химическую структуру, тормозит тот факт, что их не удается культивировать *in vitro*, тогда как это открывало бы большие возможности для создания новых и совершенствования имеющихся диагностических, профилактических и химиотерапевтических методов для борьбы с лепрой. Действие лекарственных препаратов на *M. leprae* и лекарственная резистентность микобактерий по рекомендации ВОЗ по-прежнему в настоящее время проверяется путем введения их в подушечки лап нормальных (иммунологически интактных) мышей.

Наши исследования, проведенные на рекомендованной ВОЗ модели, позволили оценить способность нового производного 1,3-диазинона-4 под шифром ПЯТd1 влиять на интенсивность размножения пассированного штам-

ма *M. leprae*, изначально выделенного из организма больного, и сравнить его действие с основным противолепрозным препаратом дапсоном. Результаты исследования показали, что при длительном введении соединения ПЯТd1 в условиях *in vivo* выявлено выраженное снижение интенсивности нарастания популяции *M. leprae* в подушечках лап животных. Воздействие соединения не только сопоставимо с действием основного противолепрозного препарата дапсона, но и при более длительном курсе превосходит его.

Таким образом, соединение ПЯТd1 способно активно подавлять размножение *M. leprae*, что свидетельствует о специфической антимикобактериальной активности производного 1,3-диазинона-4 под шифром ПЯТ1 и обуславливает перспективность его дальнейшего исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Батрак Г.Е., Кудрин А.Н. Дозирование лекарственных средств экспериментальным животным. М., Медицина, 1979.
2. Воронков А.В., Лужнова С. А., Осыченко С.А., Габитова Н.М. Оценка влияния нового производного диазинона ПЯТd1 на некоторые показатели периферической крови крыс обоего пола. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2015, 4 (56): 124-126.
3. Воронков А.В., Кодониди И.П., Лужнова С. А., Ловягина С.А., Авраменко Н.С., Сочнев В.С., Воронкова М.П., Габитова Н.М. Изучение влияния соединения ПЯТd1 на динамику веса и массовый коэффициент органов животных. Фундаментальные исследования. 2015, 2: 3319-3322.
4. Лужнова С.А., Габитова Н.М., Воронков А.В., Кодониди И.П., Ловягина С.А., Сочнев В.С. Оценка антимикобактериальной активности новых производных диазинона. Фундаментальные исследования. 2015, 2: 2377-2380.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. А.Н. Миронова (ред.). М., Гриф и К, 2012.
6. Урляпова Н.Г. Чувствительность микобактерий лепры и туберкулеза к производным дихлормалеиновой кислоты. Дис. канд. мед. наук. М., 1985.
7. Ghu G.I., Stiller M.G. Dapsone and sulfones in dermatology overview and update. J. Am. Acad. Dermatol. 2001, 45(3):420-434.
8. Levi L. Activity of derivatives and analogs of dapsone against *Mycobacterium leprae*. Antimicrobial Agent Chemother. 1978, 14: 791-793.
9. Shepard C. C. The experimental disease that follows the infection of human leprosy bacilli into footpads of mice. J. Exp. Med. 1960, 112: 445-458.
10. Shepard C.C. Drugs against *M. leprae* in the mouse and in man. Int. J. Lepr. 1968, 36: 650.

Поступила 23.03.16

Контактная информация: Лужнова Светлана Алексеевна, к.б.н.,
414057, Астрахань, пр. Н.Островского,3, р.т. (8512)34-72-84