

УДК 616.24-002.5-097-07-085.28

Л. Д. Тодоріко
І. В. Єременчук

Буковинський державний медичний
університет, м. Чернівці

ВПЛИВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ГЕТЕРОЦИКЛІЧНИХ СПОЛУК, ПОХІДНИХ ІМІДАЗОЛУ НА МІКОБАКТЕРІЇ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Ключові слова: мікобактерії туберкульозу, мультирезистентний туберкульоз легень, гетероциклічні сполуки, похідні імідазолу, ізоніазид.

Резюме. Основна причина погіршення епідемічної ситуації з туберкульозу (ТБ) полягає в зміні біологічних властивостей мікобактерій (МБТ) під впливом антимікобактеріальних препаратів (АМБП) із розвитком полі- та мультирезистентних штамів *M. tuberculosis*. Нами проведений аналіз щодо ефективності та впливу нових синтезованих гетероциклічних сполук на МБТ. Показано, що за своєю протитуберкульозною дією нові синтезовані сполуки (II, IV, V, VI, VII) при концентрації в живильному середовищі 0,05 мкг/мл у 4 рази активніші, ніж використаний в ролі тест-об'єкта загальновідомий препарат ізоніазид. Нові синтезовані сполуки можуть бути прототипами для створення високоефективних протитуберкульозних лікарських засобів.

Вступ

Мультирезистентний туберкульоз (МРТБ) діагностують у 102 з 109 країн світу. За даними ВООЗ, у світі близько 50 млн. людей інфіковано резистентними до АМБП штамами МБТ. Основна причина погіршення епідемічної ситуації полягає в зміні біологічних властивостей МБТ з розвитком полі- та мультирезистентності штамів *M. tuberculosis* до АМБП [3, 4, 12].

Понад півстолітній досвід хіміотерапевтичного впровадження у клінічну медицину антибіотиків довів, що використання цих препаратів закономірно супроводжується прогресуючим зростанням побічних ефектів. При цьому особливу занепокоєність викликає розвиток лікарсько-стійких варіантів збудників, що вказують на негативну динаміку щодо ефективності існуючих програм лікування [1, 5, 7, 15].

Основна причина погіршення епідеміологічної ситуації полягає в зміні біологічних властивостей бацил, невдача першого та повторного курсів хіміотерапії, перерване лікування, рецидиви туберкульозу, безуспішне лікування, контакт із хворим на хіміорезистентний туберкульоз, недостатня ефективність існуючих АМБП та відсутність оптимізованої хіміотерапії з використанням саме бактерицидних препаратів [2, 17]. Все це є причиною розвитку полі-, мульти- та розширеної резистентності штамів *M. tuberculosis* до АМБП.

Мета дослідження

Дослідити ефективність нових синтезованих гетероциклічних сполук на основі молекули ізоніазиду, що володіють протитуберкульозною дією.

© Л. Д. Тодоріко, І. В. Єременчук, 2013

Матеріал і методи

У дослідження включені нові синтезовані 22 гетероциклічні сполуки з наступним встановленням їх впливу на *M. tuberculosis*, які виділені з харкотиння 10 хворих на вперше діагностований туберкульоз легень. Визначення гострої токсичності проводили стандартним методом на 25 білих мишах масою 22-26 г обох статей. Використані експериментальні, мікроскопічні, мікробіологічні та статистичні (1 ряд) методи дослідження.

Експериментальна частина

Дослідження протитуберкульозної дії та активності N²-(1H-імідазол-5-іл)-метиле]ізонікотиногідрозидів (I-VII). Для приготування розведень використовували хімічно чисті субстанції препаратів, які розводили ДМСО та 96% етиловим спиртом. В якості живильного середовища використовували середовище Левенштейна-Єнсена.

Готували гомогенну бактеріальну суспензію в 0,9% розчині хлориду натрію. Для цього культуру, що виросла на твердому живильному середовищі Левенштейна-Єнсена знімали тампоном, попередньо змоченим у стерильному 0,9% розчині хлориду натрію. Тампон занурювали у пробірку, що містила 2,0 мл стерильного 0,9% розчину хлориду натрію, культуру змивали у рідину, попередньо розтираючи по внутрішніх стінках пробірки. Пробірку залишали на 30 хв. при кімнатній температурі. Бактеріальну суміш розводили стерильним ізотонічним розчином хлориду натрію до розведень 10⁻² (K₁) і 10⁻⁴ (K₂). Підігривають панель з середовищем Левенштейна-Єнсена, що містила досліджувані сполуки, до кімнатної температури, до-

давали по 0,1 мл підготовленої суспензії з концентрацією 10^{-2} клітин/мл до кожного флакону з середовищем Левенштейна-Єнсена, що містить досліджувані сполуки та в один із контролів K_1 . У другий контроль додають 0,1 мл суспензії з концентрацією 10^{-4} клітин/мл K_2 . Щільно закриті флакони інкубували при температурі $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Оцінку результатів проводили через 21 день.

Визначення активності синтезованих сполук по відношенню до штамів МБТ проводили методом пропорцій (метод Канетті) [6], який зводиться до виявлення пропорції між чутливими та стійкими особинами в популяції штаму МБТ, виділеного від хворого. Якщо кількість стійких особин до якогось АМБП в популяції буде менше 1,0 %, такий штам вважається чутливим до даного препарату, якщо стійкість особин в популяції більше 1,0% – штам вважається стійким до даного препарату.

Обговорення результатів дослідження

Беручи до уваги, що найвищою часткою в структурі мультирезистентності штамів МБТ серед 43 обстежуваних пацієнтів, є розширена стійкість МБТ, яка встановлена у 67,4% хворих і формується за рахунок резистентності до стрептоміцину (HRS, HRSE, HRSZ, HRSEZ, HRSEEt) у 53,5 % пацієнтів, піразинаміду (HRZ, HRSZ, HRSEZ) – в 27,9 %, етамбутолу (HRE, HRSEZ, HRSEEt, HRSEZ) – в 37,2 %.

Отже, характерною особливістю МБТ на сучасному етапі є їх надзвичайна мінливість, завдяки якій вони здатні швидко звикати до АМБП [2, 4, 8, 16]. Як результат, все частіше з'являються хворі, яким класичне лікування вже не допомагає [13]. Останніми роками суттєво зростає частота МРТБ зі стійкістю до препарату I ряду - ізоніазиду. Тому розробка та вивчення ефективності впливу нових синтезованих гетероциклічних сполук (на основі молекули ізоніазиду) на мікобактерії туберкульозу є досить актуальним.

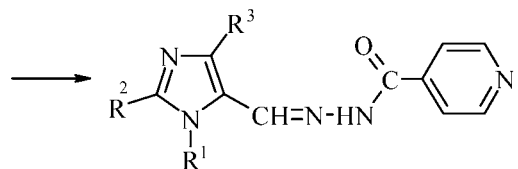
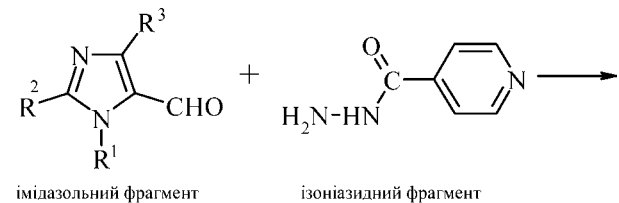
Найближчим аналогом за терапевтичною дією до сполук, які заявляються, є гідразид ізонікотинової кислоти (ізоніазид) [9, 11, 14] – один із найвживаніших недороговартісних і ефективних лікарських засобів I ряду, що застосовується при терапії туберкульозу.

Зважаючи на потенційну протитуберкульозну активність ряду похідних імідазолу [7, 10, 11], вирішення поставленого завдання досягається синте-

зом нових структур, які містять ізоніазидний та імідазольний фрагменти - N^7 -[(імідазол-5-іл)метилен]ізонікотиногідрозидів.

Для одержання заявлених сполук, нами розроблена препаративно зручна одностадійна схема, яка базується на конденсації доступних 4(2)-заміщених 1-алкіл(арил)-5-формілімідазолів [9, 11]. При їх нагріванні з гідразидом ізонікотинової кислоти в оцтовій кислоті утворюються відповідні N^7 -[(1*H*-імідазол-5-іл)метилен]ізонікотиногідрозиди (I-VII), відсоток виходу 75-85 %.

де, $R^1 = \text{Ph}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Cl}$ (I); $R^1 = 4\text{-ClC}_6\text{H}_4$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{SH}$ (II); $R^1 = \text{Ph}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{SCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ (III); $R^1 = 4\text{-ClC}_6\text{H}_4$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{SCH}_2\text{COOH}$ (IV); $R^1 = 4\text{-FC}_6\text{H}_4$,



N^7 -[(імідазол-5-іл)метилен]ізонікотиногідрозид I-VII

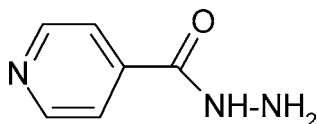
$R^2 = \text{Cl}$, $R^3 = \text{Cl}$ (V); $R^1 = 4\text{-ClC}_6\text{H}_4$, $R^2 = \text{N}_3$, $R^3 = \text{Cl}$ (VI); $R^1 = \text{Me}$, $R^2 = 3\text{-NO}_2\text{C}_6\text{H}_4$, $R^3 = \text{Cl}$ (VII).

Схема ілюструється прикладами синтезу цільових сполук, структура яких підтверджена аналітичними даними і результатами вимірів інфрачервоних спектрів та спектрів ядерних магнітних резонансів (ЯМР) ^1H .

Загальний спосіб одержання N^7 -[(1*H*-імідазол-5-іл)метилен]ізонікотиногідрозидів (I-VII).

До розчину 1 ммоль 4(2)-заміщеного 1-алкіл(арил)-5-формілімідазолу у 20 мл 70 %-ї оцтової кислоти додавали 0,15 г (1,1 ммоль) гідразиду ізонікотинової кислоти і нагрівали при кип'ятінні упродовж 15 хв., утворений при охолодженні осад відфільтровували, висушували та кристалізували з етанолу.

Гостру токсичність (LD_{50} – доза, при якій гине 50 % піддослідних тварин) визначали стандартним методом [8] на 25 білих мишах масою 22-26 г. обох статей. Усі роботи з тваринами проводили згідно ОСТ 42 1-88 «Тварини лабораторні. Технологічний процес», з дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та з іншими науковими цілями, від 18.03.1986 р., Директиви ЄС № 609 від 24.11.1986 р. і МОЗ України № 281 від 01.11.2000 р. Експериментальних



Таблиця

Чутливість штамів МБТ по відношенню до нових синтезованих сполук (I-VII)

Сполука	Концентрація в живильному середовищі (мкг/мл)			
	1	0,2	0,1	0,05
I	+++	-	-	-
II	+++	+++	+++	+++
III	+++	-	-	-
IV	+++	+++	++	+++
V	+++	+++	++	+++
VI	+++	+++	+++	+++
VII	+++	+++	+++	+++
Ізоніазид	+++	+++	++	+

Примітки. +++ - 100 % штамів МБТ, виділених від хворих, чутливі до сполуки в наведеній концентрації; ++ - 90 % штамів МБТ чутливі до сполуки; + - 70 % штамів МБТ чутливі до сполук; - - штами МБТ стійкі до синтезованих сполук.

тварин утримували в стандартних умовах віварію на звичайному раціоні при вільному доступі до води та їжі, в умовах нормального температурного і світлового режимів. Досліджувані речовини розчиняли в диметилсульфоксиді (ДМСО), вводили вранці перорально через шлунковий зонд однократно в діапазоні доз від 50,0 мг/кг до 3000 мг/кг маси тіла. Токсичність речовини оцінювали за показником виживання тварин та їх поведінкою. Спостереження за піддослідними тваринами проводилося протягом двох тижнів.

У всіх тварин, що загинули, смерть настала протягом першої доби. При введенні досліджуваних речовин у дозі 1500 мг/кг маси тіла у тварин спостерігали в'ялість, зниження рухової активності, зниження або втрату рефлексів, зниження реакції на подразники, клонічні судоми, після яких тварини гинули. Тварини, що залишились живими, були активними. При спостереженні протягом наступного тижня стан тварин залишався задовільним.

Згідно класифікації К.К. Сидорова синтезовані сполуки є практично не токсичні і при пероральному введенні мишам LD_{50} становить 1500 мг/кг ($1001 < LD_{50} < 3000$ мг/кг) та відносяться до 4 класу токсичності (речовини малотоксичні).

Для дослідження використовували штами МБТ, виділені з харкотиння 10-ти хворих на вперше діагностований туберкульоз легень зі збереженою чутливістю до АМБП.

Всього поставлено 250 проб із концентрацією сполук 1 мкг/мл (22 сполуки на 10 хворих (220) + 2 контролю на 10 хворих (20) із розведенням 10^{-2} та 10^{-4} (чисте середовище) + 1 пробірок на 10 хворих (10) з розчинником ДМСО).

За рекомендаціями ВООЗ досліджували концентрації при яких визначають стійкість МБТ до ізоніазиду: 1,0 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,1 мкг/мл та 0,05 мкг/мл.

Підсумовані результати, які наведені в таблиці засвідчують, що за своєю протитуберкульозною дією нові синтезовані сполуки (II, IV, V, VI, VII) при концентрації в живильному середовищі 0,05 мкг/мл у 4 рази активніші ніж використаний у ролі тест-об'єкта загальновідомий препарат ізоніазид.

Висновок

Нові синтезовані гетероциклічні сполуки на основі молекули ізоніазиду (II, IV, V, VI, VII) при концентрації в живильному середовищі 0,05 мкг/мл у 4 рази активніші ніж використаний в ролі тест-об'єкта препарат ізоніазид і можуть бути прототипами для створення високоефективних протитуберкульозних лікарських засобів, зокрема, для лікування хіміорезистентних форм туберкульозу легень.

Перспективи подальших досліджень

Продовжується другий етап дослідження, встановлення впливу штучно синтезованих гетероциклічних сполук (похідних імідазолу) на резистентні штами *Micobacterium tuberculosis*.

Література. 1. Бялик И. Б. Актуальные вопросы химиотерапии больных мультирезистентным деструктивным туберкулезом легких / И. Б. Бялик // Туберкулез. Легеневі хвороби. ВІЛ-інфекція. – 2011. – № 1. – С. 13-19. 2. Дорожкова И. Р. Состав и лекарственная чувствительность микобактериальной популяции у больных с подозрением на туберкулез / И. Р. Дорожкова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2005. – № 8. – С. 36-39. 3. Клинико-рентгенологические и бактериологические особенности лекарственно-резистентного туберкулеза / Г. Соколова, И. Богдельникова, М. Бирон [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2006. – № 12. – С. 16-20. 4. Костик О. Організаційно-мікробіологічні аспекти проблеми мультирезистентного туберкульозу на сучасному етапі / О. Костик, М. Пурська, Л. Ільницька // Наук. вісн. нац. мед. ун-ту ім. О.О. Богомольця. – 2008. – № 2. – С. 108-109. 5. Машковский М. Д. Лекарственные средства. Пособие для врачей. Т. 2. Москва, «Новая линия». – 2000. – С. 306-308. 6. Наказ МОЗ України № 45 від 06.02.2002. Про затвердження Інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції / http://www.moz.gov.ua/ua/portal/dn_20020206_45.html. 7. Оптим-

ізація стандартного режиму хіміотерапії при лікуванні хворих на мультирезистентний туберкульоз легень / Л.Д. Тодоріко, І.В. Єременчук, А.М. Грозав [та ін.] // Укр. пульмон. журн. №1. – 2012. – С. 8-12. 8. Пастушенко Т. В. Экспресс-метод определения среднесмертельных доз химических веществ / Т. В. Пастушенко, Л. Б. Маруший, А. А. Жуков // Гигиена и санитария. – 1985. – N 6. – С. 46-49. 9. Пат. 70708 Україна, МПК А61К 31/395 А61Р 31/06 С07D 213/06 С07D 233/02 С07D 249/06. N^o[1H-імідазол-5-іл)метилен] ізонікотиногідрати, що виявляють протитуберкульозну активність / Вовк М.В., Черноус В.О., Тодоріко Л.Д., Грозав А.Д., Єременчук І.В., Паламар А.О., Демидовська С.А. / Буковинський держ. мед. університет. – № u201113735; заявл. 22.11.2011; опубл. 25.06.2012, бюл. № 12. 10. Полифункциональные имидазолы II. Синтез и реакции с нуклеофильными реагентами 1-замещенных 2,4-дихлоро-1H-имидазол-5-карбалдегидов / В. А. Черноус, А. Н. Грозав, Э. Б. Русанов [и др.] // Журн. орг. химии. 2011. – Т. 47, № 5. – С. 699-706. 11. Противотуберкулезные свойства производных имидазола и бензимидазола / В. Н. Брицун, П. А. Карпов, А. И. Емец М. О. [та ін.] // Журн. орган. та фарм. хім. – 2011. – Т. 9, Вип. 3(35). – С. 3-14. 12. Пурська М. Б. Динаміка мультирезистентності мікобактерій туберкульозу в період епідемії / М. Б. Пурська // Прак. мед. – 2008. – Т. 14, № 3. – С. 137-141. 13. Тодоріко Л. Д. Особливості епідемії та патогенезу хіміорезистентного туберкульозу на сучасному етапі / Л. Д. Тодоріко // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2011. – № 4. – С. 38-41. 14. Черноус В. А. Полифункциональные имидазолы. III. Синтез 1-арил-2,4-дигалоген-1H-имидазол-5-карбоновых кислот и их производных / В. А. Черноус, А. М. Грозав, М. В. Вовк // Ж. органи. химия. – 2011. – Т. 47, № 38. – С. 1176-1180. 15. Establishing risk groups of multidrug-resistant tuberculosis and planning its therapeutic approach / L.D Todoriko, A.V Voiko, I.V. Yeremenchuk [et al.] // Бук. мед. вісник. – 2011. – № 2. – С. 173-178. 16. Yeremenchuk I. Characteristic heterocyclic compounds and their effect on mycobacterium tuberculosis / I. Yeremenchuk, L. Todoriko // Укр. журн. гематології та трансфузіології. – 2012. – № 4. – С. 473. 17. Kruuner A. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial testing and determination of critical concentrations of first- and second-line antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of Mycobacterium tuberculosis / A. Kruuner, M. D. Yater // J. Clin. Mikrobiol. – 2006. – № 44. – P. 811-818.

ВЛИЯНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, ПРОИЗВОДНЫХ ИМИДАЗОЛА НА МИКОБАКТЕРИИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Л.Д. Тодоріко, І.В. Єременчук

Резюме. Основная причина ухудшения эпидемической ситуации по туберкулезу (ТБ) заключается в изменении биологических свойств микобактерий (МБТ) под влиянием антимикобактериальных препаратов (АМБП) с развитием поли- и мультирезистентных штаммов M. tuberculosis. Нами проведен анализ эффективности и влияния новых синтезированных гетероциклических соединений на МБТ. Показано, что по своему противотуберкулезному действию новые синтезированные соединения (II, IV, V, VI, VII) при концентрации в питательной среде 0,05 мкг/мл в 4 раза активнее, чем использованный в качестве тест-объекта общеизвестный препарат изониазид. Новые синтезированные соединения могут быть прототипами для создания высокоэффективных противотуберкулезных лекарственных средств.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, мультирезистентный туберкулез легких, гетероциклические соединения, производные имидазола, изониазид.

EFFECT OF EXPERIMENTAL HETEROCYCLIC COMPOUNDS, IMIDAZOLE DERIVATIVES ON TUBERCULOSIS MYCOBACTERIA

L.D. Todoriko, I.V. Yeremenchuk

Purpose. To investigate the efficiency of new synthesized heterocyclic compounds based on the isoniazid molecule, possessing an antituberculous action.

Design/approach. An elaboration and studying the efficacy of the effect of new synthesized heterocyclic compounds (based on the molecule of isoniazid) on the mycobacteria of tuberculosis (MBT) is rather topical. The closest analog according to the therapeutic action to compounds is hydrazide of the isonicotinic acid (isoniazid) – one of the most widely used inexpensive drugs and effective medicinal agents of the first line that used in treating tuberculosis. Taking into consideration the potential antituberculous activity of a number of derivatives of imidazole we have carried out synthesis of new structures, containing isoniazid and imidazole fragments – N^o-[(imidazole -5-il) methylene] isonicotinohydrazide.

Findings. We have carried out an analysis as to the efficiency and the effect of heterocyclic compounds on MBT. It has been demonstrated that by their antituberculous action new synthesized compounds (II, IV, V, VI, VII) are 4 times more active in a nutrient medium with the concentration of 0.05 µg/ml than the well-known drug isoniazid used in the role of a test-object. Synthesized compounds are practically nontoxic and in case of a peroral administration to mice the lethal dose (LD₅₀) makes up 1500 mg/kg (1001 < LD₅₀ < 3000 mg/kg) and belongs to the 4th class of toxicity (slightly toxic substance)

Research limitations/implications. The new synthesized compounds may be prototypes for creating highly effective antituberculous medicinal agents.

Originality/value. By their antituberculous action new synthesized (on the basis molecule of the isoniazid molecule) heterocyclic compounds (II, IV, V, VI, VII) with the concentration in the nutrient medium of 0.05 µg/ml are 4 times more active than the well-known agent isoniazid used in the role of a test-object.

Keywords: tuberculosis mycobacteria, multiresistant pulmonary tuberculosis, heterocyclic compounds, imidazole derivatives, isoniazid.

Bukovyna State Medical University (Chernivtsi)

Clin. and experim. pathol. - 2013. - Vol.12, №2 (44). - P.176-179.

Надійшла до редакції 17.05.2013

Рецензент – проф. І. І. Заморський

© Л. Д. Тодоріко, І. В. Єременчук, 2013