

## ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ ПРОДУКТОВ ОРГАНИЧЕСКОГО СИНТЕЗА НА ПРОТИВОГРИБКОВУЮ АКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ДРОЖЖЕВЫХ ГРИБОВ: ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА УСЛОВИЙ ИСПЫТАНИЙ

В. В. Новикова, Е. В. Якимова, А. Д. Горбушина

ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия»

Поступила в редакцию 12.09.2021 г.

**Аннотация.** В связи с развитием устойчивости возбудителей микозов к имеющимся лекарственным средствам, а также выявлением видов грибов, ранее считавшихся непатогенными, возрастает потребность в эффективных противогрибковых средствах. В настоящее время имеют место следующие стратегии по разработке новых антифунгальных средств: перепрофилирование существующих препаратов, которые ранее использовались с иной целью; модификация существующих противогрибковых препаратов; создание новых противогрибковых агентов путем химического синтеза.

В ходе поиска новых соединений, обладающих противогрибковой активностью, одним из ключевых факторов, влияющих на результат, является методология определения данного вида биологической активности. В статье приведены существующие на сегодняшний день методы определения противогрибковой активности, необходимые для сравнения *in vitro* активности новых и используемых лекарственных препаратов, приведена обобщенная характеристика каждого метода, выделены и описаны их характерные особенности.

Экспериментально подтверждено влияние отдельных условий испытаний противогрибковой активности на конечный результат и обоснована значимость их выбора для дальнейших исследований. Показано, что более низкая конечная микробная нагрузка ( $10^3$  КОЕ/мл) и условия инкубирования при более низкой температуре ( $27^\circ\text{C}$ ), рекомендованные отдельными протоколами, способствуют получению более низких значений минимальной подавляющей концентрации, что может приводить к завышению результатов при оценке противогрибковой активности разрабатываемого соединения. Исходя из того, что изучаемые соединения предполагается использовать для фармакотерапии грибковых инфекций, целесообразнее придерживаться условий инкубации, рекомендуемых при оценке чувствительности к противогрибковым препаратам в клинических условиях.

Полученные результаты согласуются с анализируемыми условиями испытаний протоколов EUCAST и адаптированными российскими стандартами.

**Ключевые слова:** противогрибковая активность, метод серийных разведений, дрожжевые грибы рода *Candida*, МПК.

В последние десятилетия отмечается значительный рост числа грибковых заболеваний человека. В структуре поверхностных микозов, как правило, преобладают кандидоз слизистых оболочек, а также дерматофитии [1-5]. Так по данным [6], заболеваемость вульвовагинальным кандидозом - одним из наиболее часто встречаемых проявлений поверхностного кандидоза - за последние 20 лет увеличилась более чем в два раза. Сохраняют свою значимость дерматомикозы, вызываемые грибами-дерматофитами, дрожжевыми и плесневыми грибами – их распространённость остается на стабильно высоком уровне [3, 7, 8]. Наиболее

значимой причиной поверхностных микозов являются дрожжевые грибы рода *Candida* [9-12].

Одной из причин проблемы высокой распространенности микозов является развитие резистентности к антимикотическим препаратам – закономерного явления, возникающего в процессе взаимодействия популяции грибов с противогрибковыми препаратами [13, 14] В отдельных случаях показатели резистентности к используемым препаратам достигают 80% и более [15, 16], а у представителей дрожжевых грибов *Candida non-albicans* до 100% [17].

В связи с развитием устойчивости возбудителей к имеющимся лекарственным средствам, а также выявлением видов грибов, ранее считав-

шихся непатогенными, одной из задач фармацевтической химии является разработка эффективных противогрибковых средств. При анализе литературы выявлены следующие стратегии по разработке новых антифунгальных средств: перепрофилирование существующих препаратов, которые ранее использовались с иной целью; модификация существующих противогрибковых препаратов; создание новых противогрибковых агентов путем химического синтеза [18, 19]. В ходе поиска новых соединений, обладающих противогрибковой активностью (ПГА), одним из ключевых факторов является методология определения данного вида биологической активности.

Целью данной работы был подбор условий испытаний на противогрибковую активность впервые синтезированных соединений.

В настоящее время основным руководящим документом для доклинических испытаний новых соединений является Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (под ред. Миронова А.Н., 2012) [20]. Основными методами исследования противогрибковой активности веществ *in vitro* являются методы серийных разведений и метод диффузии в агар.

В методах разведений микроорганизмы тестируются на способность к видимому росту на жидких питательных средах, содержащих последовательные разведения антимикробного препарата с целью определения минимальной подавляющей концентрации (МПК). МПК свидетельствует об активности лекарственного препарата в описанных условиях испытания и может быть интерпретирована для целей практического здравоохранения [21]. В мировой практике в качестве стандартных методик используются протоколы M27-A4 [22] Clinical and Laboratory Standards Institute (Института клинических и лабораторных Стандар-

тов, CLSI) и European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Definitive Document EDef 7.3.1 [23] (Европейский комитет по вопросам исследования чувствительности к антимикробным препаратам, EUCAST). В Российской практике нормативными аналогами являются ГОСТ Р ИСО 16256-2015 «Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Референтный метод для тестирования активности *in vitro* антимикробных препаратов в отношении дрожжевых грибов, вызывающих инфекционные заболевания» [21] и Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2018 г. [24].

Методы микроразведения в бульоне, описанные в [20] базируются на методах CLSI [22] и EUCAST [23]. Несмотря на тенденцию к гармонизации, между указанными протоколами остаются определенные отличия и в последних версиях данных протоколов: самыми принципиальными являются содержание глюкозы в питательной среде (0.2% для стандарта CLSI и 2% - для EUCAST), конечная микробная нагрузка, время инкубирования, используемое оборудование и способ учета результатов (таблица 1). Так CLSI метод подразумевает визуальное определение МПК, а EUCAST – спектрофотометрическое, причем у каждого метода есть свои контрольные диапазоны значений этой величины. Другое отличие EUCAST метода состоит в использовании более высокой концентрации глюкозы в среде (для оптимизации роста), большего размера инокулюма (для обеспечения чтения после 24 ч инкубации для большинства видов), а также плоскодонных планшетов, что позволяет осуществить спектрофотометрическое, а не визуальное чтение результатов.

Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимик-

Таблица 1

Различия между протоколами CLSI и EUCAST при определении чувствительности дрожжей методом микроразведений

Характеристики	CLSI M27-A4	Eucast Edef 7.3.1
Формат	Круглодонные планшеты	Плоскодонные планшеты
Конечная микробная нагрузка	$0.5-2.5 \times 10^3$ КОЕ / мл	$0.5-2.5 \times 10^5$ КОЕ / мл
Питательная среда	RPMI 1640 с 0.2% глюкозой	RPMI 1640 с 2% глюкозой
Инкубационный период	24-48 ч за исключением: 72 ч для <i>Cryptococcus</i>	18-24 ч за исключением: 24-48 ч для <i>Cryptococcus</i>
Учет результатов	Визуально	Спектрофотометр

кробным препаратам» [24] максимально гармонизированы с действующими протоколами EUCAST, причем версии 2018-2021 г. предусматривают исследования мицелиальных грибов (плесени), которые не были учтены в ГОСТ [21].

В соответствии с рекомендациями [20] определение ПГА на ранних этапах *in vitro* подразумевает использование метода серийных разведений в жидкой питательной среде в двух модификациях: макрометодом (пробирочным) и микрометодом (с использованием 96-луночных планшетов). Данные методы изучения активности веществ не имеют принципиальных отличий за исключением используемого объема питательной среды с разведениями испытуемых веществ и объема инокулята культуры. В любом случае, как и в соответствующих протоколах CLSI и EUCAST, применяется оценка наличия противогрибкового эффекта изучаемого вещества в его двукратно уменьшающихся концентрациях. В случае пробирочного метода Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств предлагается использование жидкой среды Сабуро и среды RPMI 1640, в случае микрометода - среду RPMI 1640.

В настоящее время сложилась неоднозначная ситуация в отношении конечной микробной нагрузки при использовании различных методик определения ПГА. Согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [20] конечная концентрация клеток в опыте должна составлять  $1-5 \times 10^3$  КОЕ/мл для дрожжевых грибов и  $0.4-5 \times 10^4$  КОЕ/мл для дерматофитов. В соответствии с требованиями [21, 22] при визуальном способе чтения результатов конечная концентрация микроорганизмов в лунке  $0.5-2.5 \times 10^3$  КОЕ/мл, по требованиям [21, 23, 24] при спектрофотометрическом способе учёта результатов –  $0.5-2.5 \times 10^5$  КОЕ/мл. Столь существенная разница в предъявляемых требованиях не может не сказаться на конечных результатах. Использование более низкой концентрации микромицетов, рекомендованной отдельными протоколами и руководствами, может приводить к завышению результатов при оценке противогрибковой активности разрабатываемого соединения.

Температура инкубирования опытных планшетов – еще один значимый фактор, влияющий на конечный результат определения противогрибковой активности соединений. Можно отметить несоответствие температуры инкубирования по Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [20] основным регламенти-

рующим документам, касающихся процедур определения чувствительности к противогрибковым препаратам в клинических условиях [22-24]. В соответствии с [20] рекомендуется следующий температурный режим: планшеты инкубируют в термостате при 27°C без встряхивания в течение 24 ч для дрожжей и 48 ч для патогенных грибов (дерматомицетов). Обращает на себя внимание и тот факт, что согласно [20] условия выдержки посевов при использовании макрометода (пробирочного) существенно отличаются от микрометода: предлагается инкубировать засеянные пробирки в термостате при 27°C 14 дней, хотя методики, как уже было отмечено выше, принципиально не отличаются. По рекомендации [24] планшеты необходимо инкубировать без встряхивания при температуре  $35 \pm 2^\circ\text{C}$   $24 \pm 2$  часа, что, в целом, согласуется с протоколами CLSI и EUCAST. Таким образом, использование более низкой температуры инкубации посевов также может приводить к завышению результатов при оценке противогрибковой активности разрабатываемого соединения.

При анализе подходов к оценке результатов согласно российским и международным протоколам существенных отличий не выявлено: учет производится по 5-балльной шкале (от 0 - оптическая прозрачность, полное отсутствие роста до 4 - отсутствие подавления роста).

В повседневной практике большинства лабораторий метод серийных разведений практически не используется, его применяют в основном для эпидемиологических исследований и сравнения *in vitro* активности новых и используемых препаратов, т.е. в научных целях. Также этот метод может быть использован в целях контроля сопоставимости (воспроизводимости) результатов определения чувствительности дрожжей к противогрибковым препаратам между лабораториями [24] в качестве референтного метода, поскольку является более точным и информативным.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для оценки влияния микробной нагрузки ПГА нового соединения из группы производных арилпировиноградных кислот использовали метод микроразведений в отношении 4 типовых штаммов *Candida spp.* при температуре  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . Время инкубирования - в течение 24 часов. Для оценки влияния температурного фактора на конечный результат определения ПГА и выбора режима инкубирования была изучена ПГА исследуемого соединения методом микроразведений в отношении

20 клинических изолятов *Candida spp.* при температуре  $27\pm 1^\circ\text{C}$  и  $35\pm 1^\circ\text{C}$ . Время инкубирования в случае более низкой температуры осуществлялось до 72 часов, при более высокой температуре – в течение 24 часов. Исследования проводили в 3 повторах. Результаты исследования обрабатывали с помощью программы StatGraphics Plus, версия 5.0. Использовали метод однофакторного дисперсионного анализа. Критерием статистической достоверности получаемых данных считали общепринятую в медицине величину  $p < 0.05$ .

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Установлено наличие статистически значимых отличий МПК соединения при различной микробной нагрузке в эксперименте (табл. 2, рис.1). При этом МПК при концентрации изучаемых микроорганизмов  $10^5\text{КОЕ/мл}$  выше, чем при более низкой микробной нагрузке.

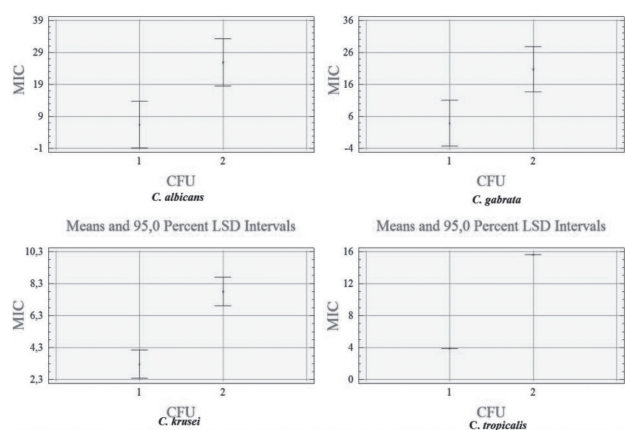


Рис. 1. Результаты статистической обработки результатов определения ПГА при различной микробной нагрузке.

Результаты исследований, полученные при разных температурных режимах инкубирования представлены в таблице 3. Установлено, что при рекомендованном для дрожжевых грибов режиме инкубации [20] -  $t = 27\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24 в большинстве случаев выявлена высокая ПГА: наблюдалось отсутствие роста микроорганизмов в 11-12 лунке. Через 48-72 часа выдержки в термостате при этой же температуре МПК соединений многократно увеличивалась. Однако, в большин-

стве случаев и при 72-часовой инкубации МПК соединения были ниже, чем с выдержкой при  $35\pm 1^\circ\text{C}$ . Отличия МПК при температуре инкубации  $t = 27\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24 часов и  $t = 35\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24 статистически достоверны,  $p < 0,001$  (рис.2). Отличия результатов определения ПГА при температуре инкубации  $27\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 72 часов и при температуре  $35\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24 часов статистически незначимы,  $p = 0.25$ , однако такая длительная выдержка в термостате усложняет методику и вносит затруднения в эксплуатацию лабораторной посуды и оборудования.

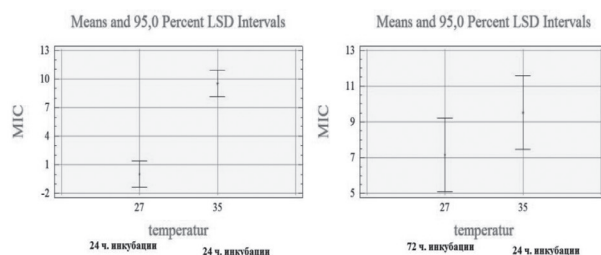


Рис. 2. Результаты статистической обработки результатов определения ПГА при различных температурных режимах культивирования.

Таким образом, использование более низкой температуры инкубации посевов может приводить к завышению результатов при оценке ПГА разрабатываемого соединения. Исходя из того, что изучаемые соединения предполагается использовать для фармакотерапии грибковых инфекций, целесообразнее придерживаться условий инкубации, рекомендуемых при оценке чувствительности к противогрибковым препаратам в клинических условиях. Также необходимо учитывать, что в реальных условиях *in vivo* в организме человека изучаемые микроорганизмы присутствуют при температурном режиме  $36.5-37.5^\circ\text{C}$  в случае поражения слизистых оболочек и внутренних органов и  $28-33^\circ\text{C}$  в случае локализации на кожных покровах. В связи с вышеуказанными факторами в дальнейших экспериментах был выбран температурный режим  $35\pm 1^\circ\text{C}$ .

Использование более низкой концентрации микроорганизмов, рекомендованной отдельными протоколами и документами, также может приводить к завышению результатов при оценке

Таблица 2

МПК изучаемого соединения при различной микробной нагрузке

Наименование штамма <i>Candida spp.</i>	$10^3\text{КОЕ/мл}$	$10^5\text{КОЕ/мл}$	Значение p
<i>C. albicans</i> NCTC 885-653	$6.5\pm 2.25^*$	$25.8\pm 8.89$	0.02
<i>C. krusei</i> РКПГУ-1472/310	$3.3\pm 1.1$	$7.8\pm 0.001$	0.002
<i>C. gabrata</i> РКПГУ-1485/47	$3.9\pm 0.001$	$20.8\pm 9.0$	0.03
<i>C. tropicalis</i> РКПГУ-1513/784	$3.9\pm 0.001$	$15.6\pm 0.001$	<0.001

\*- Стандартное отклонение

Таблица 3

МПК изучаемого соединения при различных температурных режимах инкубирования.

Номер штамма <i>Candida spp.</i>	27±1°C, 24 часа	27±1°C, 48 часов	27±1°C, 72 часа	35±1°C, 24 часа
67 3*	0.05±0.001**	0.075±0.04	18.75±8.34	25±0.001
105*	0.05±0.001	1.6±0.001	3.12±0.001	3.12±0.001
133*	0.025±0.001	0.05±0.001	0.25±0.21	0.43±0.53
180*	0.025±0.001	0.05±0.001	1.0±0.85	3.34±4.14
186*	0.05±0.001	0.05±0.001	0.05±0.001	0.075±0.04
212*	0.05±0.001	0.05±0.001	3.3±4.14	12.5±0.001
223*	0.05±0.001	0.05±0.001	0.08±0.04	3.9±3.3
229-к*	0.05±0.001	2.36±1.07	3.9±3.3	4.7±2.2
232*	0.025±0.001	0.05±0.001	18.75±8.8	18.75±8.8
401*	0.05±0.001	0.05±0.001	0.08±0.04	0.4±0.5
507-g*	0.05±0.001	0.08±0.04	0.08±0.04	1.0±0.8
523*	0.025±0.001	0.08±0.04	1.2±0.5	4.6±2.2
532*	0.025±0.001	0.05±0.001	14.06±15.4	12.5±0.001
557*	0.025±0.001	0.05±0.001	12.5±17.6	12.5±0.001
617*	0.05±0.001	0.05±0.001	13.3±16.5	25.0±0.001
624*	0.05±0.001	0.05±0.001	0.1±0.001	3.12±0.001
983*	0.025±0.001	0.05±0.001	0.08±0.04	0.1±0.001
1040*	0.05±0.001	0.2±0.2	9.8±4.4	18.8±8.8
1053*	0.025±0.001	0.05±0.001	25.0±0.001	18.8±8.8
10231*	0.04±0.01	0.05±0.001	25.0±0.001	18.8±8.0

\*Различия результатов при инкубации  $t=27\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24 часов и  $t=35\pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24 статистически достоверны,  $p<0.001$ . \*\* - Стандартное отклонение

противогрибковой активности разрабатываемого соединения. Как было отмечено выше, целесообразнее придерживаться условий инкубации, рекомендуемых при оценке чувствительности к противогрибковым препаратам в клинических условиях. В связи с вышеуказанными факторами для дальнейших экспериментов была выбрана конечная концентрация изучаемых представителей *Candida spp.*  $10^5$  КОЕ/мл.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные экспериментальные результаты согласуются с анализируемыми условиями испытаний протоколов EUCAST и адаптированными российскими стандартами. Но, несмотря на широкое использование указанных документов, важно отметить невозможность полной экстраполяции методик на случаи изучения ПГА у новой молекулы. Анализируя основное предназначение протоколов CLSI и EUCAST, Клинических рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» очевидно, что они были созданы и ориентированы на клинические аспекты определения чувствительности изолятов микромицетов (в том числе, выделенных от пациентов) к применяемым на практике зарегистрированным антимикотикам. При этом данные методики предполагают

использование антимикотических препаратов, полученных непосредственно от изготовителя, либо из надежных коммерческих источников; фармацевтические препараты клинического назначения недопустимы. Т.е. данные образцы противогрибковых препаратов аналогичны государственным стандартным образцам (ГСО). В случае разработки нового соединения такого ГСО не существует. Также в описываемых документах важнейшим критерием оценки являются пограничные значения (breakpoint, *BP*) - специфические значения МПК, которые могут быть использованы для распределения грибов по клиническим категориям: «чувствительные» (*Ч*) («susceptible», *S*), «чувствительные, дозозависимые» или «чувствительные при увеличенной экспозиции препарата» (*ЧДЗ*) («susceptible dose-dependent», *S-DD*), «резистентные» (*Р*) («resistant», *R*), что является ключевым моментом для клиницистов. Различные антимикотики имеют собственные критерии оценки, существенно отличающиеся между собой, которые устанавливаются в ходе длительных многоцентровых исследований. Для впервые полученных соединений таких критериев, разумеется, нет, поэтому для оценки используются усредненные ориентировочные данные. Так согласно [20] перспективными для дальнейшего изучения являются соединения, если значения их

МПК *in vitro* для тест-штаммов не превышают 10–20 мг/л.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное недропользование», 2022 год.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Климко Н.Н., Козлова Я.И., Васильева Н.В. // Проблемы медицинской микологии. 2014. Т. 16. №1. С. 3-8.
2. Ungpakorn R. Nondermatophyte infections of the skin and nails: Implications for therapy. Abstracts of The 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Tokyo, 2009, p.224.
3. Cardo D., Horan T., Andrus M. [et al.] National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. A report from the NNIS System // Journal of infection control. 2004. Vol.32. P. 470-85.
4. Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide // Mycoses. 2008. Vol. 51. № 4. P. 2-15.
5. Marchaim D., Lemanek L., Bheemreddy S. // Obstetrics & Gynecology. 2012. V. 120. №6. P. 1407-1414.
6. Савичева А.М., Шипицына Е.В. // Медицинский совет. 2015. № 9. С. 15-17.
7. Новикова В.В., Кучевасова М.В., Коломойцев А.В. // Современные проблемы науки и образования. 2016. №2. С.30. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/article/view?id=24192> (дата обращения: 07.02.2020).
8. Новикова В.В., Астахова А.В., Кучевасова М.В. // Проблемы медицинской микологии. 2014. Т. 16. № 2. С. 114.
9. Rathod S.D., Reingold A.L., Klausner J.D. // Infectious diseases in obstetrics and gynecology. 2012. Т. 2012. С. 859071.
10. Vulvovaginal candidiasis Sexually Transmitted Disease: Treatment Guidelines. // MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 2010. Vol. 59. P. 61–63.
11. ACOG Practice Bulletin. Clinical management for obstetrician-gynecologists: Vaginitis // Obstetrics & Gynecology. 2006. Vol. 72. P. 1195–1206.
12. Okonkwo E. C., Alo M. N., Nworie O. // American Journal of Life Sciences. 2013. Т. 1. №. 2. С. 72-76.
13. Mohanty S., Xess I., Hasan F. // Indian J Med Res. 2007. №9. P. 216-219.
14. Pemán J., Cantón E., Espinel-Ingroff A. // Expert review of anti-infective therapy. 2009. Т. 7. №. 4. P. 453-460.
15. Багирова Н.С., Дмитриева Н.В. // Журнал инфектологии. 2015. Т. 7. № 3. С. 91-102.
16. Vandeputte P., Ferrari S., Alix T.C. // International Journal of Microbiology. 2012. Vol. 2012. P.26.
17. Малова И.О., Кузнецова Ю.А. // Проблемы медицинской микологии. 2013. Т. 15. №2. С. 103-104.
18. Long J. // Pharmacotherapy Update. 2003. Vol. 6. № 3. P. 1-7.
19. Perfect J.R. // Nature reviews Drug discovery. 2017. Vol. 16. №. 9. P. 603.
20. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Режим доступа: <https://www.booksmed.com/farmakologiya/3225-rukovodstvo-provedeniyu-doklinicheskikh-issledovaniy-lekarstvennyh-sredstv-mironov-an.html> (дата обращения: 24.01.2020).
21. ГОСТ Р ИСО 16256-2015 Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Референтный метод для тестирования активности *in vitro* антимикробных препаратов в отношении дрожжевых грибов, вызывающих инфекционные заболевания. Режим доступа: <https://internet-law.ru/gosts/gost/59834> (дата обращения: 24.01.2020).
22. 10CLSI M27-A4, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Third Edition, Approved Standard, 2017. Available at: [https://clsi.org/media/1897/m27ed4\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1897/m27ed4_sample.pdf) (accessed 7 February 2020).
23. EUCAST Definitive Document EDef 7.3.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts, 2017. Available at: [http://www.eucast.org/astoffungi/methods/antifungal-susceptibility-testing/susceptibility\\_testing\\_of\\_yeasts](http://www.eucast.org/astoffungi/methods/antifungal-susceptibility-testing/susceptibility_testing_of_yeasts) (accessed 7 February 2020).
24. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Клинические рекомендации, 2021, 225 с. Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf> (дата обращения: 24.12.2021).

ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России

\*Новикова В. В., кандидат фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой микробиологии

E-mail: vvnperm@yandex.ru

Якимова Е. В., лаборант кафедры микробиологии

E-mail: lena\_yakimo@mail.ru

Горбушина А. Д., студентка

E-mail: nastya30699@mail.ru

Perm State Pharmaceutical Academy

\*Novikova V. V., PhD, Associate Professor, Head of the Department of Microbiology

E-mail: vvnperm@yandex.ru

Yakimova E. V., Laboratory Assistant of the Department of Microbiology

E-mail: lena\_yakimo@mail.ru

Gorbushina A. D., student

E-mail: nastya30699@mail.ru

## STUDY OF NEW ORGANIC SYNTHESIS PRODUCTS FOR ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST YEAST FUNGI: RATIONALE FOR CHOICE OF TEST CONDITIONS

V.V. Novikova, E.V. Yakimova, A.D. Gorbushina

Perm State Pharmaceutical Academy

**Abstract.** The increasing resistance of mycoses pathogens to drugs and the identification of new types of pathogenic fungi, requires the development of new effective antifungal agents. Currently, there are the some strategies for the development of new antifungal agents: repurposing existing drugs that were previously used for a different purpose; modification of existing antifungal drugs; creation of new antifungal agents by chemical synthesis.

In the search for new compounds with antifungal activity, the methodology for determining this type of biological activity is very importance. This article analyzes the current methods for determining antifungal activity necessary for comparison of the activity of new and used drugs in vitro. The general characteristic of each method is given, their features are described.

The effect of individual test conditions of antifungal activity on the final result was experimentally confirmed. The significance of their choice for further research is substantiated.

It was shown that a lower final microbial load ( $10^3$  CFU/ml) and incubation conditions at a lower temperature ( $27^\circ\text{C}$ ), recommended by individual protocols, contribute to lower values of the minimum inhibitory concentration. It can lead to overestimation of the evaluating results antifungal activity developed compound. Based on the fact that the studied compounds are supposed to be used for pharmacotherapy of fungal infections, it is more advisable to adhere to the incubation conditions recommended in evaluating sensitivity to antifungal drugs in a clinical setting.

The results are consistent with the analyzed test conditions for the EUCAST protocols and adapted Russian standards.

**Keywords:** antifungal activity, serial dilution method, *Candida spp.*, MIC

### REFERENCES

1. Klimko N.N., Kozlova Ja.I., Vasil'eva N.V., Problemy medicinskoj mikologii, 2014, Vol. 16, No. 1, pp. 3-8.

2. Ungpakorn R. Nondermatophyte infections of the skin and nails: Implications for therapy. Abstracts of The 17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Tokyo, 2009, p.224.

3. Cardo D., Horan T., Andrus M. // Journal of infection control. 2004. Vol.32. P. 470-85.

4. Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M. // Mycoses. 2008. Vol. 51. № 4. P. 2-15.

5. Marchaim D., Lemanek L., Bheemreddy S. // Obstetrics & Gynecology. 2012. V. 120. №6. P. 1407-1414.

6. Savicheva A.M., Shipicyna E.V., Medicinskij sovet, 2015, No. 9, pp. 15-17.

7. Novikova V.V., Kuchevasova M.V., Kolomojcev A.V. // Sovremennye problemy nauki i obrazovanija, 2016, No. 2, p.30. Available at: <http://>

[www.science-education.ru//article/view?id=24192](http://www.science-education.ru//article/view?id=24192) (accessed 7 February 2020).

8. Novikova V.V., Astahova A.V., Kuchevasova M.V., *Problemy medicinskoj mikologii*, 2014, Vol. 16, No. 2, p.114.

9. Rathod S.D., Reingold A.L., Klausner J.D. // *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*. 2012. T. 2012. С. 859071.

10. Vulvovaginal candidiasis Sexually Transmitted Disease: Treatment Guidelines. // *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep*. 2010. Vol. 59. P. 61–63.

11. ACOG Practice Bulletin. Clinical management for obstetrician-gynecologists: Vaginitis // *Obstetrics & Gynecology*. 2006. Vol. 72. P. 1195–1206.

12. Okonkwo E. C., Alo M. N., Nworie O. // *American Journal of Life Sciences*. 2013. T. 1. №. 2. С. 72-76.

13. Mohanty S., Xess I., Hasan F. // *Indian J Med Res*. 2007. №9. P. 216-219.

14. Pemán J., Cantón E., Espinel-Ingroff A. // *Expert review of anti-infective therapy*. 2009. T. 7. №. 4. P. 453-460.

15. Bagirova N.S., Dmitrieva N.V., *J. of Infectology*, 2015, Vol. 7, No. 3, pp. 91-102.

16. Vandeputte P., Ferrari S., Alix T.C. // *International Journal of Microbiology*. 2012. Vol. 2012. P.26.

17. Malova I.O., Kuznecova Ju.A., *Problemy medicinskoj mikologii*, 2013, Vol. 15, No. 2, pp. 103-104.

18. Long J. // *Pharmacotherapy Update*. 2003. Vol.6. № 3. P. 1-7.

19. Perfect J.R. // *Nature reviews Drug discovery*. 2017. Vol. 16. №. 9. P. 603.

20. Mironov A.N. *Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennyh sredstv*. Available at: <https://www.booksmed.com/farmakologiya/3225-rukovodstvo-po-provedeniyu-doklinicheskikh-issledovaniy-lekarstvennyh-sredstv-mironov-an.html> (accessed 24 January 2020).

21. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems. Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against yeast fungi involved in infectious diseases. Available at: <https://internet-law.ru/gosts/gost/59834> (accessed 24 January 2020).

22. CLSI M27-A4, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Third Edition, Approved Standard, 2017. Available at: [https://clsi.org/media/1897/m27ed4\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1897/m27ed4_sample.pdf) (accessed 7 February 2020).

23. EUCAST Definitive Document EDef 7.3.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts, 2017. Available at: [http://www.eucast.org/astoffungi/methods/odsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility\\_testing\\_of\\_ yeasts](http://www.eucast.org/astoffungi/methods/odsinantifungalsusceptibilitytesting/susceptibility_testing_of_ yeasts) (accessed 7 February 2020).

24. *Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antimikrobnym preparatam. Klinicheskie rekomendacii*, 2018. Available at: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrecdsma2018.pdf> (accessed 24 January 2020).