

УДК 582.282.23.045

**О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, Т.О. Філіпова, І.Й. Сейфулліна,
В.С. Подуст**Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2,
Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (048) 68 79 64, e-mail: farmikr@mail.ru

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ НІКОТИНОЇЛГІДРАЗОНА САЛІЦИЛОВОГО АЛЬДЕГІДУ ТА ЙОГО КОМПЛЕКСІВ

Досліджено вплив нікотиніолгідразону саліцилового альдегіду $[H_2Ns](I)$ і комплексів на його основі – германію $[Ge(Ns)_2]$ (2) та стануму $[SnCl_3(Ns \cdot H)]$ (3) на ріст умовно-патогенних бактерій. Показано, що досліджені сполуки у концентраціях 25, 50 та 100 мкг/мл здатні значно пригнічувати накопичення біомаси тест-штамів. У деяких випадках ефективність інгібування дорівнює 100 %. Найвищу активність щодо більшості мікроорганізмів виявила сполука 3.

Ключові слова: нікотиніолгідразон, комплекси германію (IV), комплекси стануму (IV), умовно-патогенні бактерії, антимікробний ефект.

Стрімке розповсюдження резистентних до хіміотерапевтичних засобів мікроорганізмів робить проблему пошуку нових антимікробних агентів однією з найактуальніших для сучасної медицини. Особливе значення в цьому плані набуває створення синтетичних препаратів, які у порівнянні з природними антибіотиками мають ряд переваг: менш трудомісткій та дорогий метод синтезу кінцевого продукту та необмежена можливість модифікації молекул з наступною зміною активності.

Останнє, насамперед, стосується біокоординаційних сполук. Поєднання в складі однієї молекули біологічно активних компонентів (комплексоутворювач та ліганд), як відомо, сприяє синергізму їх дії, зменшує токсичність [1, 4]. Слід зазначити, що можливість варіювання іонів металів і, відповідно, лігандів відкриває перспективи для цілеспрямованого створення речовин з певною фізіологічною дією. У зв'язку з цим, постійно зростає кількість різноманітних комплексів, що знаходять застосування як інсектициди, фунгіциди, бактерицидні та противірусні агенти, тощо [3].

Досліджені нами за останні роки комплекси германію (IV) з біолігандами, зокрема гідразонами, виявили широкий спектр біологічної активності, в тому числі протизапальної [6, 8, 13]. Тому дану роботу було присвячено вивченню впливу нікотиніолгідразону саліцилового альдегіду та вперше синтезованих комплексів на його основі – германію (IV) і стануму (IV) на ріст умовно-патогенних бактерій. Такий вибір об'єктів дослідження базувався на даних літератури про наявність антимікробної та протизапальної дії як гідразонів, так і зазначених іонів металів [11, 12].

© О.Ю. Зінченко, Н.В. Шматкова, Т.О. Філіпова, І.Й. Сейфулліна, В.С. Подуст, 2009



Матеріали і методи

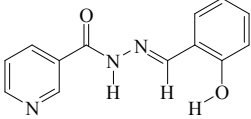
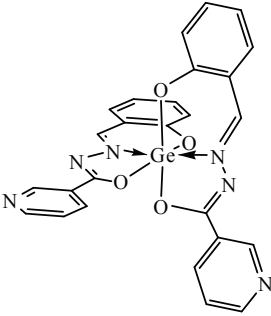
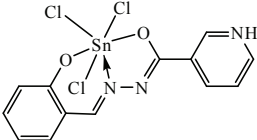
Нікотиноїлгідразон $[H_2Ns]$ (1) отримано реакцією конденсації гідразиду нікотинової кислоти з саліциловим альдегідом за загальною методикою [2]. Комплекси германію і стануму складу $[Ge(Ns)_2]$ (2) та $[SnCl_3(Ns \cdot H)]$ (3) вперше синтезовано на кафедрі загальної хімії Одеського національного університету імені І. І. Мечникова за оригінальними методиками взаємодією $GeCl_4$ та $SnCl_4$ з H_2Ns [7]. Комплекси охарактеризовано сукупністю фізико-хімічних методів дослідження: ІЧ та ПМР спектроскопія, мас-спектрометрія, електропровідність, термогравіметрія, рентгено-структурний аналіз (комплекс 3) [7]. Схеми їх будови наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Будова гідразона і відповідних комплексів германію (IV) та стануму (IV)

Table 1

The structure of hydrazone and its complexes with germanium (IV) and stannum (IV)

		
<p>H_2Ns (1)</p>	<p>$[Ge(Ns)_2]$ (2)</p>	<p>$[SnCl_3(Ns \cdot H)]$ (3)</p>

При вивченні антибактеріальних властивостей досліджених сполук як тест-мікроорганізми використовували штами бактерій *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 та *Micrococcus luteus* ATCC 4698, отримані з музею культур мікроорганізмів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського АМН України. Зберігання тест-штамів здійснювали на поверхні скошеного м'ясо-пептонного агару (МПА) за температури 4 °С. Для досліджень використовували добові культури, вирощені в пробірках на скошеному МПА при 37 °С.

Для визначення антибактеріальної активності сполук 1–3 готували робочі розчини, які містили по 5,0 мг, 2,5 мг та 1,25 мг кожної речовини в 1 мл диметилсульфоксиду. У дослідні пробірки відбирали по 20 мкл робочих розчинів та доводили об'єм до 1 мл рідким середовищем Гісса з глюкозою без індикатора Андреде. Таким чином, кінцева концентрація сполук у середовищі становила 25, 50 та 100 мкг. Кількість паралелей для кожної концентрації дорівнювала 5. Пробірки з середовищем стерилізували в автоклаві при 0,5 атм [9]. Усі експерименти проводили у 3 повторях.

Культури тест-мікроорганізмів, вирощені на скошеному МПА в пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином. Концентрацію отриманої суспензії



визначали за калібрувальною кривою, вимірюючи оптичну густина за допомогою спектрофотометру “Spekol-10» (Німеччина). Суспензію клітин розводили фізіологічним розчином до концентрації 2×10^4 клітин/мл. З отриманого інокуляту відбирали по 50 мкл та вносили до кожної експериментальної пробірки, отримуючи кінцеву концентрацію 1×10^3 КУО/мл.

Культури інкубували в термостаті при температурі 37 °С протягом 24 годин. Інтенсивність росту тест-штамів визначали за оптичною густиною культури, яку вимірювали на спектрофотометрі “Spekol-10” при довжині хвилі 540 нм. За контроль правили культури мікроорганізмів, паралельно вирощені в середовищі Гісса без додавання досліджуваних речовин.

Результати та їх обговорення

У результаті дослідження впливу сполуки 1 на ріст тест-мікроорганізмів встановлено, що найбільшою чутливістю до її присутності в середовищі характеризуються клітини *E. coli* та *P. vulgaris*, ріст яких повністю пригнічувався за присутності 100 мкг досліджуваної сполуки в 1 мл середовища. При зниженні концентрації вдвічі інгібуючий ефект зменшувався до 86,7 %, 81,9 % та 63,1 % у випадку *E. coli*, *P. vulgaris* та *S. enteritidis* відповідно. Взагалі, спостерігали пряму залежність ефекту від концентрації (рис. 1). Серед грампозитивних тест-штамів найбільшу чутливість виявила культура *M. luteus*, інгібування росту якої досягало 77,8–88,9 % за різних концентрацій сполуки. Менш чутливими були клітини *S. aureus* та *B. subtilis*. За максимального впливу сполуки ріст культур зазначених штамів уповільнювався на 65,1 % та 59,4 %. У випадку *P. aeruginosa* спостерігали незначну інгібуючу дію сполуки 1 за концентрацій 50 та 100 мкг/мл, а за концентрації 25 мкг/мл зареєстровано навіть стимуляцію росту культури. Цікаво, що стимулюючий ефект щодо *P. aeruginosa* виявили також сполука 2 у всіх варіантах та сполука 3 у концентраціях 25 та 50 мкг/мл (рис. 2, 3). Винятком є лише уповільнення накопичення біомаси на 63,6 % у порівнянні з контролем за присутності 100 мкг/мл сполуки 3.

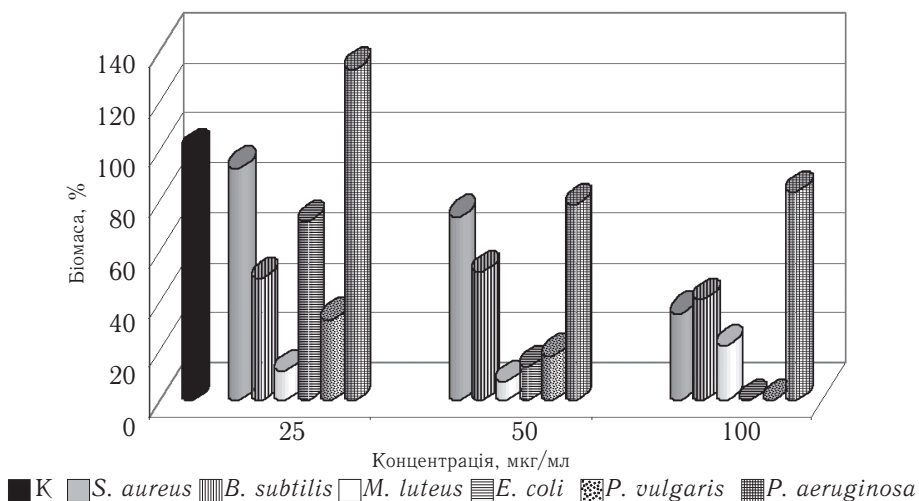


Рис. 1. Накопичення біомаси тест-штамів за присутності сполуки 1

Fig. 1. The test-strain biomass amount in the presence of compound 1

За присутності сполуки 2 у поживному середовищі найбільш виражений інгібуєчий ефект спостерігали у культурі *B. subtilis* (45,6 %). Накопичення біомаси *M. luteus* та *P. vulgaris* також пригнічувалося на 40,8–72,4 % та 36,9–65,2 % відповідно (рис. 2). Крім того, зареєстровано незначний інгібуєчий вплив (24,5 %) щодо *S. aureus*.

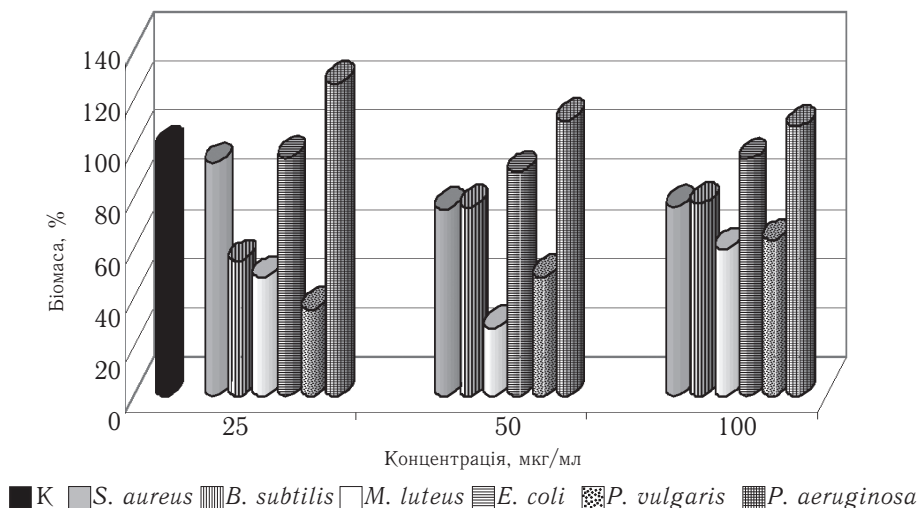


Рис. 2. Накопичення біомаси тест-штамів за присутності сполуки 2

Fig. 2. The test-strain biomass amount in the presence of compound 2

Сполука 3 у концентраціях 25 та 50 мкг/мл спричинила повне пригнічення росту культури *P. vulgaris*, а у максимальній концентрації – на 91,7 % (рис. 3). Високою чутливістю до цієї сполуки характеризувалися також клітини *M. luteus*, причому прояв інгібуєчої дії зростав у зворотній залежності від її вмісту в середовищі. Крім того, за концентрації 100 мкг/мл сполуки 3 зареєстровано практично повне пригнічення росту культур *E. coli* та *B. subtilis* – біомаса дослідних культур не перевищувала 1 % та 7 % від контролю відповідно.

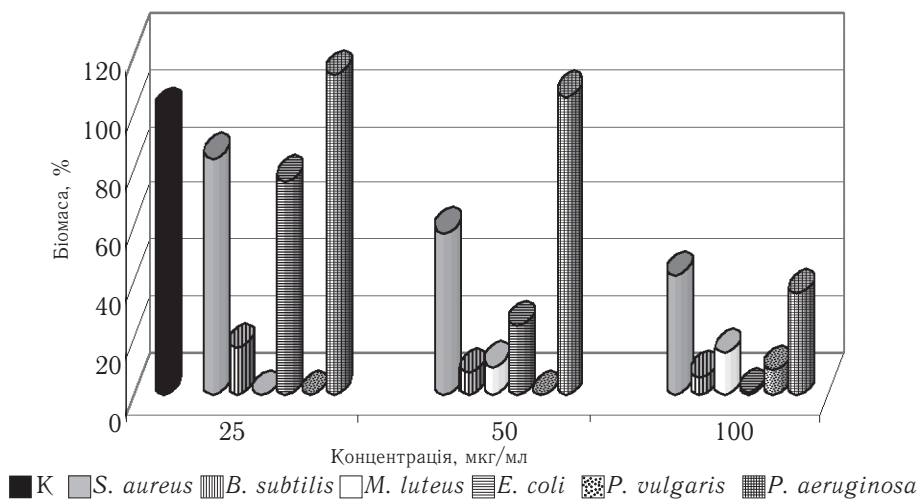


Рис. 3. Накопичення біомаси тест-штамів за присутності сполуки 3

Fig. 3. The test-strain biomass amount in the presence of compound 3



У культурі *S. aureus* максимального інгібуючого впливу, який складав 52,4 %, було досягнуто також при додаванні до поживного середовища 100 мкг/мл сполуки. Слід зазначити, що уповільнення накопичення біомаси *P. aeruginosa* спостерігалось лише за найбільшою з використаних у досліді концентрацій зазначеної речовини.

Порівнюючи досліджені сполуки за спектром та ступенем біологічної активності, можна розташувати їх таким чином $3 > 1 > 2$. Так, сполука 3 спричиняла значний інгібуючий вплив на усі обрані тест-штами (табл. 2). Сполука 1 також виявила здатність пригнічувати життєдіяльність усіх використаних у досліді мікроорганізмів, проте в окремих випадках вираженість ефекту була більш слабкою, ніж у сполуки 3. Крім того, співставлення активності сполук 1 та 3 щодо окремих штамів, наприклад, *M. luteus* та *P. vulgaris*, показує, що приблизно однаковий ефект спостерігається при використанні сполуки III у концентрації, яка у 2–4 є нижчою, ніж у сполуки 1.

Таблиця 2

Інгібування росту тест-мікроорганізмів досліджуваними сполуками

Table 2

The test-microorganism growth inhibition by studied compounds

Сполука	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1	65,1 / 100*	59,4 / 100	92,2 / 50	100 / 100	100 / 100	21,5 / 50
2	24,5 / 50	45,6 / 25	72,4 / 50	9,5 / 50	65,2 / 25	0
3	57,4 / 100	93,3 / 100	100 / 25	99,1 / 100	100 / 25	63,6 / 100

Примітка: * – максимальне інгібуювання росту (%) / концентрація (мкг/мл)

Що ж стосується сполуки 2, то у досліджених концентраціях вона значно поступалася за активністю 1 та 3. Проте, цілком вірогідне збільшення її ефективності при варіюванні умов досліді.

Таким чином, дослідження впливу сполук 1–3 показало наявність у синтезованих сполук антибактеріальної активності щодо умовно-патогенних мікроорганізмів. Не зареєстровано жодних закономірностей стосовно переважної дії досліджених сполук на грампозитивні або грамнегативні бактерії. Однак, найменшою чутливістю серед обраних тест-штамів характеризувалася *P. aeruginosa*, відома своєю природною стійкістю до численних хіміотерапевтичних засобів. Сполукою з найбільш широким антимікробним спектром виявився комплекс 3.

Цілком ймовірно, що інгібуючий вплив досліджених сполук на ріст тест-штамів реалізується шляхом їх залучення до ключових метаболічних шляхів бактеріальної клітини за рахунок структурної подібності до нікотинової кислоти [5, 10].

Зміна антимікробної дії в ряду сполук $3 > 1 > 2$, які можна розглядати як похідні нікотинової кислоти, свідчить також і про вплив на неї іону металу. Проте, більш виражена активність сполуки 3 у порівнянні з рештою, вірогідно, пояснюється бактерицидною дією сполук стануму [11, 12] та здатністю гальмувати окиснювальне фосфорильовання [1].

Отримані результати свідчать про перспективність подальшого вивчення взаємодії досліджених сполук з бактеріальними клітинами.



ЛІТЕРАТУРА

1. Альберт Э. Избирательная токсичность. — М.: Мир, 1971. — С. 56.
2. Вейганд-Хильгетаг. Методы эксперимента в органической химии: Пер. с нем. — М.: Химия, 1968. — 944 с.
3. Киселёв Ю. М., Добрынина Н. А. Химия координационных соединений. М.: Академия, 2007. — 344 с.
4. Крис Е. Е., Волченкова И. И., Григорьева А. С. Координационные соединения металлов в медицине. Киев: Наук. Думка, 1986. — 216 с.
5. Машковский. Д. М. Лекарственные средства. — М.: Изд-во «Новая Волна», 2002. — Т. 2, изд. 14. — С. 309.
6. Нікітін О. В., Галкін Б. М., Сейфулліна І. Й., Шматкова Н. В. Вивчення впливу комплексів германію (IV) з саліцилальгідразами хлорбензойної та гідроксибензойної кислоти на ексудативне запалення, яке викликано різними флогогенними агентами // *Biomedical and Biosocial Anthrology*. — 2004. — № 3. — С.81-83.
7. Сейфулліна І. Й., Шматкова Н. В. Бензоил-(пиридиноил) гидразоны ароматических альдегидов в реакциях комплексообразования с тетрахлоридами германия и олова // Тезисы XXIII Международной Чугаевской конференции по координационной химии. — Одесса, 4-7 вересня 2007. — С. 47-49.
8. Сейфулліна І. Й., Нікітін О. В., Галкін Б. М., Шматкова Н. В. та ін. Протизапальна активність комплексів германію з саліцилальгідразами нітробензойної кислоти // *Одесский медицинский журн.* — 2003. — № 3, вып. 77. — С. 21-23.
9. *Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования* / Под ред. М. О. Биргера. — М.: Медицина, 1972. — С. 175 — 177.
10. *Страчунский Л. С., Белоусов Ю. Б., Козлов С. Н.* Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. — М.: Наука, 2002. — 142 с.
11. Vacchi, A. Bonarti, M. Carcelli. Organotin complexes pyrrole-2,5-dicarboxaldehyde bis (acylhydrazones). Synthesis, structure antimicrobial activity and genotoxicity // *J. Inorg. Biochem.* — 1998. — V. 69. — P. 101-112.
12. Malhotra Rajesh, Kumar Sudhir, Dhindsa Kuldip Singh. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of organotin and organosilicon complexes of substituted hydrazones // *Indian J. Chem.* — 1997. — Vol. 4A. — P. 321-323
13. Seifullina I. I., Shmatkova N., Galkin B., Nikitin A. Germanium complexes with substituted pyridincarbonic acids hydrazones as anti-inflammatory agents // Poster Abstract 7th Intern. Symp. on Applied Bioinorg. — Mexico. — 2003. — P. 96.



**О.Ю. Зинченко, Н.В. Шматкова, Т.О. Филиппова,
И.И. Сейфуллина, В.С. Подуст**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2,
Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: farmikr@mail.ru

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НИКОТИНОИЛГИДРАЗОНА САЛИЦИЛОВОГО АЛЬДЕГИДА И ЕГО КОМПЛЕКСОВ

Реферат

Исследовано влияние никотиноилгидразона салицилового альдегида $H_2Ns(1)$ и комплексов на его основе — германия $[Ge(Ns)_2]$ (2) и олова $[SnCl_3(Ns-H)]$ (3) на рост условно-патогенных бактерий. Показано, что исследованные соединения в концентрациях 25, 50 и 100 мкг/мл способны значительно подавлять накопление биомассы тест-штаммов. В некоторых случаях эффективность ингибирования составляет 100 %. Наиболее высокую активность в отношении большинства микроорганизмов проявило соединение 3.

Ключевые слова: никотиноилгидразон, комплексы германия (IV), комплексы олова (IV), условно-патогенные бактерии, антимикробный эффект.

O.Yu. Zinchenko, N.V. Shmatkova, I.I. Seifullina, T.O. Philipova, V.S. Podust

Odesa National I. I. Mechnikov University, Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082,
Ukraine тел.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: farmikr@mail.ru

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NICOTINOILHYDRAZONE SALYCILIC ALDEHYDE AND ITS COMPLEXES

Summary

The influence of nicotinoilhydrazone salicylic aldehyde and its complexes with germanium (IV) and stannum (IV) on the opportunistic bacterial pathogens has been investigated. It has been shown that studied compounds are able to suppress the test-strain biomass increase at concentrations of 25, 50 and 100 μg per ml. The inhibition level in some variants was about 100 %. The compound 3 has demonstrated the highest activity towards the most used microorganisms.

Key words: nicotinoilhydrazone, complexes of germanium (IV), complexes of stannum (IV), opportunistic bacteria, antimicrobial effect.

