

Л. Ю. Лукачинець, С. Ю. Чундак, Н. В. Бойко

Ужгородський національний університет, вул. Підгірна, 46, Ужгород, 88000,
Україна, тел.: 8 (03122) 33 148,
e-mail: nadiya.boyko@gmail.com; lesik@uzh.ukrtel.net

АНТИБАКТЕРІАЛЬНА АКТИВНІСТЬ КОМПЛЕКСНИХ СПОЛУК НІТРАТУ КАДМІЮ (II) З 3-,4-НІТРОБЕНЗГІДРАЗИДАМИ

Досліджено антибактеріальні властивості комплексних сполук (ди-мета-нітро-к³-О, О'О'/-біс [біс (3-бензгідрозиду-к²N¹, О) кадмію (II)] динітрату [Cd (3-NBA)₂NO₃] NO₃) та аква (нітрато-к²O, О') біс (4-нітробензгідрозиду-к²N², О) кадмію (II) нітрату [Cd (4-NBA)₂NO₃H₂O] NO₃) стосовно умовно патогенних мікроорганізмів – збудників нозокоміальної інфекції людини. Охарактеризовано можливість застосування зазначених сполук у якості нових хіміотерапевтичних і/чи дезінфікувальних засобів.

К л ю ч о в і с л о в а: ново-синтезовані гідрозиди карбонових кислот, антибактеріальні властивості, нозокоміальна (шпитальна) інфекція, дезінфекція.

Гідрозиди карбонових кислот (ГКК) широко застосовуються у медицині як ефективні препарати для лікування туберкульозу, гіпертонії, онкологічних захворювань тощо [1-4]. Однак, антибактеріальна ефективність комплексних сполук ГКК із іонами металів, особливо II-Б групи, сьогодні є недостатньо вивченою [5]. Відомим є, що їх токсична дія стосовно усіх біологічних об'єктів, у тому числі і мікроорганізмів, детермінується переважно типом центрального металу у комплексі, і лише незначною мірою залежить від властивостей самого ліганду. Виявлена у опортуністичних патогенів (збудників шпитальної інфекції людини) множинна стійкість до цілого ряду протимікробних засобів, у тому числі антибіотичних речовин нового покоління та до новітніх дезінфікувальних засобів [7, 12-14], ускладнює боротьбу з поширенням та домінуванням нозокоміальної інфекції у сучасній клініці.

Дана робота присвячена висвітленню результатів досліджень із встановлення антибактеріальних властивостей ново-синтезованих нами комплексних сполук кадмій (II) нітрату з гідрозидами 3-, 4-нітробензенових кислот стосовно найбільш типових представників умовно-патогенних бактерій, що зумовлюють шпитальну інфекцію людини.

Матеріали і методи

Досліджувані комплекси було синтезовано нами із гарячих спиртових розчинів, що містили 1 ммоль нітрату кадмію (II) та 1 ммоль ліганду, тобто гідрозиду 3- чи 4-нітробензойної кислоти відповідно (3-NBA, 4-NBA). Коротко: [Cd (Гм-НБК)₂NO₃]_xNO₃ одержували шляхом додавання до гарячого спиртового розчину, що містив 1 ммоль кадмійнітрату, гарячого розчину мета-нітробензгідрозиду (Гм-НБК)



в етанолі. Осад, що утворився через 24 години внаслідок повного охолодження новоутвореного розчину, у ваговому співвідношенні становив близько 62 % від теоретично обрахованого виходу продукту і був представлений дрібними кристалами жовтуватого кольору. Нова сполука добре розчиняється у диметилформаміді (ДМФА) та диметилсульфоксиді (ДМСО), погано – у воді і є практично нерозчинною у інших органічних розчинниках. Температура плавлення ($T_{пл.}$) $[Cd(\text{Гм-НБК})_2\text{NO}_3]\times\text{NO}_3$ рівна 150 °С. Аналогічно $[Cd(\text{Гп-НБК})_2\text{H}_2\text{ONO}_3]\times\text{NO}_3$ одержували шляхом додавання до гарячого спиртового розчину, що містив 1 ммоль кадмійнітрату, 1 ммоль гарячого розчину пара-нітробензгідразиду (Гп-НБК) в етанолі. Осад, що утворився через добу після повного охолодження розчину у вигляді прозорих дрібних кристалів жовтого кольору, також був добре розчинним у ДМФА та ДМСО, погано розчинним у воді, і зовсім нерозчинним у інших органічних розчинниках. $T_{пл.}$ $[Cd(\text{Гп-НБК})_2\text{H}_2\text{ONO}_3]\times\text{NO}_3$ рівна 165 ± 5 °С, а його вихід становив близько 60 відсотків від теоретично обрахованого виходу продукту. Склад ново-синтезованих речовин було встановлено за допомогою хімічного аналізу, а будову за методами ІЧ-спектрометрії та рентгенівської дифракції [10, 11]. Координаційному оточенню Cd^{2+} у обох випадках відповідає форма дуже деформованого октаедру.

На рисунку 1 наведено структурне зображення комплексних сполук кадмійнітрату з вказаними лігандами.

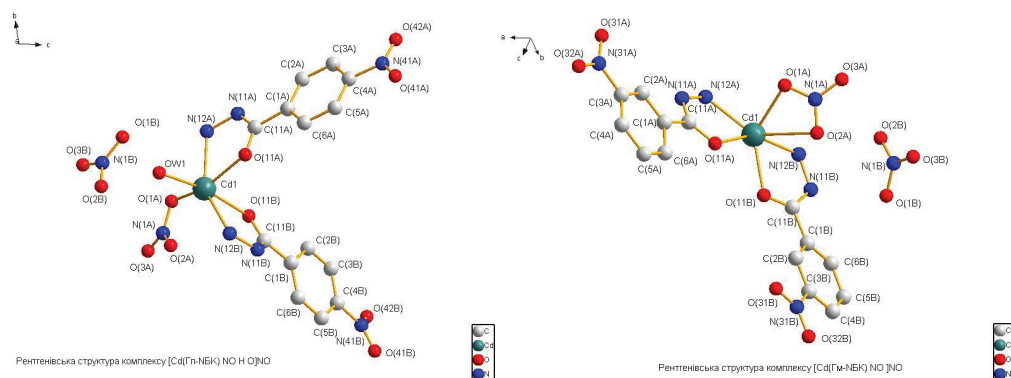


Рис. 1. Структурне зображення комплексних сполук кадмійнітрату з гідразидами 3-, 4-нітробензових кислот.

Fig. 1. The structural image of the cadmium nitrate complex compounds with hydrazides of the 3-, 4- nitro benzoic acids.

Біологічну активність досліджуваних комплексів кадмій (II) нітрату з гідразидами 3-, 4-нітробензових кислот визначали стосовно ряду штамів мікроорганізмів, ізольованих із різних відділень обласної клінічної лікарні (ОКЛ) м. Ужгорода, а саме: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, MRSA, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*. Для уточнення спектру антибактеріальних властивостей згаданих ново-синтезованих сполук використовували також деякі філогенетично відмінні музейні види бактерій, зокрема: *Sarcina flava*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* і *Salmonella typhimurium*.



Антибактеріальні властивості досліджуваних сполук стосовно зазначених тест-культур мікроорганізмів встановлювали *in vitro* — методом паперових дисків на твердих поживних середовищах, вимірюючи зони затримки росту бактерій та визначаючи бактерицидну (зона затримки росту більше 20 мм протягом трьох діб) та бактериостатичну дію (зона затримки росту від 10 до 20 мм, можливий повторний ріст бактерій через 48 і/чи 72 год.).

МПК досліджуваних комплексів визначали класичним методом серійних розведень. В якості розчинника комплексних сполук використовували ДМСО.

Для спрямованого відбору видів бактерій — потенційних збудників нозокоміальної інфекції — та спрощення процедури їх наступної ідентифікації для висіву матеріалу обстежень використовували селективні (хромогенні) поживні середовища нового покоління виробництва bioMerieux, France: SM ID 2 (*Salmonella*), CPS ID 3 (*E. coli*, *Proteus*, *Enterococci*), *S. aureus* ID, MRSA ID, SMAC CT agar (*E. coli* O157H7), UriSelect agar тощо. Ідентифікацію усіх збудників шпитальної інфекції проводили шляхом поєднання вихідних рутинних тестів (мікроскопія, фарбування по Граму, КОН, оксидазний, плазмокоагулазна, лецитиназна, гемолітична активність тощо) із наступним застосуванням автоматизованих та пів-автоматизованих методів типування бактеріальних культур: біохімічні тест-системи: API, VITEK2 [15]. Генетичну спорідненість одержаних клінічних ізолятів та, відповідно, їх причетність до виникнення нозокоміальної інфекції встановлювали за допомогою ПЛР, ПЛР повторної екстра-генетичної паліндромної послідовності та ДНК-секвенування. Використовували наступні праймери: 1) для визначення генів резистентності до ванкоміцину: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*; 2) для визначення наявності генів β-лактамаз розширеного спектру (Extended Spectrum Beta-Lactamase, ESBL) у грам-негативних представників: SHV, TEM, CTX [6, 9].

Результати та їх обговорення

В результаті 3-х періодичних бактеріологічних обстежень різних відділень ОКЛ нами всього було ізольовано 147 бактеріальних культур із різних джерел. Проведений аналіз генетичної спорідненості одержаних бактеріальних ізолятів показав, що потенційними збудниками нозокоміальної інфекції виявились: у гастро-ентерологічному відділенні — *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*; у відділенні госпітальної хірургії — *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*; у ЛОР відділенні — штами *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* і MRSA [8]. Як приклад, результати визначення наявності ESBL генів, а саме SHV, TEM, CTX, у множинно-резистентного штаму *Enterobacter cloacae* показані на рисунку 2.

Результати досліджень біологічної активності комплексних сполук нітрату кадмію з 3-, 4-нітробензгідразидами показані на рисунку 3, а і б. Було доведено (необхідні контролі, на рис. 3 показані штрихованими зонами), що чисті ліганди (3-NBA, 4-NBA) не виявляють токсичну дію по відношенню до тестованих нами штамів бактерій. Аналогічно, жодної інгібувальної здатності не було виявлено у диметилсульфоксиду, який використовували для приготування робочих розчинів комплексних сполук.





Рис. 2. ESB test: попереднє визначення наявності генів множинної резистентності до антибіотиків у клінічного штаму *Enterobacter cloacae*

Fig. 2. ESB-test: the preliminary detection of the presence of the genes responsible for multi resistance for the antibiotics in *Enterobacter cloacae* clinical strain

Як видно із даних, представлених на рисунку 3, досліджувані ново-синтезовані комплекси демонстрували виразну бактерицидну дію до: *Sarcina flava*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* (зони затримки росту для даних штамів перевищували 20 мм) та бактериостатичну дію стосовно клінічних культур *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *MRSA*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* (зони затримки росту від 10 мм до 20 мм).

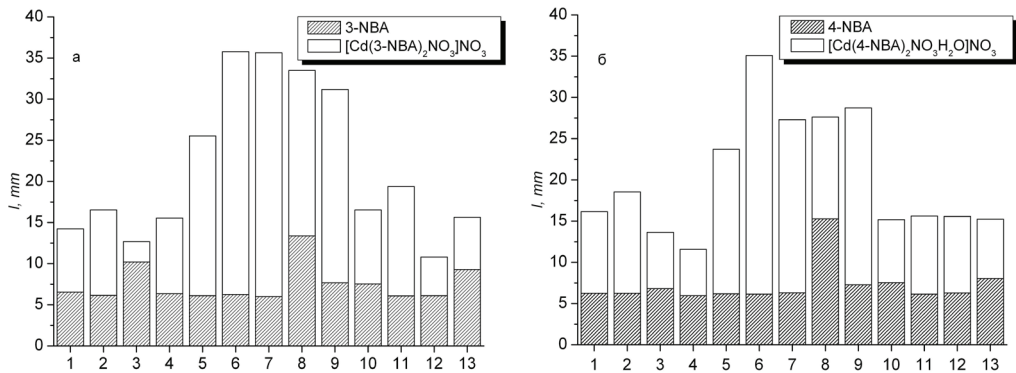


Рис. 3. Спектр антибактеріальної дії 3-NBA і $[\text{Cd}(\text{3-NBA})_2\text{NO}_3]\text{NO}_3$ (а) та 4-NBA і $[\text{Cd}(\text{4-NBA})_2\text{NO}_3\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ (б) на мікроорганізми: 1 – *Escherichia coli*, 2 – *Staphylococcus aureus*, 3 – *Salmonella typhimurium*, 4 – *Klebsiella pneumoniae*, 5 – *Acinetobacter baumannii*, 6 – *Sarcina flava*, 7 – *Pseudomonas aeruginosa*, 8 – *Streptococcus pneumoniae*, 9 – *Bacillus subtilis*, 10 – *MRSA*, 11 – *Enterobacter cloacae*, 12 – *Proteus mirabilis*, 13 – *Klebsiella oxytoca*; де I – інгібувальна активність.

Fig. 3. The spectrum of the antibacterial properties of the 3-NBA and $[\text{Cd}(\text{3-NBA})_2\text{NO}_3]\text{NO}_3$ (a) or 4-NBA and $[\text{Cd}(\text{4-NBA})_2\text{NO}_3\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ (b) on the following microorganisms:

1 – *Escherichia coli*, 2 – *Staphylococcus aureus*, 3 – *Salmonella typhimurium*, 4 – *Klebsiella pneumoniae*, 5 – *Acinetobacter baumannii*, 6 – *Sarcina flava*, 7 – *Pseudomonas aeruginosa*, 8 – *Streptococcus pneumoniae*, 9 – *Bacillus subtilis*, 10 – *MRSA*, 11 – *Enterobacter cloacae*, 12 – *Proteus mirabilis*, 13 – *Klebsiella oxytoca*; where I – is inhibitory effectiveness.



Обидва синтезовані нами комплекси виявляли однакову дію щодо вказаних штамів бактерій, що лише підтверджує детермінованість біологічних властивостей зазначених комплексів їх центральним металом.

Що стосується з'ясування ефективних і мінімально-пригнічувальних концентрацій ново-синтезованих сполук, слід відмітити, що у випадку їх застосування супроти таких опортуністичних патогенів, як *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* та для *Bacillus subtilis* вони виявились досить значними — до 50 мкг/мл; тоді як бактериостатичну дію зумовлювали дещо нижчі дози — від 10 до 25 мкг/мл (у залежності від виду тест-культур) і збільшення останніх не завжди призводило до повного знищення або більш суттєвої затримки росту тестованих штамів.

Визначення гострої та хронічної токсичності *in vivo* на мишах та інших адекватних моделях дасть нам змогу прийти до висновку чи дані сполуки в принципі можуть розглядатись як перспективні хіміотерапевтичні засоби бодай з метою їх призначення для місцевого (локального) застосування. Сьогодні ж очевидним є, що комплексні сполуки: ди-мета-нітро- κ^3 -O, O/O//-біс [біс (3-бензгідразидук 2 N', O) кадмію (II)] динітрату ([Cd (3-NBA) $_2$ NO $_3$] NO $_3$) та аква (нітрато- κ^2 O, O/) біс (4-нітробензгідразиду- κ^2 N 2 , O) кадмію (II) нітрату ([Cd (4-NBA) $_2$ NO $_3$ H $_2$ O] NO $_3$) можуть бути запропоновані насамперед в медичній та ветеринарній практиці як ефективні дезінфікуючі засоби.

ЛІТЕРАТУРА

1. Авакян А. Х. Новые молекулярные критерии оценки токсического действия производных гидразина. Активные формы кислорода как ключевые агенты в механизме токсичности // Фармакол. и токсикол. — 1990. — Т. 53., № 1. — С.70 — 73.
2. Альберт А. Избирательная токсичность: Пер. с англ. — М. — 1971. — С. 431.
3. Джарадат Н. А. Синтез потенційних протитуберкульозних засобів на основі гідразидів 1-*R*-2-оксо-4-гідроксінолін-3-карбонових кислот: Автореферат дис. канд. фарм. наук, Харків: 2000. — 28 с.
4. Зеленин К. Н. Физиологически активные комплексы гидразонов // СОЖ. Серия: Химия. — 1996. — № 12. — С. 41 — 46.
5. Обозова Л. А., Крымова Н. М. Устойчивость в водных растворах и биологическая активность комплексов изоникотиноилгидразина и его ацетилпроизводного с Cu (II), Ni (II) и Co (II) // Хим.-фарм. журн. — 1998. — Т. XXII, № 1. — С. 27 — 32.
6. *Antimicrobial Resistance in Bacteria*. Editor: Amabile-Cuevas C. F. Horizon Scientific Press. — 2006. — 201 p.
7. Bean D. C., Krahe D., Wareham D. W. Antimicrobial resistance in community and nosocomial *Escherichia coli* urinary tract isolates, London 2005 — 2006 // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. — 2008. — № 7. — P. 13 — 17.
8. Boyko N. V., Petrov V. O., Szaby J., Kulja A., Koval H. M., Kalapos I. Nosocomial infections in clinical units from Ukrainian-Hungarian transborder area: current state, ecological aspects and novel strategy for its prevention // MicroCAD 2008. Human Health. ISBN 978-963-661-829-2. P. 7 — 14.
9. Calbo E., Romanó V., Xercavins M., Gomez L., Vidal C. G., Quintana S., Vila J., Garau J. Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases // J. Antimicrob. Chemother. — 2006. — V. 57. — P. 780-783.
10. Chundak S. Yu., Lukachinec L. Yu., Daszkiewicz M. Aqua (nitrato- κ^2 O, O/) bis (4-nitrobenzohydrazide- κ^2 N 2 , O) cadmium (II) nitrate // Acta Cryst. — 2007. — V. 63, P. 2815-2816.
11. Chundak S. Yu., Lukachinec L. Yu., Daszkiewicz M. Di-*m*-nitrato- κ^3 O: O/O//-bis [bis (3-nitrobenzohydrazide- κ^2 N', O) cadmium (II)] dinitrate // Acta Cryst. — 2007. — V. 65. P. 2893.



12. Falagas M. E., Koletsis P. K., Bliziotis I. A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* // J. Med. Microbiol. — 2006. — V. 55, № 12. — P. 1619 — 1629.
13. Harbarth S., Fankhauser C., Schrenzel J., Christenson J., Gervaz P., Bandiera-Clerc C., Renzi G., Vernaz N., Sax H., Pittet D. Hospital admission and nosocomial infection in surgical patients // JAMA. — 2008. — V. 299. — P. 1149 — 1157.
14. Kohlenberg A., Schwab F., Geffers C., Behnke M., Røden H., Gastmeier P. Time-trends for Gram-negative and multidrug-resistant Gram-positive bacteria associated with nosocomial infections in German intensive care units between 2000 and 2005 // Clin. Microbiol. Inf. — 2008. — V. 14, № 1. P. 93-96.
15. Robinson A., Mccarter Y. S., Tetreault J. Comparison of Crystal Enteric/Nonfermenter System, API 20E System, and Vitek Automicrobic System for Identification of Gram-Negative Bacilli // J. Clin. Microbiol. — 1995. — V. 33, № 2. P. 364-370.

Робота виконана за підтримки грантів ДФФД № Ф 20/451-2007 (0107U008933), М/220-2007 та ДБ 632 п.

Л. Ю. Лукачинец, С. Ю. Чундак, Н. В. Бойко

Ужгородский национальный университет, ул. Подгорная, 46, Ужгород, 88000,
Украина, тел.: 8 (03122) 33 148,
e-mail: nadiya.boiko@gmail.com, lesik@uzh.ukrtel.net

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНЫХ ВЕЩЕСТВ НИТРАТА КАДМИЯ (II) С 3-, 4-НИТРОБЕНЗГИДРАЗИДАМИ

Реферат

Исследовано антибактериальные свойства комплексных веществ (ди-мета-нитро-к³-О, О'/О''-бис [бис (3-бензгидразида-к²N', О) кадмия (II)] бинитрата ([Cd (3-NBA)₂NO₃] NO₃) и аква (нитрато-к²О, О') бис (4-нитробензгидразида-к²N², О) кадмия (II) нитрата ([Cd (4-NBA)₂NO₃H₂O] NO₃) к условно-патогенным бактериям — возбудителям нозокомиальной инфекции человека. Охарактеризованы возможности применения указанных веществ в качестве новых химиотерапевтических и/или дезинфицирующих средств.

К л ю ч е в ы е с л о в а: ново-синтезированные гидразиды карбоновых кислот, антибактериальные свойства, нозокомиальная (госпитальная) инфекция, дезинфекция.



L. Yu. Lukachinets, S. Yu. Chundak, N. V. Boyko

Uzhhorod national University, 46, Pidgirna St., Uzhhorod, 88000, Ukraine,
tel.: 8 (03122) 33 148, e-mail: nadiya.boyko@gmail.com, lesik@uzh.ukrtel.net

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF THE COMPLEX COMPOUNDS
OF NITRATE CADMIUM (II) WITH THE
3-, 4- NITROBENZOHYDRAZIDES**

Summary

The results of the antibacterial activity of di-*m*-nitrate-*k*³O: O/O//-bis [bis (3-nitrobenzohydrazide-*k*²N', O) cadmium (II)] dinitrate and aqua (nitrate-*k*²O, O/) bis (4-nitrobenzohydrazide-*k*²N², O) cadmium (II) nitrate relatively to opportunistic pathogenic bacteria – the agents of human nosocomial infections have been investigated. The prosperity of the practical usage of the given compounds as new chemotherapeutical and/or disinfecting remedies are discussed and characterized.

К e y w o r d s: new-synthesized hydrazides of the carbonic acids, antibacterial properties, nosocomial (hospital) infection diseases, disinfection.

