

**І.О. Малярчик, Т.О. Філіпова, Б.М. Галкін, Л.М. Вострова,
М.В. Гренадьорова**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (048) 63 57 61,
e-mail: igormal85@mail.ru

АНТИМІКРОБНІ ВЛАСТИВОСТІ N-БЕНЗОТІАЗОЛ-2-ІЛ-БЕНЗЕНСУЛЬФОНАМІДУ І ЙОГО АНАЛОГІВ З НУКЛЕОФІЛЬНИМИ ЗАМІСНИКАМИ

Встановлено, що N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід (сполука I) та його похідні з нуклеофільними замісниками (сполуки II, III і IV) дозо-залежно пригнічують in vitro ріст S. aureus, P. aeruginosa і S. enteritidis. Інгібувальний вплив на стафілокок не залежав від структури похідних. Водночас, аналоги з нуклеофільними замісниками були більш активними у порівнянні зі сполукою I щодо грамнегативних бактерій. У присутності пара-амінобензойної кислоти антимікробна дія сполуки I знижувалася приблизно на 40 %, а сполук III і IV майже не змінювалась.

К л ю ч о в і с л о в а: антимікробна активність, N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід, похідні з нуклеофільними замісниками, антагонізм з пара-амінобензойною кислотою.

До сульфаніламідних препаратів відноситься група лікарських антимікробних сполук, що є похідними сульфанілової кислоти, наприклад, білий стрептоцид, сульфазол, сульфідин, сульгін, дисульфан [3,4].

Хіміотерапевтична активність сульфаніламідних препаратів була виявлена на початку 30-х років XX століття. Це перша група сучасних хіміотерапевтичних антибактеріальних засобів. Із появою пеніциліну та інших антибіотиків застосування сульфаніламідів трохи скоротилося, однак, значення препарати цієї групи не втратили та успішно використовуються при інфекційних захворюваннях, викликаних чутливими до них мікроорганізмами [2,4]. Сульфаніламідні препарати володіють хіміотерапевтичною активністю при інфекціях, що спричинені грампозитивними та грамнегативними бактеріями, деякими найпростішими (збудники малярії, токсоплазмозу) [3,10].

Останнім часом з'явилися дані про антивірусні властивості нових аналогів сульфаніламідів. Зокрема, показано, що вони ефективно захищають in vitro культури клітин від зараження вірусом герпесу та ВІЛ. Встановлена здатність бісептолу суттєво знижувати смертність ВІЛ-інфікованих дітей за рахунок зменшення



кількості CD4 рецепторів на поверхні Т-хелперів, внаслідок чого блокується потрапляння вірусу усередину цих клітин [14]. На основі нових похідних сульфаніламідів отримані також сучасні протизапальні засоби, які вибірково пригнічують активність циклооксигенази 2 [8]. Виявлення нових видів активності у сульфаніламідів поновило інтерес до цієї групи антимікробних засобів. Сьогодні у світі численні лабораторії синтезують та вивчають властивості нових аналогів цих препаратів, що є свідченням актуальності цієї проблеми [6,12,13].

Виходячи з цього, метою даної роботи було вивчення профілю та особливостей антимікробної дії N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів та його похідних.

Матеріали і методи

У роботі як тест-мікроорганізми використовували колекційні штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 і *Salmonella enteritidis* var. Isatchenko ВНИИСХМ 18/1 отримані з колекції культур кафедри мікробіології і вірусології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова.

Зберігання тест-штамів проводили на поверхні скошеного м'ясо-пептонного агару (МПА) при температурі 4 °С. Для експерименту використовувались добові культури, що вирощувались у пробірках на скошеному МПА при 37 °С.

Вплив досліджуваних речовин оцінювали за накопиченням біомаси у контрольних та дослідних варіантах. У роботі використовували рідке середовище Гісса з глюкозою без індикатора Андреде, яке розливали в пробірки по 1 мл. Досліджувані сполуки додавали в пробірки до кінцевих концентрацій 0,4; 4; 40 та 80 мкМ. Пробірки з середовищем стерилізували в автоклаві при 0,5 атм. Всі експерименти проводили у 3 - 5 повторях. Кількість паралелей у кожному експерименті дорівнювала 5.

Добові культури тест-мікроорганізмів, вирощені на скошеному МПА в пробірках, змивали стерильним фізіологічним розчином, стандартизували суспензію за стандартом каламутності ГКІ № 9 і розводили стерильним фізіологічним розчином до концентрації $2 \cdot 10^4$ клітин/мл. З отриманого інокуляту відбирали по 50 мкл та вносили до кожної пробірки. Таким чином, кінцева концентрація клітин у 1 мл середовища дорівнювала $1 \cdot 10^3$. Культури з сульфаніламидами інкубували в термостаті при температурі 37 °С протягом 24 годин, після чого вимірювали оптичну густину культури на спектрофотометрі "Spekol-10" (Німеччина) при довжині хвилі 540 нм. Кількість накопиченої біомаси тест-штамів визначали за калібрувальними кривими, для побудови яких біомасу зразків з певною оптичною густиною відмивали від поживного середовища та висушували до постійної маси. Зважування зразків проводили на електронних вагах Adventurer (США). За контроль правили культури мікроорганізмів, паралельно вирощені в середовищі Гісса без додавання досліджуваних речовин.

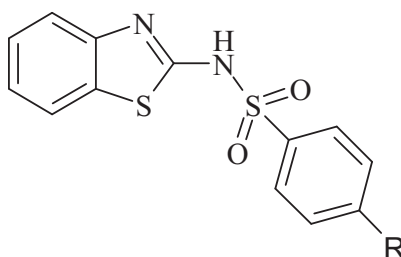
При вивченні впливу *пара*-амінобензойної кислоти (ПАБК) на антимікробну активність досліджуваних сполук останні використовували у кінцевій концентрації 40 мкМ. ПАБК додавали у проби до кінцевих концентрацій 0,4; 4 і 40 мкМ. Хід експерименту був аналогічний описаному вище. Як сполуку порівняння у цих дослідках використовували стрептоцид.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням загальноприйнятих методів варіаційного та кореляційного аналізу. Розраховували середні значення показників ($\bar{X}$) та їх стандартну помилку ($S_{\bar{X}}$). Вірогідність від-

мінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Ст'юдента, оцінюючи вірогідність отриманих результатів за рівнем значимості не менше 95 % ($p \leq 0,05$). Математичні розрахунки проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel.

Результати та їх обговорення

У роботі використовували сполуки, що були синтезовані у Проблемній науково-дослідній лабораторії № 5 Одеського національного університету імені І.І. Мечникова. Базовою є сполука I, а інші є похідними, в яких у бензольному кільці атом водню заміщений на нуклеофільні замісники (R): H (I), Cl (II), F (III), NO₂ (IV).



При вивченні дії нових аналогів сульфаніламідів використовували три штами бактерій — *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* і *Pseudomonas aeruginosa*, з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології і вірусології ОНУ. Дані мікроорганізми були взяті як представники грам-позитивних та грам-негативних бактерій. Для вивчення антимікробного ефекту сполук, використовували концентрації 0,4; 4; 40 та 80 мкМ у рідкому середовищі.

Отримані результати (рис. 1) свідчать, що усі досліджувані сполуки здатні інгібувати ріст тест-мікроорганізмів. Для *S. aureus* було виявлено залежне від концентрації інгібування росту усіма дослідженими сполуками. Сполука I пригнічувала ріст стафілококу на 25 % у концентрації 0,4 мкМ та на 65 % у концентрації 80 мкМ. Для сполук II, III, IV не спостерігалось значних відмінностей у величині антимікробної дії порівняно зі сполукою I (рис. 1А). Таким чином, можна зробити висновок, що присутність нуклеофільних замісників практично не впливає на величину антимікробного ефекту вивчених бензотіазолів щодо *S. aureus*.

Для грамнегативних бактерій спостерігалася інша картина (рис. 1Б і 1В). У цих випадках, особливо при високих концентраціях, виявлено більш високу антимікробну дію похідних з нуклеофільними замісниками. Так, інгібування росту *P. aeruginosa* сполукою I у концентрації 80 мкМ становило 52 %, а ефекти похідних з нуклеофільними замісниками при цій самій концентрації дорівнювали 70 % (сполука II), 86 % (сполука III) та 84 % (сполука IV). Для *S. enteritidis* встановлено таку саму закономірність, хоча її чутливість до досліджених похідних бензотіазолу була дещо нижчою, ніж чутливість псевдомонади. Більш висока активність галогенвмісних сполук II і III може бути пов'язана з дією бактеріальних дегалогеназ, які відокремлюють від органічних сполук токсичні для клітин аніони галогенів [9,11]. Щодо сполуки IV підвищення її антимікробної активності може бути обумовлено відновленням нітрогрупи під дією нітратредуктази усередині бактеріальних клітин. Як відомо, у ході цього процесу з'являються метаболіти нітросполук і вільні радикали, які чинять бактерицидну дію [5].



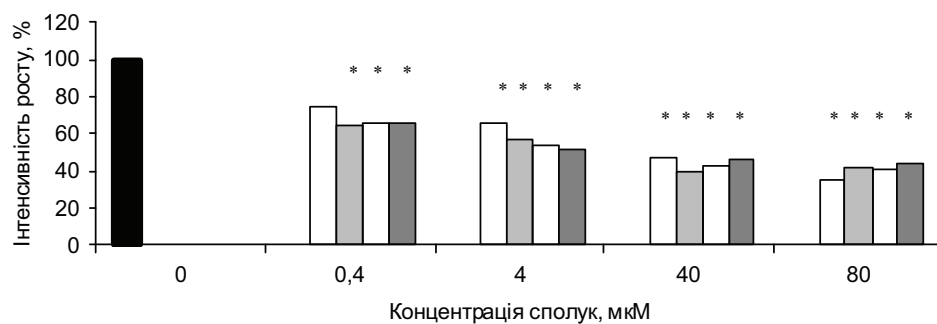
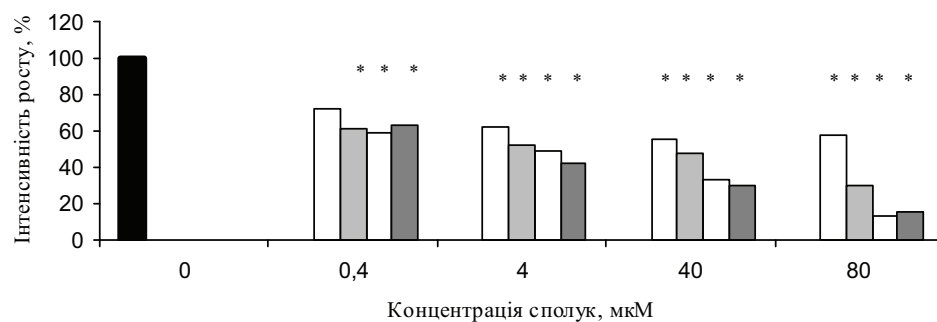
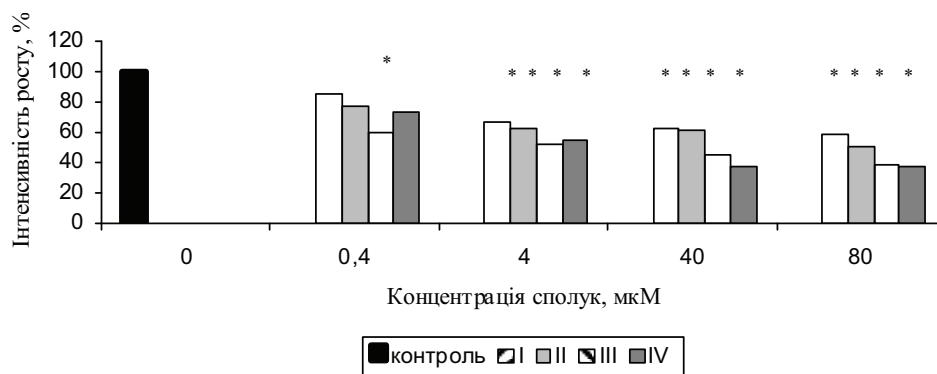
А *Staphylococcus aureus*Б *Pseudomonas aeruginosa*В *Salmonella enteritidis*

Рис. 1. Вплив похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів (I-IV) на ріст тест-штамів

* — різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Fig. 1. The influence of N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide derivatives (I-IV) on the test-strain growth



Механізм дії відомих сульфаніламідів пов'язаний, головним чином, із порушенням утворення мікроорганізмами необхідних для їх розвитку ростових факторів — фолієвої і дигідрофолієвої кислот та інших речовин, до молекули яких входить *пара*-амінобензойна кислота [3,10]. Сульфаніаміди близькі за будовою молекул до ПАБК і використовуються мікробною клітиною замість останньої. При цьому відбувається конкурентне інгібування дигідроптероатсинтази.

Враховуючи існуючі літературні дані [1] про те, що ПАБК здатна відмінити дію сульфаніламідів, на наступному етапі роботи був вивчений її вплив на антимікробні ефекти *N*-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів та його похідних. Для цього тест-штами вирощувалися у рідкому середовищі 24 години за присутності 40 мкМ досліджуваних сполук та ПАБК у концентраціях 0,4, 4, та 40 мкМ.

Отримані результати (рис. 2) свідчать про те, що сполука І за присутності ПАБК втрачала свою активність по відношенню до усіх використаних тест-штамів у 2 - 2,5 рази. Цей ефект *пара*-амінобензойної кислоти не залежав від її концентрації у середовищі. Якщо ПАБК додавалася до культур мікроорганізмів за відсутності похідних бензотіазолу, вона дещо підвищувала їх ріст у порівнянні з контролем: приблизно на 8-20 %.

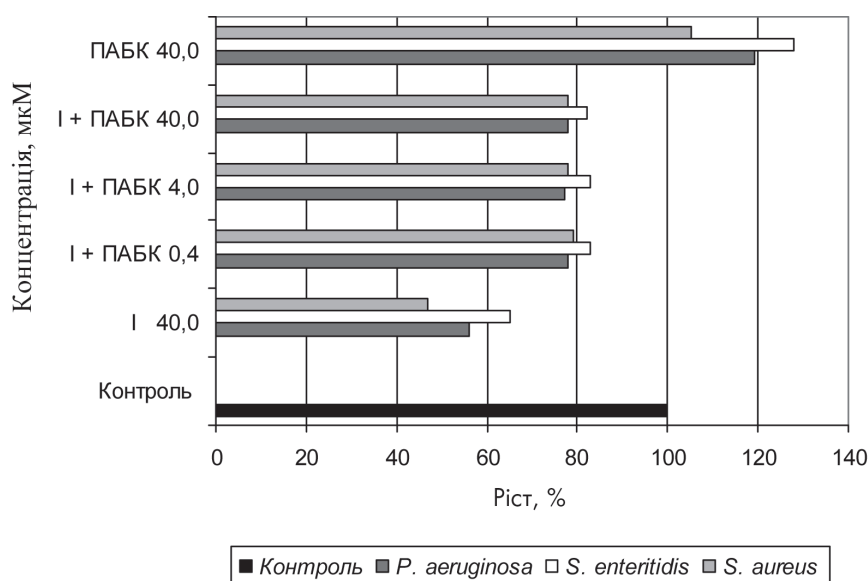


Рис. 2. Вплив різних концентрацій ПАБК на антимікробну активність сполуки І

Примітка (тут і на рис. 3 і 4): * — різниця вірогідна для усіх мікроорганізмів у порівнянні з контролем, ** — різниця вірогідна для усіх мікроорганізмів у порівнянні з ПАБА

Fig. 2. Influence of different PABA concentration on compound I antimicrobial activity

При додаванні ПАБК у середовище разом зі сполуками III і IV (рис. 3-4) її антагоністичний вплив практично не виявлявся. Ріст усіх тест-штамів підвищувався не більше ніж на 5 - 10 %

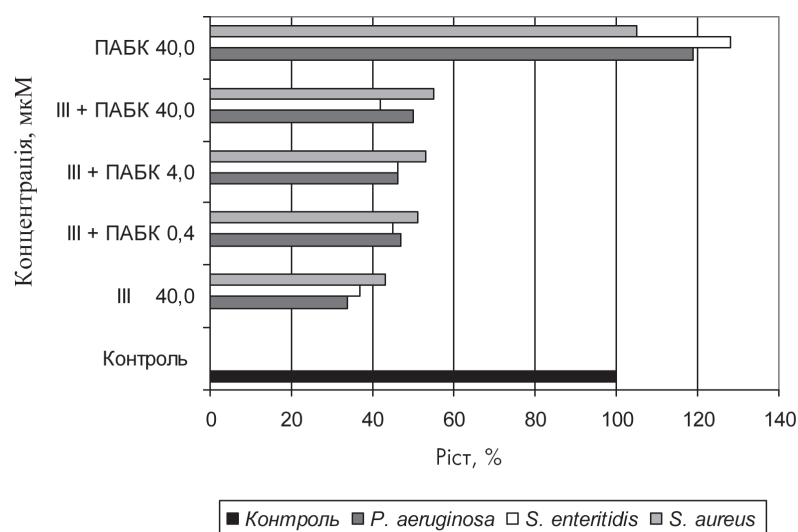


Рис. 3. Вплив різних концентрацій ПАБК на антимікробну активність сполуки III
 Fig. 3. Influence of different PABA concentration on compound III antimicrobial activity

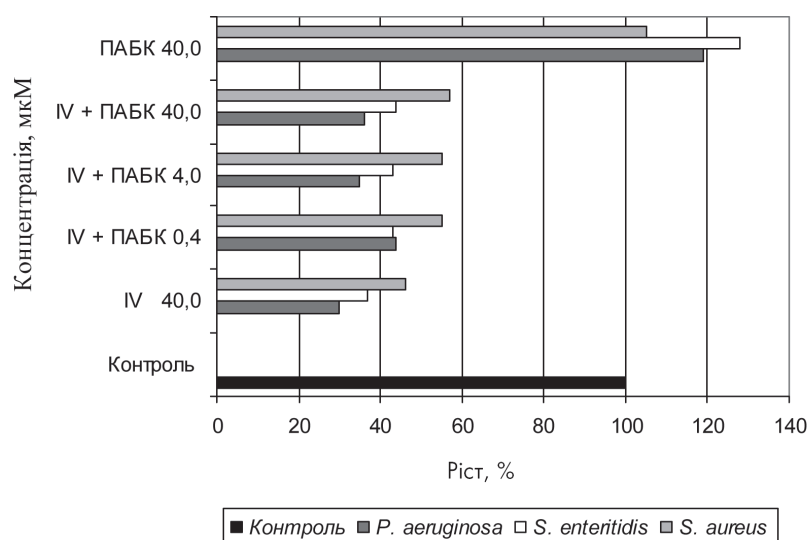


Рис. 4. Вплив різних концентрацій ПАБК на антимікробну активність сполуки IV
 Fig. 4. Influence of different PABA concentration on compound IV antimicrobial activity

На відміну від N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів та його похідних *para*-амінобензойна кислота навіть у меншій концентрації відміняла антимікробну дію стрептоциду щодо *S. aureus* і *S. enteritidis* (табл.). Ріст *P. aeruginosa* стрептоцид не пригнічував зовсім. Крім того, за одночасної присутності стрептоциду і ПАБК спостерігалася деяке стимулювання росту усіх тест-штамів.



Вплив ПАБК на антимікробну дію стрептоциду (E_{540})

Table

PABA influence on antimicrobial activity of streptocide (E_{540})

Мікроорганізм	Контроль	Стрептоцид 40 мкМ	Стрептоцид + 0,4 мкМ ПАБК	Стрептоцид + 40,0 мкМ ПАБК
<i>Staphylococcus aureus</i>	$0,600 \pm 0,06$	$0,430 \pm 0,04^*$	$0,620 \pm 0,06$	$0,650 \pm 0,06$
<i>Salmonella enteritidis</i>	$0,505 \pm 0,05$	$0,235 \pm 0,02^*$	$0,520 \pm 0,05$	$0,595 \pm 0,05^*$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$0,675 \pm 0,07$	$0,655 \pm 0,04$	$0,705 \pm 0,07$	$0,710 \pm 0,08$

Примітка: * — різниця вірогідна у порівнянні з контролем

Таким чином, отримані результати свідчать, що нові аналоги сульфаніаміду, N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамід і його похідні з нуклеофільними замісниками, здатні суттєво пригнічувати ріст бактерій. За даними щодо взаємодії цих сполук з *para*-амінобензойною кислотою можна зробити висновок, що механізм їх антимікробної дії зв'язаний не тільки з інгібуванням дигідропротоатсинтази. Найбільше він притаманний сполучі I, оскільки ПАБК знижує її антимікробний ефект приблизно на 50 %. Щодо сполук з нуклеофільними замісниками, то вони, скоріше за все, не впливають на синтез фолієвої кислоти взагалі. Отже, можна вважати, що активність досліджуваних сполук обумовлюється іншим механізмом, або механізмами. За даними літератури відомо, що деякі нові похідні сульфаніламідів можуть запобігати спіралізації ДНК за рахунок інгібування ДНК-гірази або пригнічують фенілаланіл-tРНК-синтетазу бактеріальних клітин [6,7]. При цьому такі похідні майже не впливають на синтез фолієвої кислоти. Подальші дослідження похідних N-бензотіазол-2-іл-бензенсульфонамідів будуть спрямовані як на встановлення спектру їх антимікробної дії, так і визначення механізмів, що обумовлюють їх активність.

ЛІТЕРАТУРА

1. Альберт Э. Избирательная токсичность. — М.: Мир, 2001. — 468 с.
2. Гуртовой Б. А., Кулаков В. И., Воропаева С. Д. Применение антибиотиков в акушерстве и гинекологии. — М.: Русфармамед, 1996. — 140 с.
3. Падейская Е. Н. Комбинированные антибактериальные препараты на основе производных сульфаниламида и диаминопиримидина // Новые лекарственные препараты, сб. трудов ВНИХФИ. — 1991. — С. 94-104.
4. Сидоренко С. В. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. — М.: Наука, 2002. — 142 с.
5. Bedzyk L., Tao Wang, Rick W. Ye. The periplasmic nitrate reductase in *Pseudomonas* sp. strain G-179 catalyzes the first step of denitrification // J. Bacteriol. — 1999. — V. 181, № 9. — P. 2802-2806.
6. Bergan, T., Ortengren B., Westerlund D. Clinical pharmacokinetics of co-trimazine // Clin. Pharmacokinet. — 1986. — V. 11. — P. 372-386.
7. Beyer D., Kroll H.-P., Endermann R., Schiffer G., Siegel S., Bauser M., Pohlmann J., Brands M., Ziegelbauer K., Haebich D., Eymann Ch., Brötz-Oesterhelt H. New class of



- bacterial phenylalanyl-tRNA synthetase inhibitors with high potency and broad-spectrum activity // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2004. – V. 48, □ 2. – P. 525-532.
8. *Chuang H.-Ch., Kardosh A., Gaffney K. J., Petasis N. A., Schönthal A. H.* COX-2 inhibition is neither necessary nor sufficient for celecoxib to suppress tumor cell proliferation and focus formation in vitro // <http://www.molecular-cancer.com/content/7/1/38> – 2008. – 16 May.
 9. *Fetzner S., Lingens F.* Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1994. – V. 58, 4. – P. 641-685.
 10. *Ives H. E.* Basic and clinical pharmacology // *Lange Basic Science* – New York, 2004. – P. 241-259.
 11. *de Jong R. M., Dijkstra B. W.* Structure and mechanism of bacterial dehalogenases: different ways to cleave a carbon-halogen bond // *Curr. Opin. Str. Biol.* – 2003. – V. 13, № 6. – P. 722-730.
 12. *Mengellers M. J., Hougee P. E., Janssen L. H., Van Miert A. S.* Structure-activity relationships between antibacterial activities and physicochemical properties of sulfonamides // *Vet. Pharmacol. Ther. J.* – 1997. – V. 20, № 4. – P. 276-283.
 13. *Richards R. M., Taylor R. B., Zhu Z. Y.* Mechanism for synergism between sulphonamides and trimethoprim clarified // *Pharm. Pharmacol. J.* – 1996. – V. 48, № 9. – P. 981-984.
 14. *Vermeire K., Thomas W., Heung-jin Choi, Qi Jin, Samala M. F., Andrej S., de Clercq E., Dominiqued S.* The anti-HIV potency of cyclotriazadisulfonamide analogs is directly correlated with their ability to down-modulate the CD4 receptor // *Molecular Pharmacology* – 2002. – V. 63. – P. 203-210.

**И. О. Малярчик, Т. О. Филиппова, Б. Н. Галкин, Л. Н. Вострова,
М. В. Гренадёрва**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (048) 63 57 61,
e-mail: igormal85@mail.ru

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА N-БЕНЗОТИАЗОЛ-2-ИЛ- БЕНЗЕНСУЛЬФОНАМИДА И ЕГО АНАЛОГОВ С НУКЛЕОФИЛЬНЫМИ ЗАМЕСТИТЕЛЯМИ

Реферат

Показано, что N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамид (соединение I) и его производные с нуклеофильными заместителями (соединения II, III и IV) дозозависимо угнетают *in vitro* рост *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *S. enteritidis*. Ингибирующее влияние на стафилококк не зависело от структуры производных. В то же время, аналоги с нуклеофильными заместителями были более активными по сравнению с соединением I в отношении грамотрицательных бактерий. В присутствии пара-аминобензойной кислоты антимикробное действие соединения I снижалось приблизительно на 40 %, а соединений III и IV практически не изменялось.

К л ю ч е в ы е с л о в а: антимикробная активность, N-бензотиазол-2-ил-бензенсульфонамид, производные с нуклеофильными заместителями, антагонизм с пара-аминобензойной кислотой.



**I. O. Malarchik, T. O. Filipova, B. M. Galkin, L. M. Vostrova,
M. V. Grenaderova**

Odesa Mechnykov National University
Dvoryanska str., 2, Odesa, 65082, Ukraine, tel.: 8 (048) 63 57 61,
e-mail: igormal85@mail.ru

**ANTIMICROBIAL PROPERTIES OF N-BENZOTIAZOL-2-
YL-BENZENSULFONAMIDE AND THEIR ANALOGS WITH
NUCLEOPHYLIC RADICALS**

Summary

It was shown that N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide (compound I) and its derivatives with nucleophylic radicals (compounds II, III and IV) can inhibit in vitro *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *S. enteritidis* growth in depending on a dose. The inhibitory effect of these compounds on *S. aureus* did not depend on their structures. At the same time, the derivatives with nucleophylic radicals were more effective against gram-negative bacteria than compound I. In presence of para-aminobenzoic acid antimicrobial effect of the compound I decreased approximately by 40 %. For the compounds III and IV there were no any decreasing of antimicrobial activity detected in presence of PABA.

K e y w o r d s: antimicrobial activity, N-benzotiazol-2-yl-benzensulfonamide, derivatives with nucleophylic radicals, antagonism with para-aminobenzoic acid.

