

ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИДРОГАЛОГЕНИДОВ АМИДРАЗОНОВ

А.С. Сенина*, С.В. Гурина, кандидат биологических наук,
А.В. Москвин, доктор химических наук, профессор
Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия;
Российская Федерация, 197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 14

Введение. В настоящее время отмечается увеличение резистентности многих патогенных микроорганизмов к широко используемым антимикробным препаратам. Представители класса амидразонов проявляют антибактериальную и противовирусную активность. Они доступны, имеют высокую реакционную способность, являются хорошими полупродуктами для синтеза других соединений, обладающих широким спектром биологической активности.

Цель работы – определение противомикробной активности синтезированных производных амидразона и наиболее активных соединений.

Материал и методы. Объект исследования – синтезированные производные амидразонов. Противомикробную активность полученных соединений устанавливали *in vitro* в отношении тест-культур *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* и грибов *Candida albicans* и *Aspergillus brasiliensis*. Исследования проводили в соответствии с фармакопейными методиками ГФ РФ XIII издания.

Результаты. Установлено, что амидразоны связываются с выбранными белками-мишенями эффективнее, чем известные антимикробные препараты. Все исследуемые соединения оказались фактически неактивными в отношении культур бактерии *E. coli* и *Bac. cereus*. Уровень антимикробной активности амидразонов в отношении *St. aureus* зависел от характера вводимого в молекулу заместителя. Наибольшей активностью обладали соединения, содержащие нитрогруппу в пара-положении фенилгидразинового фрагмента. Выявлены соединения, обладающие выраженными противогрибковыми свойствами в отношении *S. albicans*.

Заключение. Гидрогалогениды синтезированных амидразонов оказывают противомикробное действие в отношении *St. aureus*, *S. albicans* и *A. brasiliensis*. Показано, что противомикробная активность соединений зависит от электронной природы заместителей в арильных фрагментах молекулы амидразона. Выявлены наиболее перспективные соединения, оказывающие выраженное антистафилококковое и противогрибковое действие.

Ключевые слова: гидрогалогениды амидразонов, противомикробная активность, фунгицидное действие.

E-mail: anna.senina@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Поиск и создание новых безопасных и эффективных лекарственных средств (ЛС), воздействующих на широкий спектр микроорганизмов-возбудителей инфекционных заболеваний, остается актуальной проблемой. Это обусловлено тем, что бактерии способны приспосабливаться и находить новые способы сопротивления этому воздействию. В результате увеличивается резистентность многих патогенных микроорганизмов к широко используемым антимикробным препаратам. Кроме того, на генетическом уровне они передают эту способность новым поколениям бактерий [1].

Представители класса амидразонов проявляют антибактериальную, нейролептическую, гипотензивную, противовирусную, спазмолитическую активность [2]. Амидразонами называют соединения, характеризующиеся структурной формулой, где R¹, R², R³, R⁴ и R⁵ могут быть представлены как атомами водорода, так и разнообразными заместителями (рис. 1). В настоящее время известны амидразоны, содержащие в своем составе алифатические, ароматические и гетероциклические фрагменты. Амидразоны

доступны, высоко реакционно способны, являются хорошими полупродуктами для синтеза соединений рядов 1,2,4-триазола и 1,2,4-триазина, обладающих противомикробной, противовоспалительной, анальгезирующей активностью [3].

Известно не так много методов получения амидразонов, причем они имеют такие недостатки, как низкий выход, трудность выделения целевых веществ и их очистки. Мы синтезировали ряд производных амидразонов, согласно схеме превращений, представленной на рис. 2. Исходными соединениями служили гидразоноилхлориды (1a-d) как наиболее доступные соединения из соответствующих коммерческих гидразидов без допол-

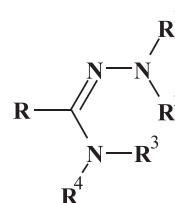


Рис. 1. Общая структурная формула амидразонов

нительной очистки. Амидразоны были получены в виде гидрогалогенидов (3a-d), замещенных п'-арилбензолкарбоксимидогидразидов путем аминирования [4].

Цель исследования – определение противомикробной активности синтезированных производных амидразона и выявление наиболее активных соединений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Полученные соли амидразонов (3a-d) представляли собой твердые кристаллические вещества желтого или оранжевого цвета, хорошо растворимые в воде. Выход продуктов составил 80–85% [4]. Состав, строение и индивидуальность полученных соединений были установлены с помощью физико-химических методов анализа (спектрометрия ^1H , ^{13}C ЯМР-, ИК-спектроскопия и масс-спектрометрия, тонкослойная хроматография, элементный анализ).

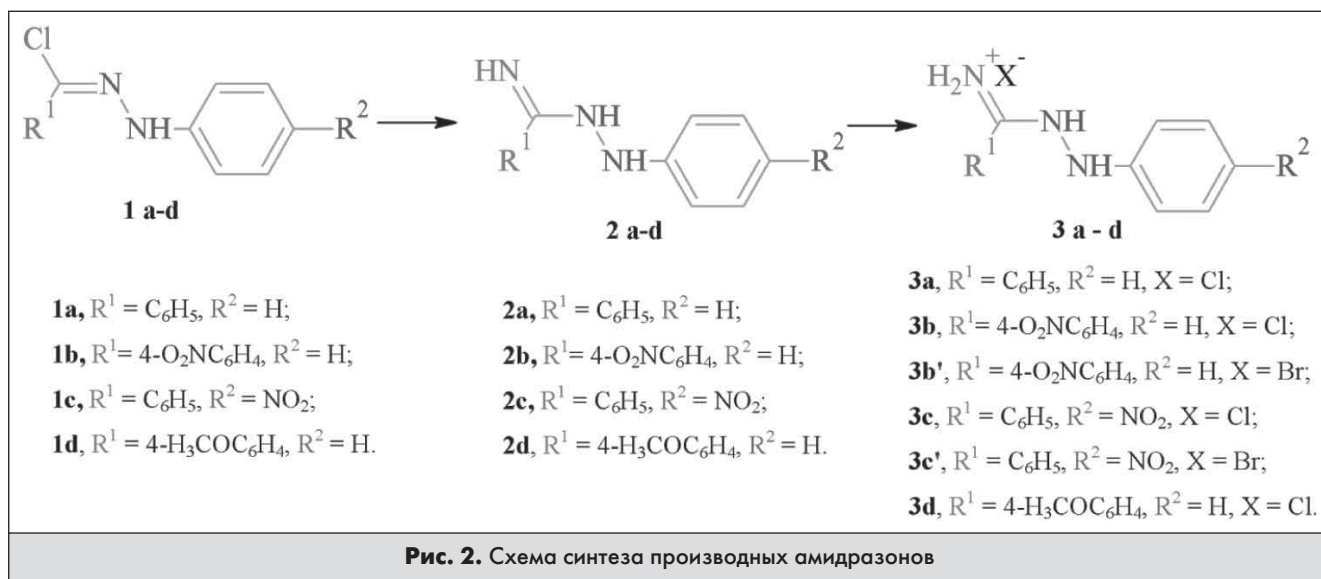
Предварительно был составлен компьютерный прогноз возможных видов биологической активности производных амидразонов с помощью специализированных компьютерных программ: PASS Refined 2014, PASS Targets и AutoDockVina. Компьютерная программа PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) позволяет предсказать спектр биологической активности химических соединений на основе анализа взаимосвязей структура–активность в обучающей выборке [5]. Программа PASS Targets предназначена для компьютерной оценки взаимодействия органических соединений с белками-мишенями, представляющими все известные в настоящее время фармакологически значимые классы белков на основе информации, представленной в базе данных ChEMBLdb [6].

Одним из эффективных способов поиска новых биологически активных веществ является молекулярный докинг. С помощью программы AutoDockVina можно определять структуру активных центров белков, изучать возможность связывания лиганда с белком, оценивать комплементарность (структурную и химическую) белка и лиганда, находить энергию связывания лиганда в комплексе с белком [7].

Для экспериментального исследования антибактериальной активности *in vitro* в качестве тест-культур использовали следующие штаммы микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Bacillus cereus* ATCC 6633 и *Escherichia coli* ATCC 25922. Противогрибковую активность изучали на тест-культурах дрожжей рода *Candida albicans* NCTC 885-653 и мицелиального гриба *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 [8].

Исходные суспензии клеток бактерий и дрожжей готовили по стандарту мутности 1 млрд клеток/мл. Для получения спор мицелиального гриба *Asp. brasiliensis* культуру готовили в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ XIII издания (ГФ РФ XIII). [8]. Культуру *Asp. brasiliensis* высевали на плотную среду Сабура и инкубировали при температуре $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$ в течение 5–7 сут. Споры *Asp. brasiliensis* смывали со среды фосфатным буферным раствором с 0,05 % твина-80. Определяли количество конидий в 1 мл смыва, используя камеру Горяева, и получали суспензию спор с концентрацией 10^5 КОЕ/мл.

Минимальные микробоцидные (МИКц) и микростатические ингибирующие (МИКст) концентрации исследуемых веществ определяли методом их серийных разведений в питательных средах – мясопептонном бульоне (МПБ) или в жидкой среде Сабура – с последующим добавлением тест-культур,



инкубированием и высевом на агаризованные питательные среды. Эксперименты выполняли в асептических условиях. Микробная нагрузка составляла 10^5 КОЕ /мл.

Растворы образцов гидрогалогенидов амидразонов готовили в дистиллированной воде с исходной концентрацией 2 мг/мл.

Пробирки с бактериями культивировали при температуре 37°C, с грибами – при 24°C в течение 24–48 ч. Результаты учитывали по наличию (помутнение среды) или отсутствию роста культур. Для выявления цидного или статического действия образцов производили высеv на плотные питательные среды (МПА и среда Сабуро) в чашках Петри по секторам, инкубировали при оптимальных температурах и оценивали результаты по наличию или отсутствию роста культур.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью программы PASS установили наиболее вероятные виды биологической активности гидрогалогенидов амидразонов, а именно: противовоспалительную, анальгезирующую, бактерицидную и фунгицидную [9]. На основании расчетов, проведенных с помощью программы PASS Targets, были выбраны следующие белки-мишени: *C. albicans* – глюкан 1,3-β-глюкозидаза, *St. aureus* – дегидроокваленсинтаза, *E. Coli* – β-галактозидаза. Применяя программу AutoDockVina, оценили энергию связывания между амидразонами и белками-мишенями. Как оказалось, амидразоны связываются с белком-мишенью эффективнее, чем уже известные антимикробные препараты [9]. На основании результатов компьютерного моделирования взаимодействия амидразонов с белками-мишенями удалось отобрать соединения для дальнейшего тестирования *in vitro*.

При экспериментальном исследовании антимикробного действия гидрогалогенидов амидразонов установили, что все исследуемые соединения – фактически неактивны в отношении культур бактерии *E. coli* и *Vac. cereus*. Соединения 3с и 3с' обладали выраженным противостафилококковым действием, а соединения 3а и 3b – противокандидозным действием (см. таблицу).

Уровень антимикробной активности амидразонов в отношении *St. aureus* зависел от характера вводимого в молекулу заместителя. Наибольшей антистафилококковой активностью обладали гидрохлорид 3с и гидробромид 3с', содержащие нитрогруппу в пара-положении фенолгидразинового фрагмента. Соединения оказывали бактерицидное действие при МИКц 4 и 8 мкг/мл. Препаратом сравнения служил наиболее известный на фармацевтическом рынке Российской Федерации бактерицидный препарат нифуроксазид, имеющий структурное сходство с амидразонами.

Минимальные ингибирующие концентрации соединений 3с и 3с' были в 2–4 раза ниже, чем у препарата сравнения.

Значительное влияние на противомикробную активность оказывал характер вводимого заместителя. При замене электроноакцепторного заместителя (нитрогруппы) электронодонорным (метоксигруппой) (соединение 3d) бактерицидная активность значительно понижалась (МИКц 62,5 мкг/мл).

При изучении фунгицидной активности полученных соединений выявили выраженное противогрибковое действие в отношении *C. albicans* у соединений: 3а (МИКст 8 мкг/мл, МИКц 16 мкг/мл), а также с сильным электроноакцепторным заместителем (нитрогруппа) в пара-положении одного из арильных фрагментов – соединения 3b (МИКст 4 мкг/мл, МИКц 8 мкг/мл) и 3b' (МИКст 16 мкг/мл, МИКц 32,5 мкг/мл). Фунгицидные концентрации соединений 3а и 3b при действии на *C. albicans* были ниже, чем у препарата сравнения флуконазола (МИКц 32 мкг/мл). Данные производные оказывали и фунгистатическое действие.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ГИДРОГАЛОГЕНИДОВ АМИДРАЗОНОВ

Соединение	Тест-культуры	Концентрация, мкг/мл	
		МИКст	МИКц
3a	<i>St. aureus</i>	–	16,0
	<i>C. albicans</i>	8,0	16,0
	<i>A. brasiliensis</i>	–	125,0
3b	<i>St. aureus</i>	–	16,0
	<i>C. albicans</i>	4,0	8,0
	<i>A. brasiliensis</i>	–	16,0
3b'	<i>St. aureus</i>	–	16,0
	<i>C. albicans</i>	16,0	32,5
	<i>A. brasiliensis</i>	–	62,5
3с	<i>St. aureus</i>	–	4,0
	<i>C. albicans</i>	–	250,0
3с'	<i>St. aureus</i>	–	8,0
	<i>C. albicans</i>	–	250,0
3d	<i>St. aureus</i>	–	62,5
	<i>C. albicans</i>	–	62,5
Флуконазол	<i>C. albicans</i>	–	32,5
Нифуроксазид	<i>St. aureus</i>	–	16,0
Вориканозол	<i>A. brasiliensis</i>	32,5	–

На основании результатов, полученных при изучении противогрибкового действия производных амидразонов, были отобраны 3 наиболее активных соединения (3а, 3б и 3в'). Далее исследовали активность последних в отношении мицелиального гриба *A. brasiliensis*. Соединение 3б оказывало фунгицидное действие при МИКц 16 мкг/мл, которое было в 2 раза ниже, чем у препарата сравнения вориканозола (фунгистатическое действие при МИКст 32,5 мкг/мл).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что гидрогалогениды замещенных N'-арилбензолкарбоксимидогидразидов оказывают противомикробное действие в отношении *St. aureus*, *C. albicans* и *A. brasiliensis*. Показано, что противомикробная активность соединений зависит от электронной природы заместителей в арильных фрагментах амидразона. Наличие электроноакцепторных заместителей в одном из бензольных колец повышает, а наличие электроно-донорных заместителей снижает антимикробную активность соединений. Выявлены соединения, оказывающие

наиболее выраженное антистафилококковое и противогрибковое действие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Всемирная организация здравоохранения. (Электронный ресурс). Режим доступа: <http://www.who.int/ru/>
2. Пассет Б.В. Технология химико-фармацевтических препаратов и антибиотиков. М.: Медицина, 1977.
3. Neilson D.G. Chemistry Department, The University, Dundee, Angus, R. Roger. Scotland, 1969; 151–70.
4. Евдокимов А.А., Сенина А.С., Москвин А.В. и др. Синтез, строение и биологическая активность некоторых амидразонов. Бултеровские сообщения, 2014; 39 (8): 87–90.
5. Filimonov D.A., Poroikov V.V. Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening (ed. by A.Varnek, A.Tropsha) Cambridge (UK): RSC Publishing, 2008; 182–216.
6. ChEMBLdb. The European Bioinformatics Institute Part of the European Molecular Biology Laboratory (Electronic resource. Official website). URL: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/db/>
7. Погодин П.В., Лагунин А.А., Иванов С.М. и др. Компьютерный прогноз взаимодействия низкомолекулярных органических соединений с белками-мишенями. Вестник РГМУ, 2013; 4: 69–74.
8. Государственная фармакопея РФ XIII изд., том 1. М., 2015; 848–923.
9. Senina A.S., Evdokimov A.A., Moskvina A.V., Fedorova E.V. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Amidrazone Derivatives. Journal of Advanced Chemical Sciences, 2016; 2 (1): 183–7.

Поступила 14 июля 2017 г.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF AMIDRAZONE HYDROHALOGENIDES

A.S. Senina; S.V. Gurina, PhD; Professor A.V. Moskvina, PhD

Saint Petersburg State Chemopharmaceutical Academy; 14, Prof. Popov St., Saint Petersburg 197376, Russian Federation

SUMMARY

Introduction. There is now an increase in the resistance of many pathogens to commonly used antimicrobial drugs. The representatives of a class of amidrazones exhibit antibacterial and antiviral activities. They are available, highly reactive, and good intermediates in the synthesis of other compounds possessing a wide spectrum of biological activity.

Objective: to determine the antimicrobial activity of the synthesized derivatives of amidrazone and the most active compounds.

Material and methods. The object of the investigation was synthesized amidrazone derivatives. The obtained compounds were ascertained to have *in vitro* antimicrobial activity against the test cultures of *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, and *Escherichia coli* and the fungi *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*. The investigations were conducted in accordance with the procedures described in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIII edition.

Results. Amidrazones were established to be bound to the selected protein targets more effectively than the known antimicrobial agents. All the test compounds were virtually inactive against the cultured bacteria *E. coli* and *Bac. cereus*. The antimicrobial activity of amidrazones against *St. aureus* depended on the nature of a substituent inserted into the molecule. The greatest activity was shown by the compounds containing the nitro group at the para-position of a phenylhydrazine moiety. The compounds having pronounced antifungal properties against *C. albicans* were identified.

Conclusion. Hydrohalogenides of the synthesized amidrazones have antimicrobial activity against *St. aureus*, *C. albicans*, and *A. brasiliensis*. The antimicrobial activity of the compounds has been shown to depend on the electronic nature of substituents in the aryl moieties of the amidrazone molecule. The most promising compounds which have a pronounced antistaphylococcal and antifungal activities have been identified.

Key words: amidrazone hydrohalogenides, antimicrobial activity, fungicidal activity.

REFERENCES

1. World Health Organization. (Electronic resource). Access mode: <http://www.who.int/ru/>
2. Passet B.V. Technology of chemical-pharmaceuticals and antibiotics. Moscow: Medicine, 1977 (in Russian).
3. Neilson D.G. Chemistry Department, The University, Dundee, Angus, R. Roger. Scotland, 1969; 151–170.
4. Evdokimov A.A., Senina A.S., Moskvina A.V. et al. Synthesis, structure and biological activity of some amidrazones. Butlerovskie soobshheniya, 2014; 39 (8): 87–90 (in Russian).
5. Filimonov D.A., Poroikov V.V. Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening. (ed. by A.Varnek, A.Tropsha). Cambridge (UK): RSC Publishing, 2008; 182–216.
6. ChEMBLdb. The European Bioinformatics Institute Part of the European Molecular Biology Laboratory (Electronic resource. Official website). URL: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/db/>
7. Pogodin P.V., Lagunin A.A., Ivanov S.M., et al. Computer forecast of interaction of low molecular weight organic compounds with target proteins. Vestnik RGMU, 2013; 4: 69–74 (in Russian).
8. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII ed., vol.1. Moscow, 2015; 848–923 (in Russian).
9. Senina A.S., Evdokimov A.A., Moskvina A.V., Fedorova E.V. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Amidrazone Derivatives. Journal of Advanced Chemical Sciences, 2016; 2 (1): 183–187.