

УДК 547.794.3

НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 1,3,4-ТИАДИАЗОЛА, ОБЛАДАЮЩИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

А.С. Кошевенко^{1*}, В.Н. Юсковец¹, Е.П. Ананьева¹, И.П. Яковлев¹,
Т.Л. Семакова¹

Резюме. Разработан перспективный метод получения новых гетероциклических соединений – хлоридов 2-[(Z)-1-(3,5-диарил-1,3,4-тиадиазол-2(3H)-илиден)метил]-3,5-диарил-1,3,4-тиадиазол-3-ия. Структура и индивидуальность полученных соединений доказаны физико-химическими методами идентификации органических соединений: ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопией, ИК-спектроскопией, масс-спектрометрией. Определена антибактериальная активность в отношении культур *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*. Показано, что данные соединения обладают выраженной антибактериальной активностью в отношении грамположительных бактерий. Выявлено наиболее активное соединение, которое потенциально может быть использовано в медицине в качестве антимикробного средства.

Ключевые слова: 1,3,4-тиадиазол, малонилдихлорид, N'-арилтиобензгидразид, антимикробная активность, минимальная подавляющая концентрация.

NEW 1,3,4-TIADIAZOLE DERIVATIVES WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY

A.S. Koshevenko^{1*}, V.N. Yuskovets¹, E.P. Ananyeva¹, I.P. Yakovlev¹, T.L. Semakova¹

Abstract. The method of obtaining new heterocyclic compounds – chlorides 2-[(Z)-1-(3,5-diaryl-1,3,4-thiadiazol-2(3H)-iliden)methyl]-3,5-diaryl-1,3,4-thiadiazol-3 was developed. The structure and individuality of the obtained compounds are proved by the physico-chemical methods for the identification of organic compounds: ¹H and ¹³C NMR, IR spectrometry, mass spectrometry. Antibacterial activity was defined against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*. It was shown that these compounds have a pronounced antibacterial activity against gram-positive bacteria. The most active compound has been identified, which can potentially be used in medicine as an antimicrobial agent.

Keywords: 1,3,4-thiadiazole, malonyl chloride, N'-arylthiobenzhydrazide antibacterial activity, the minimal inhibitory concentration.

¹ – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России), 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

¹ – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Russian Federation Ministry of Healthcare, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: anastasia.koshevenko@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

В соответствии с данными ВОЗ каждый год в мире от инфекционных заболеваний умирает 17 млн человек. Данные заболевания на сегодняшний день занимают 3–4-е место в рейтинге причин смертности [1]. При этом особую тревогу вызывает распространение резистентных штаммов микроорганизмов [2]. Считается, что порядка 70% внутригоспитальных инфекций вызваны штаммами, устойчивыми к одному или нескольким антибиотикам [3].

Например, через 7 лет после введения в практику пенициллина 50% штаммов *Staphylococcus aureus* были невосприимчивы к действию этого антибиотика, так как распространялись штаммы бактерий, вырабатывающих пенициллиназу [3]. Затем, после введения в практику метициллина, устойчивого к воздействию пеницил-

линазы, появились устойчивые бактериальные штаммы, резистентность которых была обусловлена другим механизмом: бактериальная клетка изменяла белок-мишень, предотвращая его блокирование [4].

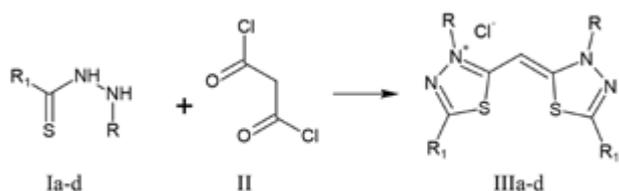
Наибольшее внимание обращает на себя факт увеличения количества зарегистрированных случаев появления штаммов, устойчивых к резервным антибиотикам. Так, например, увеличилось количество сообщений о появлении штаммов *S. aureus*, резистентных к ванкомицину [5].

Таким образом, несмотря на наличие в настоящее время большого количества средств для лечения инфекций, данная группа заболеваний остается достаточно значимой для здравоохранения и человечества в целом, что требует расширения действующего арсенала с помощью новых эффективных нетоксичных противомикробных средств.

Целью данной работы является синтез и изучение противомикробной активности новых производных 1,3,4-тиадиазола, аналоги которых обладают целым рядом практически важных свойств, в том числе высокой биологической активностью [6–8].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На кафедре органической химии путем взаимодействия замещенных *N'*-арилтиобензгидразидов (**Ia-d**) с малонилдихлоридом (**II**) в соотношении 1:1 в среде кипящего ацетонитрила получены хлориды 2-[(*Z*)-1-(3,5-диарил-1,3,4-тиадиазол-2(*3H*)-илиден)метил]-3,5-диарил-1,3,4-тиадиазол-3-ия (**IIIa-d**):



R=Ph; R¹=Ph (**Ia**, **IIIa**); R=3,5-диFC₆H₄; R¹=4-FC₆H₄ (**Ib**, **IIIb**); R=4-FC₆H₄; R¹=Ph (**Ic**, **IIIc**); R=3,5-диFC₆H₄; R¹=Ph (**Id**, **IIIId**).

Выход продуктов в виде ярко-желтых мелких игольчатых кристаллов составил 75–90% от теоретического из расчета на *N'*-арилтиобензгидразид (таблица 1).

Таблица 1.

Характеристика соединений IIIa-e

№	R	R ¹	Т. пл., °С	Выход, %	R _f ^a
IIIa	Ph	Ph	269–271	90	0,87
IIIb	3,5-диFC ₆ H ₄	4-FC ₆ H ₄	279–281	87	0,62
IIIc	4-FC ₆ H ₄	Ph	>300	88	0,38
IIIId	3,5-диFC ₆ H ₄	Ph	234–236	86	0,51

Строение синтезированных веществ было доказано физико-химическими методами идентификации органических соединений: ¹H- и ¹³C-ЯМР-спектроскопией (прибор Avance III, Bruker, США), ИК-спектроскопией (прибор ФСМ-1201, «Инфраспек», Россия), масс-спектрометрией (прибор micrOTOF, Bruker, США).

В спектрах ¹H-ЯМР соединений IIIa-d в CDCl₃ присутствуют сигналы протонов бензольных колец (δ 5,89–8,11 м.д.), протона метинового мостика между 1,3,4-тиадиазольными циклами (δ 5,89–6,35 м.д.) с соотношением интегральных интенсивностей 20:1.

Спектры ¹³C-ЯМР этих соединений характеризуются сигналами ядер углерода бензольных колец (δ 125,4–136,8 м.д.), тиадиазольных циклов (δ 153,67–168,56 м.д.) и метинового мостика (δ 79,26–83,88 м.д.).

Для ИК-спектров веществ IIIa-d (таблетки KBr) наиболее характерной является область 1120–1640 см⁻¹, где наблюдаются полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям связей C=C и

C=N сопряженной системы. Аналогичные колебания C–H-связей бензольных колец находятся в диапазоне 2350–3100 см⁻¹.

Состав полученных веществ также был подтвержден данными масс-спектрометрии [*m/z*: 525 (**IIIa**), 633 (**IIIb**), 561 (**IIIc**), 597 (**IIIId**), 662 (**IIIe**)].

Антибактериальную активность исследовали на тест-культурах микроорганизмов: *Escherichia coli* штамм ATCC25922, *Staphylococcus aureus* штамм Р 209, *Bacillus cereus* штамм varmycolides 537. Антимикробное действие полученных соединений определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде – мясо-пептонном бульоне (МПБ) с последующим высевом на плотную питательную среду – мясо-пептонный агар (МПА) для определения минимальной подавляющей концентрации исследуемых соединений.

Исходные растворы производных 1,3,4-тиадиазола готовили в 50% водном ДМСО («Татхимфармпрепараты», Россия) из-за их ограниченной растворимости в воде.

Для приготовления взвеси бактериальных культур использовали двухсуточные культуры, выращенные на МПА. Готовили взвесь по бактериальному стандарту мутности Мак-Фарланда (2·10⁸ КОЕ/мл), затем полученную суспензию разводили до концентрации 10⁶ КОЕ/мл и вносили по 0,1 мл в каждую пробирку ряда. Микробная нагрузка составляла 10⁵ КОЕ/мл.

Бактериальные культуры выращивали в течение 24 ч при температуре 37 °С. Антимикробный эффект определяли по отсутствию роста тест-микроорганизма в МПБ при минимальной концентрации препарата, а характер противомикробного действия (бактериостатическое или бактерицидное) – при отсутствии роста на плотной питательной среде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве препаратов сравнения были выбраны антимикробные препараты ванкомицин и тейкопланин. По химической структуре они являются гликопептидами и применяются при инфекциях, вызванных грамположительными микроорганизмами.

Золотистый стафилококк (*St. aureus*) является возбудителем гнойно-воспалительных инфекций различной локализации, в том числе госпитальных инфекций, обладает резистентностью ко многим лекарственным препаратам [9]. Из литературных данных известно, что в отношении *St. aureus* минимальная подавляющая концентрация ванкомицина и тейкопланина составляет 1–12,5 мкг/мл [10].

Следует отметить, что все исследуемые соединения обладали бактерицидным действием.

Установлено, что вещества IIIa (исходное соединение) и IIIc (с двумя атомами фтора, введенными в

бензольное кольцо в третьем и пятом положении) проявляли высокую антимикробную активность в отношении стафилококка (МПК – 1,9 и 3,8 мкг/мл соответственно). При введении в молекулу более двух атомов фтора (производные **IIIb**, **IIIc**) отмечали снижение антибактериального действия до МПК 32 мкг/мл (рисунок 1).

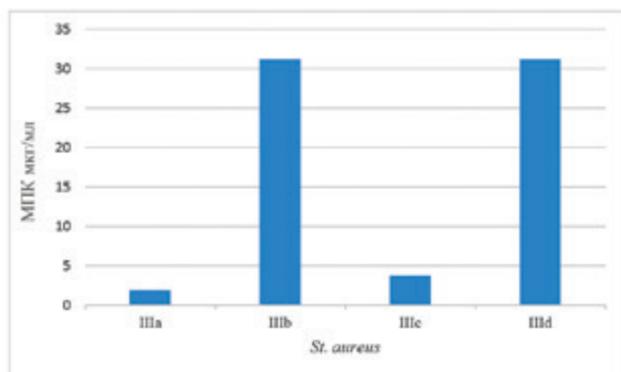


Рисунок 1. Антимикробная активность производных 1,3,4-тиадиазола в отношении *St. aureus*

При изучении активности производных 1,3,4-тиадиазола в отношении *E. coli* установлено, что все исследуемые соединения оказались неактивными, МПК составляла 125 мкг/мл.

Таким образом синтезированные нами производные 1,3,4-тиадиазола проявляли выраженную антимикробную активность в отношении грамположительных бактерий (*St. aureus*), в связи с этим было исследовано их антимикробное действие в отношении спорообразующих грамположительных бактерий рода *Bacillus*.

В качестве тест-микроорганизма использовали *B. cereus*, который является условно-патогенной бактерией, возбудителем токсикоинфекций. При исследовании антимикробной активности в отношении *B. cereus* удалось установить, что наибольшей активностью также обладают соединения **IIIa** и **IIIc**. Минимальная подавляющая концентрация составляет 1,9 и 3,8 мкг/мл соответственно, что коррелирует с результатами антимикробной активности в отношении *St. aureus*.

Химическая модификация соединений **IIIb** и **IIIд** приводила к снижению антибактериальной активности в 2–8 раз в отношении *B. cereus* (рисунок 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами разработаны эффективные методы получения новых производных 1,3,4-тиадиазола (**IIIa-d**), доказано их строение.

Установлено, что данные соединения обладают антимикробной активностью в отношении грамположительных бактерий *St. aureus*, *B. cereus*. Показано влияние заместителей на проявление антимикробного действия.

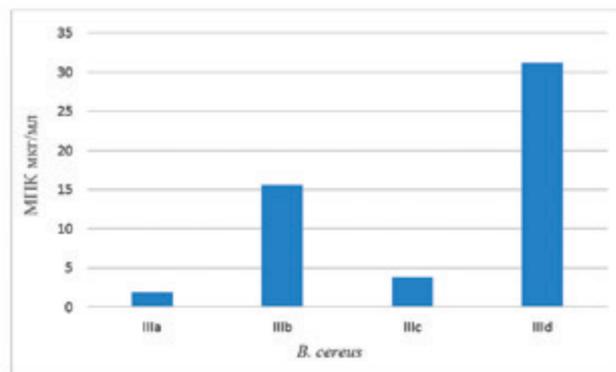


Рисунок 2. Антимикробная активность в отношении спорообразующих бактерий *B. cereus*

Выявлено, что соединения **IIIa** и **IIIc** оказались наиболее активными в отношении *St. aureus* в ряду синтезированных препаратов, а их антимикробный эффект сопоставим с препаратами сравнения.

Полученные результаты позволяют потенцировать соединение **IIIa** как перспективное лекарственное средство, обладающее антибактериальной активностью на уровне существующих на рынке препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

- 10 ведущих причин смерти в мире // Информационный бюллетень ВОЗ. 2014. № 310.
- M. Merelli, M. Bassetti, C. Temperoni, A. Astilean. New antibiotics for bad bugs: where are we? // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2013. P. 12–22.
- R.P. Wenzel. The antibiotic pipeline—challenges, costs, and values // N Engl J Med. 2004. P. 351; P. 523–526.
- S.E. Cosgrove, D. Sakoulas, E.N. Perencevich, M.J. Schwaber, A.W. Karchmer, Y. Carmeli. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-0 Resistant and Methicillin Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis // Clin Infect Dis. 2006. P. 53–59.
- R.J. Scheffler, S. Colmer, H. Tynan, A.L. Demain, V.P. Gullo. Antimicrobials, drug discovery, and genome mining // Appl Microbiol Biotechnol. 2013. P. 969–978.
- K. Shalini, N. Kumar, S. Drabu, P.K. Sharma. Advances in synthetic approach to and antifungal activity of triazoles // Beilstein J Org Chem. 2011. P. 668–77.
- S.F. Barbuceanu, G. Saramet, G.L. Almajan, C. Draghici, F. Barbuceanu, G. Bancescu. New heterocyclic compounds from 1,2,4-triazole and 1,3,4-thiadiazole class bearing diphenylsulfone moieties: synthesis, characterization and antimicrobial activity evaluation // Eur J Med Chem. 2012. P. 417–423.
- L. Yet. Pyrazoles // Comprehensive Heterocyclic Chemistry III. 2008. V. 4. P. 3–141.
- А.Г. Довнар, Е.С. Носонова. Характеристика множественной резистентности клинических штаммов энтеробактерий, ацинетобактериальных кандид // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2011. № 4. С. 53–54.
- Ю.Б. Белоусов, О.В. Филиппова, О.А. Селютин, Д.Ю. Белоусов. Сравнительная характеристика препаратов ванкомицина, зарегистрированных в РФ // Качественная клиническая практика. 2009. № 5.