

УДК 547.458

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ N-АРИЛИДЕНГИДРАЗИДОВ КАРБОКСИЭТИЛАЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Д. Н. Косарева^{1*}, Т. И. Тарадейко¹, С. Н. Галашева¹, Е. П. Ананьева¹,
А. А. Иозеп¹

Резюме. Изучена противобактериальная и противогрибковая активность продуктов взаимодействия гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты с 5-нитрофурфуолом и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеином. Активность синтезированных веществ определяли на тест-культурах *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*. У полученных соединений выявлено антибактериальное действие, сравнимое с фурацилином. Образцы ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина обладают высокой фунгицидной и фунгистатической активностью.

Ключевые слова: N-арилиденгидразиды карбоксиэтилальгиновой кислоты, нитрофураны, антимикробная активность.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF N-ARILIDENHYDRAZIDE OF CARBOXYETHYLALGINIC ACID

D. N. Kosareva^{1*}, T. I. Taradeyko¹, S. N. Galasheva¹, E. P. Ananieva¹, A. A. Iozep¹

Abstract. The antibacterial and antifungal activity of the products of the interaction of hydrazides of carboxyethyl alginic acid with 5-nitrofurfural and β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein was studied. The effect of analytical studies on the test-culture of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The test compounds showed antibacterial action comparable to the furacilin and high antifungal effect. Samples of acylhydrazones β-(5-nitro-2-furyl)-acrolein have high fungicidal and fungistatic activity.

Keywords: N-arilidenhydrazide of carboxyethylalginic acid, nitrofurans, antimicrobial activity.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Healthcare of Russia, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: kutkinadaria@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Химиотерапевтические препараты нитрофуранового ряда обладают антимикробной активностью и применяются в медицинской практике для лечения инфекционных заболеваний. В настоящее время в связи с появлением новых антибиотиков применение нитрофуранов значительно снизилось. Тем не менее широкий спектр действия делает их одним из весьма распространенных лечебных средств, применяемых в урологии для лечения пиелонефритов, циститов и уретритов, вызываемых стафилококками, кишечными палочками, протейями и некоторыми другими бактериями (кроме синегнойной палочки). Нитрофураны высоко эффективны и при лечении различных инфекций желчевыделительных органов [1]. Следует особенно отметить комбинированное их применение со сходными по фармакологическим свойствам антибиотиками. Несовместимости при этих сочетаниях еще не отмечено, как и при комбинации с различными другими специфическими и неспецифическими лечебными препаратами (сыворотками, бактериофагами, биостимуляторами, витаминами и др.).

Основной проблемой при применении нитрофуранов является частое проявление побочных действий, а также отсутствие парентеральных лекарственных форм [1].

В литературе достаточно много примеров о введении в молекулу полисахарида противомикробных веществ с целью улучшения их биологических свойств (продолгование действия, снижение токсичности, изменение растворимости и некоторых других свойств). Изучена и активность полимерных аналогов фурацилина: 5-нитрофурфуриден- и 3-(5-нитро-2-фурил)-2-пропенилиденгидразидов сульфатированной, карбоксиметилированной и нативной альгиновой кислот [2]. Исследования показали, что синтезированные соединения в целом не снижают противомикробный эффект, а в ряде случаев увеличивают его в 10–100 раз, а также проявляют фунгицидный и фунгистатический эффект в отношении *C. albicans*. Авторы предполагают, что увеличение размера «вставки» (углеродной цепи) между полимером и нитрофурановым фрагментом повышает антимикробное действие синтезированных образцов.

В связи с этим целью нашей работы был синтез и изучение антимикробной активности N-арилиденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты, в которых углеродная цепь между полимером и нитрофурановым фрагментом на $(-CH_2-)$ -группу больше, чем в гидразидах карбоксиметилальгиновой кислоты, и на $(-C_2H_4-)$ -группу больше, чем в гидразидах альгиновой кислоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали альгиновую кислоту (CAS № 9005-32-7, Acros Organics, США). При помощи гель-хроматографии на колонке K-16/40 («РЕАНАЛ», Венгрия) (1,6×40 см) с сефадексом марки G-200 (CAS № 9041-36-5, Sigma Aldrich, США) было установлено [3], что она состоит из полисахаридных фракций с молекулярной массой до 200000 Да, которые в целом сохраняются после алкилирования. Содержание карбоксильных групп после переосаждения – 97%, а после очистки водной щелочью – 100%.

Синтез N-бензилиденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты

100 мг гидразида карбоксиэтилальгиновой кислоты растворяли в 1 мл 0,2 н. раствора уксусной кислоты, а затем добавляли раствор альдегида (1–5 моль на моль гидразидных групп) в 1 мл этанола. Реакционную массу перемешивали в плоскодонной конической колбе на магнитной мешалке AREC.T (VELP SCIENTIFICA, Италия) в течение 1 ч при температуре 40 °С, после чего полисахарид осаждали этиловым спиртом. Полученный осадок растворяли в 2 мл дистиллированной воды, водной щелочью доводили pH до 8, продукт осаждали, центрифугировали в течение 3 минут при 8 тыс. оборотов в минуту и промывали спиртом. Затем сушили в вакууме (20–25 мм рт. ст.) в течение 4 ч без нагрева.

Строение полученных соединений доказано ИК- и УФ-спектроскопией [4].

Метод определения антимикробной активности

Противомикробную активность изучали на кафедре микробиологии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава РФ. В качестве тест-культур были использованы *Staphylococcus aureus* штамм ATCC 6538-P, *Escherichia coli* штамм ATCC 25922, а также *Candida albicans* штамм ATCC 885-635. Изучение антимикробной активности проводили методом двухкратных серийных разведений в жидких питательных средах: для антибактериального действия использовали мясо-пептонный бульон, а для определения противогрибкового действия – среду Сабуро.

Исходные растворы N-арилиденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты готовили в воде.

Для приготовления взвеси тест-микроорганизмов использовали двухсуточные культуры, выращенные на мясопептонном агаре и на плотной питательной среде Сабуро для дрожжевых грибов. Взвесь готовили по стандарту мутности Мак-Фарланда ($2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл), затем суспензию разводили и вносили по 0,1 мл в каждую пробирку. Концентрация микробных клеток в опытах составляла 10^5 КОЕ на мл для бактерий и 10^4 КОЕ на мл для дрожжевых грибов.

Время инкубации для *St. aureus*, *E. coli* – 18–24 ч при 37 °С, для *C. albicans* – 24–48 ч при 24 °С. В качестве контроля использовали питательную среду без образца с внесенной исследуемой культурой. Наличие или отсутствие роста тест-микроорганизмов оценивали визуально по помутнению среды. Для определения микрообидного и микростатического действия проводили высеив на плотные питательные среды. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали наименьшую концентрацию препарата, вызывающего задержку размножения (МИК_{ст}) или гибель тест-культуры (МИК_д). Активность N-арилиденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты выражали в пересчёте на содержание введённого фрагмента. В качестве образца сравнения был использован препарат ряда производных нитрофурана – фурацилин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Объектами микробиологического исследования являлись N-арилиденгидразиды карбоксиэтилальгиновой кислоты (КЭАК) с различными степенями замещения, полученные по схеме, разработанной в СПХФУ авторами статьи [4].

Амид карбоксиэтилальгиновой кислоты (КЭАК) (**2**) получали алкилированием альгиновой кислоты (**1**) акриламидом в диоксане в присутствии тетраметилламмония гидроксида, как описано в работе [5]. Гидразид КЭАК (**3**) синтезировали по разработанной ранее методике [6] нагреванием образовавшегося амида с гидразином гидратом при 40 °С в течение 12 ч.

Для получения гидразонов (**4**) к натриевой соли гидразида в уксусной кислоте прибавляли 1-5-кратный избыток этанольного раствора 5-нитрофурфуrolа или β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина, реакционную массу перемешивали при 40 °С в течение 1 ч [4]. Продукт осаждали этиловым спиртом, переосаждали из воды этанолом и сушили в вакууме без нагрева в течение 4 ч.

Синтезированные вещества характеризовали процентным содержанием 5-нитрофуранового фрагмента. Все синтезированные образцы хорошо растворимы в воде в отличие от препаратов нитрофуранового ряда, что облегчает их дальнейшее использование.

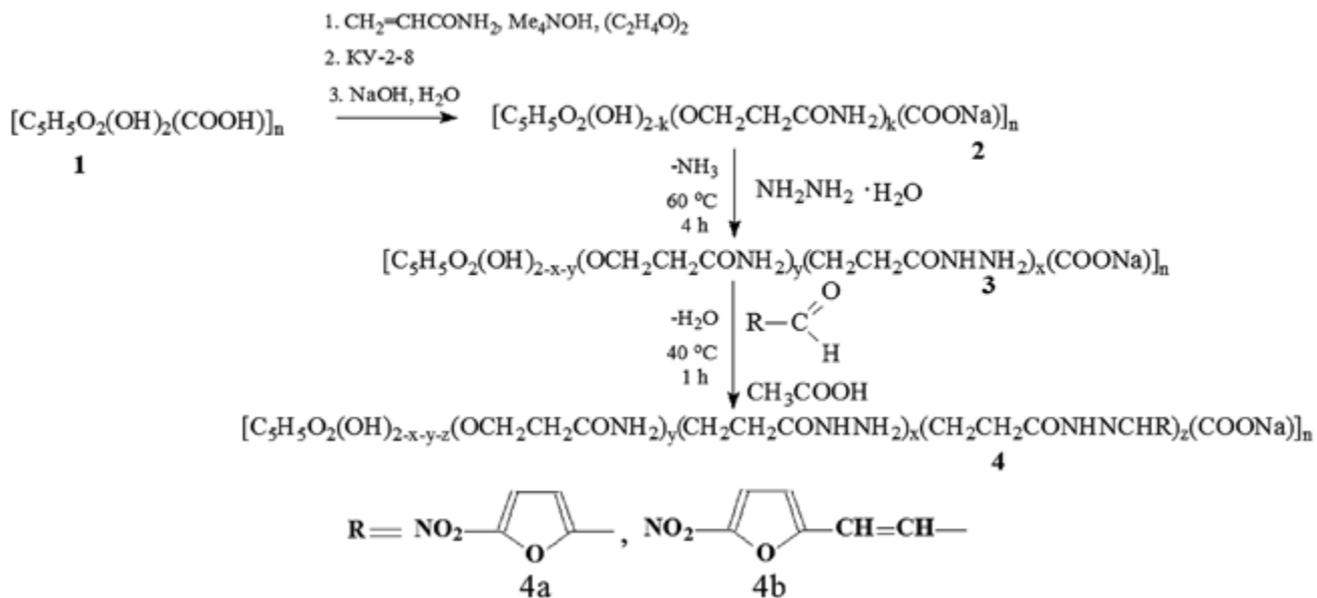


Рисунок 1. Схема химической модификации альгиновой кислоты

Микробиологический анализ исходных гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты, на основе которых были синтезированы полимерные ацилгидразоны биологически активных альдегидов, показал, что данные соединения не подавляют рост выбранных тест-микроорганизмов.

Введение в молекулу карбоксиэтилальгиновой кислоты 5-нитро-2-фурильного фрагмента привело к появлению у полисахарида антимикробной активности, однако её спектр действия и минимальные ингибирующие концентрации (МИК) несколько отличаются от активности фурацилина (таблица 1). Так, синтезированные гидразоны 5-нитрофурацила обладают микростатическим эффектом в отношении *St. aureus*, сопоставимым с препаратом сравнения, а вот микробицидное действие снижается от 4 до 10 раз. Они неактивны в отношении грамотрицательных бактерий *E. coli*, зато обладают слабо выраженным противогрибковым действием в отношении *C. albicans*. Их фунгистатическая концентрация (МИК_{СТ}) до 4,5 раз ниже, чем фурацилина. Кроме того, образцы проявляют слабую фунгицидную активность, которая отсутствует у препарата сравнения.

Синтезированные образцы ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина оказались значительно более активными, чем ацилгидразоны 5-нитрофурацила. Они имеют бактерицидный и бактериостатический эффект в отношении *St. aureus*, превосходящий препарат сравнения в 2 раза (рисунок 2). В отношении *E. coli* данные соединения обладают меньшей активностью (МИК_Ц=7,2 мкг/мл), чем фурацилин (МИК_Ц=5,7 мкг/мл), при этом пропадает статический эффект. В отличие от фурацилина, который обладает только слабым фунгистатическим действием, синтезированные

нами полимеры проявляют высокую противогрибковую активность по отношению к *C. albicans*, фунгистатическое и фунгицидное действие которых достигает 1,5 и 3,0 мкг/мл соответственно (рисунок 3).

Таблица 1.

Антимикробная активность N-арилиденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты

Образец	Содержание активного вещества, масс. %	Тест-микроорганизмы					
		<i>St. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>C. albicans</i>	
		МИК _{СТ} мкг/мл	МИК _Ц мкг/мл	МИК _{СТ} мкг/мл	МИК _Ц мкг/мл	МИК _{СТ} мкг/мл	МИК _Ц мкг/мл
Гидразид КЭАК		Неактивен в отношении выбранных тест-культур					
Фурацилин		2,8	5,7	2,8	5,7	>500	-
4a	8,1	2,5	20,3	Неактивны в отношении <i>E. coli</i>		81	162
	9,3	2,8	23,3			93	186
	11,4	7,2	28,5			114	228
	12,8	16,0	32,0			128	256
	13,8	25,6	51,2			138	276
4b	11,6	0,9	1,9	-	7,2	1,5	3,0
	13,2	1,0	2,0	-	6,9	3,4	6,9
	13,3	1,5	3,1	-	6,9	3,8	7,6
	13,4	1,9	3,8	-	6,9	3,6	7,3
	14,1	1,8	3,6	-	6,9	3,5	6,9

Возможно, высокая противогрибковая активность связана с изменением транспорта активного вещества в микробную клетку либо с наличием этениленового (-CH=CH-) фрагмента, который присутствует также в

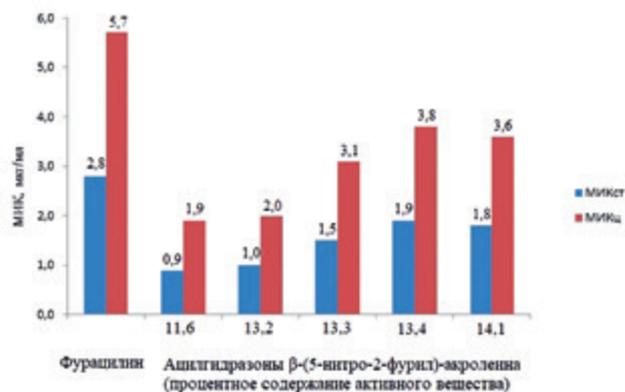


Рисунок 2. Бактериостатическое и бактерицидное действие ацилгидразонов β-(5-нитрофурил)-акролеина по отношению к *St. aureus*

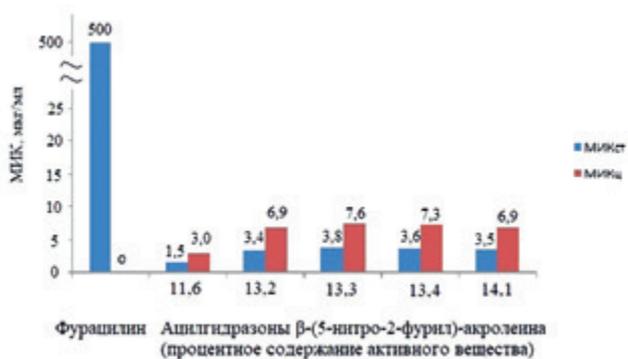


Рисунок 3. Фунгистатическое и фунгицидное действие ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина по отношению к *C. albicans*

нитрофурилене. Данный препарат обладает высокой фунгистатической активностью в отношении патогенных грибов, сочетающейся с выраженным антибактериальным действием, но из-за своей токсичности снят с регистрационного учета. В связи с этим можно предположить, что антимикотическая активность синтезированных образцов, так же как и у нитрофурилена, обусловлена ингибирующим действием на ферменты, участвующие в клеточном дыхании грибов.

При исследовании активности полимерных гидразонов 5-нитрофурурола и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина оказалось, что с увеличением содержания нитрофуранового фрагмента в полисахариде повышается минимальная ингибирующая концентрация. Эта закономерность прослеживается в отношении всех тест-микроорганизмов. Например, при увеличении в гидразонах β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина содержания активного вещества с 11,6 до 14,1% МИК₅₀ повышается с 1,9 до 3,6 мг/мл в отношении *St. aureus* и с 3,0 до 6,9 мг/мл в отношении *C. albicans*. Аналогичная ситуация наблюдалась и в случае 5-нитрофуруриленгидразидов карбоксиметилхитина [7] в отношении бактерий *St. aureus* и *E. coli*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведенные исследования показали, что полученные нами полимерные гидразоны 5-нитрофурурола и β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина обладают антимикробной активностью и в отличие от препаратов нитрофуранового ряда хорошо растворимы в воде.
2. Синтезированные образцы ацилгидразонов β-(5-нитро-2-фурил)-акролеина обладают высокой фунгицидной и фунгистатической активностью и в 2 раза превосходят препарат сравнения в отношении грамположительных бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кукес В. Г. Клиническая фармакология. – М.: ГЭОТАР-Медиа. 2015. 1024 с. [Kukes V. G. Klinicheskaya farmakologiya. [Clinical Pharmacology.]– М.: GEOTAR-Media. 2015. 1024 s.]
2. Серебренникова Е. С., Давыдова В. Л., Гурина С. В., Иожен А. А. Изучение антимикробной активности некоторых производных альгиновой кислоты // Проблемы медицинской микологии. 2013. Т. 15. № 4. С. 60–62. [Serebrennikova E. S., Davydova V. L., Gurina S. V., Iozep A. A. Izuchenie antimikrobnoi aktivnosti nekotorykh proizvodnykh al'ginovoi kisloty // Problemy meditsinskoj mikologii. [The study of the antimicrobial activity of some alginic acid derivatives // Problems of Medical Mycology.] 2013. T. 15. № 4. S. 60–62.]
3. Серебренникова Е. С., Мороз М. С., Черёмушкин А. И., Иожен А. А. Реакции карбоксиметилальгиновой кислоты с некоторыми N-нуклеофилами // Бултеровские сообщения. 2012. Т. 31. № 7. С. 18–23. [Serebrennikova E. S., Moroz M. S., Cheremushkin A. I., Iozep A. A. Reaktsii karboksimetilal'ginovoi kisloty s nekotorymi N-nukleofilami // Butlerovskie soobshcheniya. [Reactions of carboxymethyl alginic acid with some N-nucleophiles // Butlerov Communications.] 2012. T. 31. № 7. S. 18–23.]
4. Тарадейко Т. И., Галашева С. Н., Кутькина Д. Н., Щенникова О. Б., Иожен А. А. Синтез N-арилденгидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018. № 2(23). С. 90–94. [Taradeiko T. I., Galasheva S. N., Kut'kina D. N., Shchennikova O. B., Iozep A. A. Sintez N-arilidengidrazidov karboksietilal'ginovoi kisloty. [Synthesis of N-arylidenehydrazides of carboxyethylalginic acid.] // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. 2018. № 2(23). S. 90–94.]
5. Тарадейко Т. И., Седелкина Т. М., Тарасова Т. А., Иожен А. А. Алкилирование альгиновой кислоты акриламидом // ЖОХ. 2016. Т. 86. Вып. 8. С. 1345–1349. [Taradeiko T. I., Sedelkina T. M., Tarasova T. A., Iozep A. A. Alkilirovanie al'ginovoi kisloty akrilamidom. [Alkylation of alginic acid with acrylamide.] // ZhOkh. 2016. T. 86. Vyp. 8. S. 1345–1349.]
6. Тарадейко Т. И., Седелкина Т. М., Галашева С. Н., Иожен А. А. Синтез гидразидов карбоксиэтилальгиновой кислоты // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2017. № 3(20). С. 110–114. [Taradeiko T. I., Sedelkina T. M., Galasheva S. N., Iozep A. A. Sintez gidrazidov karboksietilal'ginovoi kisloty [Synthesis of carboxyethylalginic acid hydrazides.] // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. 2017. № 3(20). S. 110–114.]
7. Дударев В. Г., Тихомирова О. М., Иожен А. А. Синтез и противомикробная активность производных карбоксиметилхитина // Хим.-фарм. журнал. 2013. Т. 47. № 1. С. 32–35. [Dudarev V. G., Tikhomirova O. M., Iozep A. A. Sintez i protivomikrobnaya aktivnost' proizvodnykh karboksietilkhitina [Synthesis and antimicrobial activity of carboxymethyl-chitin derivatives.] // Khim.-farm. zhurnal. 2013. T. 47. № 1. S. 32–35.]