

УДК 547.792.2.+547.556.+547.789.

Г.М. КОВАЛЬ<sup>1</sup>, М.М. ФІЗЕР<sup>2</sup>, М.В. СЛИВКА,<sup>2</sup> А.О. КРИВОВ'ЯЗ<sup>2</sup>, В.Г. ЛЕНДЕЛ<sup>2</sup>  
*Ужгородський національний університет, медичний факультет, кафедра мікробіології, вірусології, імунології з курсом інфекційних хвороб<sup>1</sup>; хімічний факультет, кафедра органічної хімії<sup>2</sup>. Ужгород*

### БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ НОВИХ Se-, Te-ВМІСНИХ ТРИАЗОЛІВ

У новосинтезованих селен, телур-вмісних триазолів виявлено високий бактерицидний ефект по відношенню до тестованих мікроорганізмів, завдяки чому вони можуть бути запропоновані для подальшого доклінічного вивчення з можливістю їх використання в практичній охороні здоров'я та ветеринарії.

**Ключові слова:** протимікробна дія, скринінг новосинтезованих органічних сполук, дезорганізація структурних мембран

**Вступ.** У сучасних умовах однією з найбільш важливих проблем хімії та медицини залишається пошук нових препаратів для підвищення ефективності лікування опортуністичних інфекцій. Пошук нових синтетичних протимікробних речовин базується переважно на скринінгу *in vitro* великих масивів хімічних сполук по відношенню до невеликої кількості потрібних видів біологічної активності.

**Мета дослідження.** Вивчити бактерицидну та бактериостатичну дію новосинтезованих Se-, Te-вмісних триазолів та порівняти їх дію з антибіотиками.

**Матеріали та методи.** Як базовий метод синтезу цільових тіазолотриазолів було обрано електрофілну циклізацію, використовуючи розчини галогенідів у відповідних галогеноводневих кислотах. Структури отриманих сполук підтверджували елементним аналізом та спектральними методами [5, 11]. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків та хімічних сполук проводили методом паперових дисків [4]. Після посіву тест-культури на агар наносили диски з фільтрувального паперу, просочені новосинтезованими речовинами та диски з антибіотиками. Після інкубації при 37 °С проводили визначення діаметру зони затримки росту. Розміри зон, одержані в досліді, порівнювали з величинами зон затримки росту, вказаних в інструкціях, виділені мікроорганізми відносили до чутливих, помірно-чутливих та резистентних.

**Результати досліджень та їх обговорення:** В ході проведення експерименту було досліджено новосинтезовані органічні сполуки на антимікробну активність на тест-культурах, механізм дії яких полягає в дезорганізації структур мембран мікроорганізмів. Отримані дані дозволили визначити найбільш ефективні зразки щодо досліджених мікроорганізмів та їх специфічність до вибраних тест-об'єктів.

Об'єктами дослідження було обрано речовини, які містять конденсовану гетероциклічну систему [1,3]тіазоло[2,3-с][1,2,4]триазолу. Це зумовлено тим, що в ряді робіт [1-5, 13] було показано, що

похідні тіазолотриазолу проявляють протимікробну, антигрибкову та протизапальну дію. Також в останні роки все більше досліджень проводять в сфері елементорганічних біологічно активних сполук, зокрема, дедалі активніше розвивається органічний синтез халькогенвмісних сполук, а саме – селену та телуру [8-10]. Досліджуючи біоактивність цих речовин, у ряді робіт відзначено значну протимікробну дію похідних селену [6, 13] та фунгіцидну дію [10, 13], протимікробну активність телур-карбонових кислот [13], а також синтезовано речовини з яскраво вираженою протівірусною активністю, які містять в своєму складі атом телуру [8]. Враховуючи ці дані, ми вирішили синтезувати сполуки, що одночасно містять і систему тіазолотриазолу і атом селену телуру у своєму складі. Одночасна присутність двох фармакоформних груп мала б призвести до посилення біоактивності, за рахунок синергічної дії структурних елементів органічної молекули та одержання нових високоактивних антибактеріальних речовин.

За даними літератури [1-4], новосинтезовані препарати мають ряд переваг над природними антибіотичними речовинами:

а) виключається виникнення стійкості через перехресне перенесення генетичної інформації між мікроорганізмами;

б) оскільки речовини є синтетичними, вони можуть містити кілька функціональних груп, які тільки підсилюють антимікробні властивості отриманої субстанції;

в) клітині мікроорганізму значно важче виробити специфічні засоби захисту, такі як модифікація структури антибіотичної речовини чи зміна власних структурних компонентів, що позбавить антибіотик мішені біологічної дії.

Як базовий метод синтезу цільових тіазолотриазолів було обрано електрофілну циклізацію – цей метод дедалі більше досліджується і дає змогу одержувати найрізноманітніші поліконденсовані гетероциклічні системи [10]. Раніше було показано, що при дії електрофілних реагентів на алкенил-заміщені 1,2,4-триазол-3-тіони утворюються

похідні [1,3]тіазоло[2,3-с][1,2,4] триазолу [6]. Тому, як вихідні речовини використовували алкєнільні похідні 5-аміно-1,2,4-триазол-3-тіону, які синтезували за описаними раніше методиками [14].

Було проведено серію досліджень можливості циклізації алільного фрагменту під дією галогенідів селену та телуру (рис.1). Використовували

розчини галогенідів у відповідних галогеноводневих кислотах. Продуктами даної реакції є конденсовані селено- (чи телуро-) вмісні системи тіазоло-триазолу 2, 3. Реакцію проводили в оцтовій кислоті, ацетонітрилі та етилацетаті, для кожного випадку виходи різняться в залежності від розчинника, часу проведення реакції та природи халькоген галогеніду.

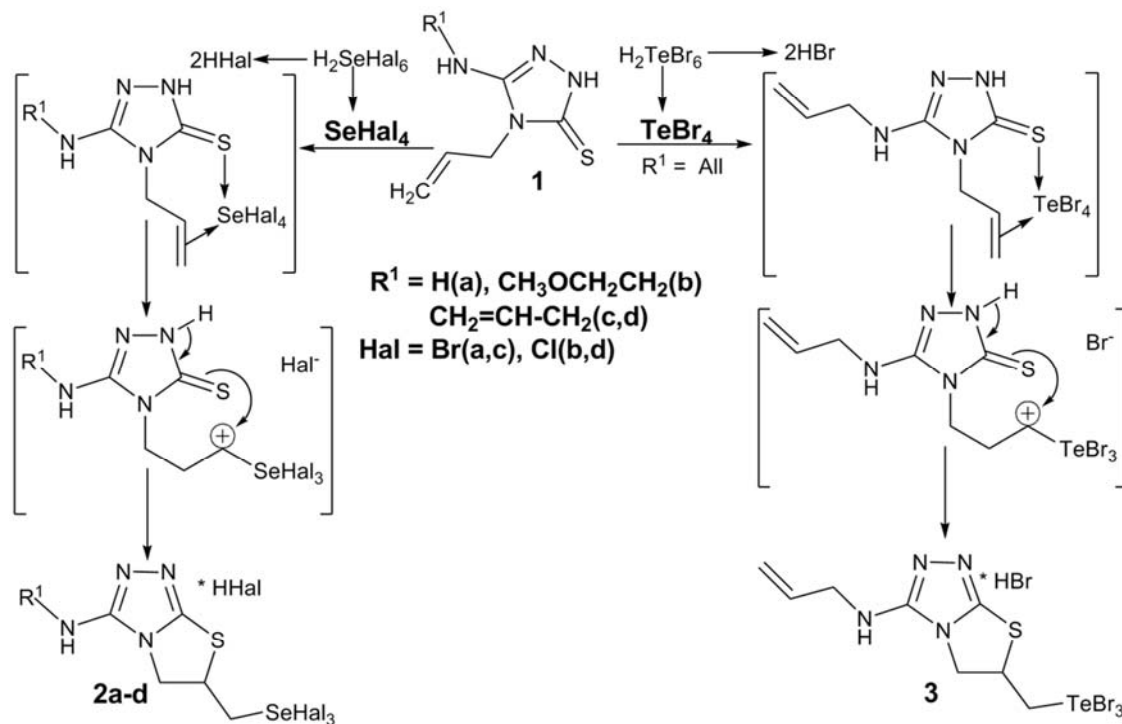


Рис. 1. Циклізація алільного фрагменту під дією галогенідів селену та телуру.

Реакція циклізації проходить через стадію активації Карбон-Карбонового  $\pi$ -зв'язку, через координування до молекули халькоген галогеніду, з послідовним перегрупуванням  $\pi$ -комплексу та утворенням карбкатиону, який атакує атом Сульфуру з утворенням тіазольного циклу.

Структури отриманих сполук підтверджували елементним аналізом та спектральними методами. Зокрема, у спектрі ПМР сполуки 2с чітко видно сигнали алільного фрагменту аліламінового замісника, що вказує на селективність проходження реакції циклізації за участю алкєнільного фрагменту, що безпосередньо з'єднаний з триазольним циклом, і утворення конденсованої системи [1,3]тіазоло[2,3-с][1,2,4]триазолу. Проходження циклізації саме по атому Сульфуру, а не по атому Нітрогену, в 5-аміно-1,2,4-триазол-3-тіонах, було показано в ряді робіт [11, 14], що зумовлено значно більшою нуклеофільністю атома Сульфуру. Також в спектрі ПМР чітко спостерігаються мультиплети двох метиленових та однієї метинової груп, тобто спостерігається класична спінова си-

стема  $A_2BX_2$ . Аналогічна картина розщеплень була раніше описана для ізомерних об'єктів [8, 9].

Нами для дослідження впливу новосинтезованих сполук на проникність бактеріальної мембрани були обрані з музею кафедри мікробіології, вірусології, імунології УжНУ такі культури бактерій: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Salmonella derby*, *Enterobacter faecalies*, та *Actinomicetes israelie*, дріжджові гриби *Candida albicans*.

Відомо, що за складом мембрани бактеріальних клітин – ліпопротеїдні структури, в які включені молекули білка. Ліпіди, що утворюють бімолекулярний шар, є структурною основою мембран. У мембранах мікроорганізмів найбільш широко представлені гліколіпіди. У бімолекулярний шар включені білки, набір яких визначає властивості й специфіку функціонування мембрани. Товщина мембрани становить 6-8 нм [2]. Мембрани виконують ряд функцій, основними з яких є такі:

а) реакція на зміни, що відбуваються у зовнішньому середовищі, і передача інформації всередину клітини;

б) регуляція внутрішньоклітинного вмісту, що пов'язана з активним викидом продуктів метаболізму або сторонніх речовин, що проникли через мембрану, а також нагромадженням у клітині субстратів метаболізму. Перенос (транспорт) речовин через цитоплазматичну мембрану може здійснюватися трьома основними шляхами: пасивна дифузія, полегшена дифузія, енергозалежний транспорт.

Надходження антибіотиків у клітину мікроорганізмів – процес активного транспорту. Варто підкреслити, що на транспортні потреби бактеріальна клітина витрачає в середньому 20 – 30 % енергії, утвореної в процесі обміну речовин. Накопичення всередині клітин мікроорганізмів антибіотика – неметаболізуючого інгібітора пояснюється тим, що антибіотики "користуються" транспортними системами, призначеними для переносу звичайних метаболітів, "підмінюючи" останні. Така "підміна" можлива завдяки певній хімічній подібності антибіотиків і нормальних продуктів обміну [4]. Антибіотичні речовини, які діють на цитоплазматичну мембрану, можна розділити на три групи: речовини, що викликають дезорганізацію структури мембран, антибіотичні речовини – іонофори сполуки, які інгібують пов'язаний з мембраною білок (фермент), що бере участь у процесах транспорту. До антибіотичних речовин, що викликають дезорганізацію структури мембран входять граміцидин С, поліміксини, полієни. Граміцидин С – антибіотик, що порушує організацію ліпопротеїдних систем і проникність клітин, створювану мембраною. Ступінь цих порушень залежить від концентрації антибіотика. Граміцидин повільно знижує поверхневий натяг. Він може вступати у зв'язок із клітинними мембранами. В основі механізму біологічної дії граміцидину С лежить порушення ним стану й функціонування мембран клітин у результаті зв'язування антибіотика з мембранними компонентами. Це викликає, з одного боку, зміну проникності мембран і швидко втрачує клітинами життєво важливих з'єднань типу нуклеотидів, неорганічного фосфору, амінокислот, а з іншого боку – пригнічення процесу енергетичного обміну, особливо його початкової стадії – дегідратування. Граміцидин С інгібує активність ряду ферментів, локалізованих у мембрані.

Поліміксини – речовини, які зв'язуються з мембраною бактеріальної клітини й порушують її нормальну функцію. Під впливом антибіотиків цієї групи при відносно невисоких концентраціях відбувається вихід із клітин низькомолекулярних речовин (фосфору, пентоз) і розпад нуклеїнових кислот. Ці антибіотики володіють високою біологічною активністю у відношенні до грамнегативних

бактерій. Показано, що протопласти багатьох грам-позитивних бактерій чутливі до дії поліміксинів [2].

Поки немає достовірних даних про точну мішень дії поліміксинів у клітинах чутливих до них мікроорганізмів [7]. Встановлено, що рецепторами цих антибіотиків можуть бути фосфоліпіди, у результаті взаємодії з якими поліміксини викликають дезорганізацію структури мембран. Поліміксини використовують як своєрідну систему для вивчення взаємодії антибіотик-мембрана *in vivo*.

Полієнові антибіотики (ністатин, рімоцидин, філіпін, ендоміцин, кандіцидин, трихоміцин) – біологічно активні речовини, здатні змінювати проникність клітин, чутливих до їхньої дії. Як відомо, проникність клітини залежить насамперед від цитоплазматичної мембрани [1, 7]. Специфічна токсичність полієнових антибіотиків обумовлена їхньою взаємодією з одним із компонентів цитоплазматичної мембрани чутливих клітин, що належать до стеринів. У результаті міняється селективність проникності мембран, що призводить до виходу із клітини найважливіших метаболітів і порушення здатності мембран контролювати засвоєння поживних речовин.

Всі полієнові антибіотики пригнічують розвиток еукаріотичних організмів (грибів, водоростей), що містять у своїх мембранах стерини. Полієни викликають лізис протопластів і еритроцитів. Важливо відзначити, що досліджувані новосинтезовані речовини не можна віднести до антибіотиків, оскільки ми не проводили спеціальних досліджень. Ще складнішим є завдання точного визначення мішені в клітині мікроорганізму, що базувалося б не на комп'ютерному прогнозі, а на експериментальних даних. Тому припущення щодо специфіки протимікробної дії новосинтезованих хімічних сполук ми робили за зонами затримки росту мікроорганізмів та грибів дифузійним методом. Висів проводили на середовище МПА, Сабуро. Для визначення активності досліджуваних сполук за діаметрами зон затримки росту бактерій та грибів використовували їх розчини різної концентрації. Через дві доби вирощування в термостаті при температурі 37°C вимірювали діаметри зон затримки росту бактерій за допомогою лінійки. Для визначення діаметрів зон затримки росту використовували розчини з концентрацією досліджуваної речовини 1 мг/мл, оскільки саме при цій концентрації, в разі високої активності, сполуки доцільно розглядати як активні складові антибактеріальних засобів. Тобто, ми шукали таку речовину, яка б мала найвищу протимікробну активність до широкого спектру мікроорганізмів за мінімальних концентрацій. Результати досліджень наведено у діаграмах, що показують дію синтезованих сполук на мікроорганізми (рис.2).

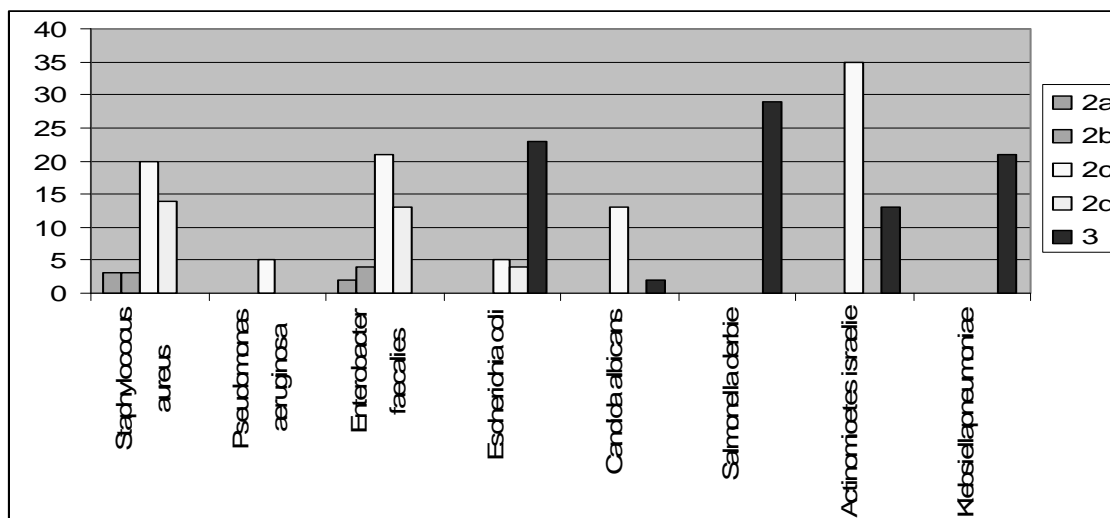


Рис. 2. Біологічна активність синтезованих сполук 2a-b, 3.

За хімічною структурою протимікробні речовини 2a-b, 3 показали високу активність – одночасно містять і систему тіазолотриазолу і атом селену телуру у своєму складі. Можна зробити припущення, що вони, а також аліламіновий фрагмент впливає на проникність (розчинність) речовини в ліпідному шарі мембрани, що і призводить до дезорганізації цитоплазматичної мембрани.

#### Висновки.

1. Пошук по доступних базах хімічних сполук з біологічною активністю (MDL), що одночасно

містять і систему тіазолотриазолу і атом селену чи телуру не дав результату, тобто антибактеріальна і фунгіцидна активність таких сполук не була раніше описана.

2. Таким чином, на основі проведеного дослідження встановлено, що сполуки 2c, 3 проявили максимальну протимікробну активність.

3. Для прояву антибактеріальної та фунгіцидної активності, окрім селену, телуру-органічної компоненти, також важлива наявність у сполуках 2c, 3 аліламінового фрагменту.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Поройков В.В. Компьютерный прогноз биологической активности химических соединений как основа для поиска и оптимизации базовых структур новых лекарств. / В.В.Поройков, Д.А. Филимонов // В сб.: Азотистые гетероциклы и алкалоиды. — М.: Иридий-пресс. — 2001. — Т.1. — С. 123—129.
2. Русецкая Н.Ю. Антибактериальное действие фторсодержащего селеноорганического препарата на клинические штаммы *Staphylococcus aureus* / Н.Ю. Русецкая, Д.П. Димидов, А.В. Саратовцев, И.А., Бородулин // Биологические науки. Фундаментальные исследования. — 2013. — № 6. — С. 1432—1435.
3. Сазыкин Ю.О. Антибиотики как ингибиторы биохимических процессов. — М.: Наука, 1968. — 447 с.
4. Сидоренко С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С.В. Сидоренко, И.В. Тишков // Успехи биохимии. — М., 2004. — Т.44. — С. 263—363.
5. Фізер М.М. Взаємодія тетрагалогенідів телуру й селену із 3-алілтіо-4,5-дифеніл-1,2,4-триазолом / Фізер М.М., Сливка М.В., Усенко Р.М. [та ін.] Вісник Ужгородського національного університету. Серія: Хімія. — 2008. — Вип. 19. — С. 20—26.
6. Фізер М.М. Синтез й біологічна активність похідних 5-аміно-1,2,4-триазол-3-тіону / М.М. Фізер, О.Т Девіняк, М.В. Сливка [та ін.] // Матеріали XXIII Української конференції з органічної хімії (Чернівці, 16-20 вересня 2013р.) — Чернівці : Чернівецький нац. ун-т, 2013. — С. 259.
7. Яковлев С.В. Клиническая химиотерапия бактериальных инфекций. — М.: Ньюдиамед, 1996. — 120 с.
8. Abdel-Hafez Sh. H. Synthesis of Novel Selenium Containing Sulfa Drugs and Their Antibacterial Activities // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. — 2010. — Vol. 36, № 3. — P. 370—376.
9. Barbuceanu S.-F. Synthesis, characterization and evaluation of antibacterial activity of some thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazole incorporating diphenylsulfone moieties // European Journal of Medicinal Chemistry. — 2009. — Vol. 44. — P. 4752—4757.
10. Jakhar K. A green synthesis and antibacterial activity of 2-aryl-5-(coumarin-3-yl)-thiazolo[3,2-b][1,2,4]triazoles / K. Jakhar, J. Makrandi // Indian Journal of Chemistry. — 2012. — Vol. 51B. — P. 1511—1516.
11. Fizer M., Slivka M., Rusanov E., Turov A., Lendel V. [1,3]Thiazolo[2',3':3,4][1,2,4]triazolo [1,5-a]pyrimidines — a New Heterocyclic System Accessed via Bromocyclization./M. Fizer, M. Slivka, E. Rusanov [et al.] // Journal of Heterocyclic Chemistry. — 2013. on-line.

12. Khripak S.M., Regioselectivity of the monohalogenation of 4-allyl-3-allylamino-1,2,4-triazole-5-thione / S.M. Khripak, M.V. Slivka, R.V. Vilkov [et all.] // Chemistry of Heterocyclic Compounds. — 2007. — Vol. 43, № 6. — P. 781—785.

13. Młochowski J. Developments in the chemistry of selenaheterocyclic compounds of practical importance in synthesis and medicinal biology // ARKIVOC. — 2007. — Vol. 6. — P. 14—46.

14. Usenko R.M. Electrophilic heterocyclization of 4,5-disubstituted 3-allylthio-4H-1,2,4-triazoles by the action of halogens/ R.M. Usenko, M.V. Slivka V.G. Lendel // Chemistry of Heterocyclic Compounds. — 2011. — Vol. 47, № 8. — P. 1029—1036.

G.M. KOVAL<sup>1</sup>, G.M. FIZER, G.M. SLIVKA, A.O. KRIVOVJAZ V.G. LENDEL

*Uzhhorod National University, Department of Microbiology, Virology, Immunology with the Course of Infectious Diseases, Department of Organic Chemistry, Uzhhorod*

#### SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF NOVEL SE-, TE- CONTAINING THIAZOLOTRIAZOLE DERIVATIVES

The selenium-, tellurium containing thiazolo-s-triazoles were synthesized. They had exhibit bactericidal effect and can be offered for further pre-clinical study to determine the possibility of their use in practical public health and veterinary medicine.

**Key words:** antimicrobial activity, screening of new synthesized organic compounds, membrane integrity antagonist

**Стаття надійшла до редакції: 2.10.2013**