

## Протимікробна активність N-[2-ариламіно-2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)етил]бензамідів та її зв'язок з молекулярною структурою

С.В.Колісник, О.М.Свечнікова, О.О.Алтухов, О.С.Криськів

Національний фармацевтичний університет, кафедра аналітичної хімії,  
Харківський національний педагогічний університет ім. Г.С.Сковороди, кафедра хімії  
Харків, Україна

Проведено мікробіологічні дослідження 12 синтезованих N-[2-ариламіно-2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)етил]бензамідів. Встановлено кількісні закономірності «структура — дія» в цьому гомологічному ряду сполук на основі проведення кореляції теоретично розрахованих значень logP з результатами вивчення протимікробної дії.

**Ключові слова:** протимікробна активність, ліпофільність, кореляція, оксаміди.

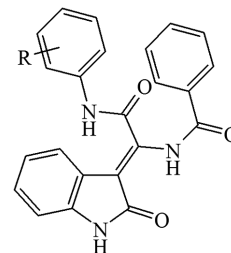
### ВСТУП

Понад півстолітній досвід хіміотерапевтичного впровадження в клінічну інфектологію антибіотиків переконливо довів, що, поряд з безперечною ефективністю, безконтрольне або ірраціональне за схемами і дозами використання цих препаратів закономірно супроводжується прогресуючим зростанням побічних ефектів. При цьому особливу занепокоєність викликає розвиток лікарськостійких варіантів збудників, що знаходить негативне відображення в ефективності здійснюваного лікування [7].

У зв'язку із цим одним із перспективних напрямів в удосконаленні та розвитку антибіотикотерапії XXI сторіччя визнано послідовне замісне впровадження в клінічну медицину препаратів з вираженими антисептичними

властивостями. До їх переваг відносять комплексні ефекти в притаманних механізмах дії на мікробну клітину, незалежність рівнів активності від показників лікарської стійкості збудників, переважну або вибірккову мікробоцидну дію на мікробну клітину. Саме із цим пов'язані перспективи попередження і подолання антибіотикорезистентності. Сучасна номенклатура антимікробних засобів орієнтована на впровадження саме таких препаратів, серед яких підтверджена клінічна активність похідних четвертинних амонієвих та фосфонієвих сполук, фторохінолонів, цефалоспоринів тощо [9-11].

За прогностичним аналізом, перспективними антимікробними фармакофорами є похідні 2-оксоіндолу. Тому дослідження антимікробних властивостей *in vitro* 12 вперше синтезованих N-[2-ариламіно-2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)етил]бензамідів 1-12 [3] загальної формули:



де R = 2-Br (1); 3-Br (2); 4-Br (3); 2-Cl (4); 3-Cl (5); 4-Cl (6); 2,5-Cl<sub>2</sub> (7); 2-F (8); 3-F (9); 4-F (10); 2,4-F<sub>2</sub> (11); 2-OH, 4-Cl (12)

та встановлення зв'язку «структура — антимікробна дія, мають безперечний теоретичний та практичний інтерес. Тим більше, що в літературі такі дані відсутні.

ТАБЛИЦЯ 1

**Антимікробна активність та розраховані logP  
N-[2-ариламіно-2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)етил]бензамідів 1-12**

Сполука	logP	Діаметри зон затримки росту, мм, середні з трьох значень				
		S.aureus ATCC 26923	E.coli ATCC 25922	P.aeruginosa ATCC 27853	P.vulgaris ATCC 4636	B.subtilis ATCC 6633
1	2,7558	15,33	12,33	0,00	0,00	15,33
2	2,7558	16,33	14,67	12,33	12,33	15,33
3	2,7558	16,33	14,00	0,00	0,00	16,33
4	2,4851	16,00	16,33	13,33	12,67	16,00
5	2,4851	14,67	14,33	0,00	0,00	16,67
6	2,4851	12,67	14,67	12,67	0,00	16,33
7	3,0433	12,67	13,00	0,00	0,00	15,67
8	2,0850	12,67	13,33	0,00	12,00	16,00
9	2,0850	14,33	13,33	12,33	12,00	16,33
10	2,0850	14,33	14,33	13,33	12,33	15,33
11	2,2431	15,67	15,67	14,33	13,00	16,33
12	2,0956	21,67	20,33	15,33	15,00	21,33

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Методики синтезу та доведення структури сполук 1-12 описані С.В.Колісником та співавт. [3].

Мікробіологічні дослідження сполук 1-12 проводили в лабораторії біохімії мікроорганізмів та поживних середовищ Інституту мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова АМН України, згідно з рекомендаціями ДФУ [5, 6].

Концентрація досліджуваних зразків — 15,0 мкг/мл.

Для оцінки активності препаратів використовували тест-штами S.aureus ATCC 26923, E.coli ATCC 25922, P.aeruginosa ATCC 27853, B.subtilis ATCC 6633, P.vulgaris ATCC 4636. Мікробне навантаження — 10<sup>7</sup> мікробних клітин на 1 мл середовища встановлювалось за стандартом McFarland. У роботу брали 18-24-годинну культуру мікроорганізмів.

Для досліджень використовували агар Мюллера-Хінтона (Дагестанський НДІ поживних середовищ, придатність середовища до ХІІ 2011 р.).

Метод дифузії препарату в агар проводили методом «колодязів». Визначення активності антибактеріальних препаратів проводили на двох шарах густого поживного середовища, розлитого в чашки Петрі. У нижньому шарі використовували «голодні» незасіяні середовища (агар-агар, вода, солі). Нижній шар — підкладка заввишки 10 мм, на яку строго горизонтально встановлювали 3-6 тонкостінних циліндрів з нержавіючої сталі діаметром

8 мм і заввишки 10 мм. Навколо циліндрів заливали верхній шар, що складається з поживного агаризованого середовища, розплавленого і охолодженого до 40°C в яке вносили відповідний стандарт добової культури тест-мікроорганізмів. Заздалегідь верхній шар добре перемішували до утворення однорідної маси. Після застигання циліндри стерильним пінцетом витягали і в утворені лунки вносили досліджувану речовину з урахуванням її об'єму (0,3 мл).

Об'єм середовища для верхнього шару коливався від 14 до 16 мл. Чашки підсушували 30-40 хв. за кімнатної температури і термостатували 18-24 год.

Для оцінки нових антибактеріальних речовин, а також при вивченні антибіотикостійких штамів застосовували такі критерії:

- відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки, а також діаметр зони затримки до 10 мм вказує на те, що мікроорганізм не чутливий до внесеного до лунки препарату або концентрації антибіотика;
- зони затримки росту діаметром 10-15 мм вказують на малу чутливість культури до даної концентрації антибактеріальної речовини;
- зони затримки росту діаметром 15-25 мм оцінюються як показник чутливості мікроорганізму до досліджуваних речовини;
- зони затримки росту, діаметр яких перевищує 25 мм, свідчать про високу чутливість мікроорганізмів до досліджуваної речовини.

Значення logP розраховано з використанням програми Chem3DUltra 9,0 програмного пакета Chem Office 2005 [12].

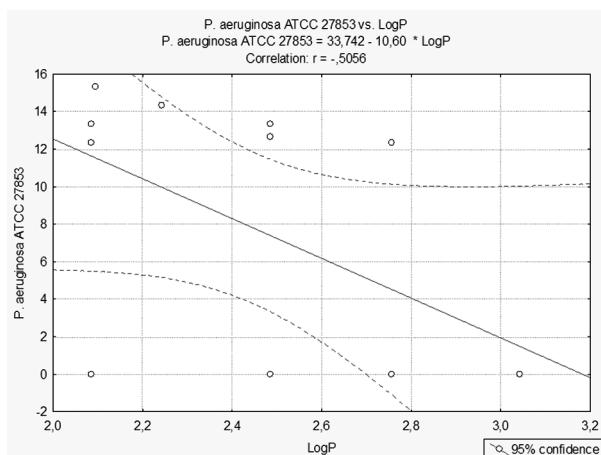


Рис. 1. Кореляція значень антимікробної дії сполук 1-12 щодо *P.aeruginosa* ATCC 27853 та logP.

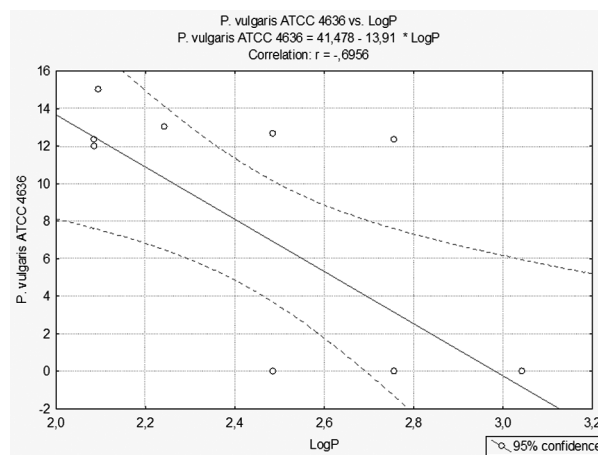


Рис. 2. Кореляція значень антимікробної дії сполук 1-12 щодо *P.vulgaris* ATCC 4636 та logP.

Розрахунки кількісних залежностей антимікробної дії сполук від їх logP проведено з використанням програми STATISTIKA 7 [1, 2, 13].

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати (табл. 1) переконливо підтверджують на скринінговому рівні наявність широкого спектра антимікробних властивостей у всіх досліджуваних сполук відносно використаного набору мікроорганізмів.

Аналіз отриманих результатів з урахуванням показників «хімічна структура — біологічна дія» показав, що на антимікробну активність суттєво впливає наявність оксоіндольного ядра. Одночасно при варіюванні замісників за принципом хімічних варіацій методом П.Ерліха [8] встановлено інтактність або потенціюючий вплив замісника на вихідну антимікробну активність досліджуваної сполуки. Антимікробна активність досліджуваних сполук залежить від природи та положення замісників, але цей вплив різновекторний для різних штамів.

Як свідчать дані табл. 1, усі досліджувані сполуки мають мікробіцидні властивості відносно *S. aureus* ATCC 26923, *E. coli* ATCC 25922 та *B.subtilis* ATCC 6633. Відносно *P.aeruginosa* ATCC 27853, *P.vulgaris* ATCC 4636 активними виявилися сполуки 2, 4, 6, 9-12.

Аналіз показує, що найперспективнішими в ряду синтезованих N-[2-ариламіно-2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)етил]бензамідів виявились ті, що містять атом бром у положенні 3 або одночасно заміщені положення 2 та 4 бензенового ядра бен-

замідного фрагмента. Саме останнє поєднання замісників (спол. 12) сприяє високій мікробіцидній активності (табл. 1).

Створення нових лікарських засобів диктує необхідність розробки доступних методів прогнозування їх терапевтичних і токсичних властивостей на етапі відбору сполук-кандидатів. Для вирішення цієї проблеми розроблені різноманітні підходи дослідження кількісних співвідношень «структура — активність» (ККСА або QSAR-аналіз). Одним з найбільш науково обґрунтованих є метод Ханша [15], що базується на лінійній залежності вільної енергії процесу від фізико-хімічних параметрів молекул. За цією моделлю біологічна дія сполуки обумовлена її проникненням крізь біомембрану та подальшою взаємодією з рецептором. Перший процес залежить від транспортних властивостей молекули, які характеризуються параметрами її ліпофільності, другий обумовлений електронною структурою молекули. Параметром ліпофільності обрано коефіцієнт розподілу (logP) сполуки у системі «октаном — вода». Параметром, що відображає електронну структуру молекули, обрано у-константи Гаммета. При цьому логарифм коефіцієнта розподілу (logP) є найпоширенішим дескриптором при встановленні кількісних співвідношень «структура — дія» [14].

Враховуючи вищевказане, досліджено кількісні залежності між розрахованими значеннями logP та експериментально визначеними рівнями протимікробної активності N-[2-ариламіно-2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3H-індол-3-ілден)етил]бензамідів 1-12 (табл. 1) методом кореляційного аналізу.

Усього в статистичну вибірку включено 12 сполук. Під час статистичної обробки результатів мікробіологічних досліджень при аналізі вибірки довжиною в 12 випадків статистично достовірними вважаються значення коефіцієнта кореляції Пірсона, які перевищують 0,40 ( $p \leq 0,05$ ) [4].

Аналіз даних статистичної обробки результатів свідчить про те, що показник  $\log P$  корелює ( $y$  %) зі значеннями антимікробної активності сполук 1-12 щодо *P.aeruginosa* ATCC 27853 ( $r = -0,5056$ ) та *P.vulgaris* ATCC 4636 ( $r = -0,6956$ ). Статистично недостовірною є кореляція активності сполук 1-12 щодо *E.coli* ATCC 25922 і *B.subtilis* ATCC 6633 та показник  $\log P$  ( $r = -0,3890$  та  $r = -0,3899$  відповідно). Відсутня кореляція між показником  $\log P$  та значеннями антимікробної активності сполук 1-12 щодо *S.aureus* ATCC 26923 ( $r = -0,1881$ ). Зазначимо, що в усіх випадках спостерігаються негативні значення коефіцієнтів кореляції [1] (рис. 1, 2).

Такі поєднання коефіцієнтів кореляції Пірсона та показників значимості показують, що наведені на рис. 1-2 графіки та рівняння залежності є достовірними.

Встановлення кількісних залежностей рівнів протимікробної дії від розрахованих значень  $\log P$  у перспективі дасть змогу прогнозувати наявність та ступінь виявлення тих чи інших фармакологічних властивостей N-[2-ариламіно-2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)етил]бензамідів і допоможе оптимізувати цілеспрямований пошук біологічно активних речовин у зазначеному ряду сполук.

## ВИСНОВКИ

1. Проведено мікробіологічні дослідження деяких N-[2-ариламіно-2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)етил]бензамідів відносно *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 та *Proteus vulgaris* ATCC 4636.

2. Виявлено, що найперспективнішими в ряду синтезованих сполук виявились ті, що містять атом бром у положенні 3 або одночасно заміщені положення 2 та 4 бензенового ядра бензамідного фрагмента.

3. З метою встановлення кількісних залежностей рівня біологічної дії від розрахованих значень  $\log P$ , проведено їх регресійно-кореляційний аналіз і встановлено, що показник  $\log P$  добре корелює ( $y$  %) зі значеннями антимікробної дії синтезованих сполук щодо *P.aeruginosa* та

*P.vulgaris*. Статистично недостовірною є кореляція активності сполук щодо *E.coli* і *B.subtilis* та показник  $\log P$ . Відсутня кореляція між показником  $\log P$  та значеннями антимікробної дії щодо *S.aureus*.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Боровиков В.П. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. 2-е изд. / В.П.Боровиков — СПб.: Питер, 2003. — 688 с.
2. Вуколов Э.А. Основы статистического анализа / Э.А.Вуколов. — М.: Форум, 2008. — 464 с.
3. Синтез та властивості N-[2-ариламіно-2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигідро-3Н-індол-3-іліден)етил] бензамідів / С.В.Колісник, В.В.Болотов, О.О.Алтухов [та ін.] // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. — 2010. — Т.8, №3 (31). — С. 65-70.
4. Гублер Е.В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е.В.Гублер, А.А.Генкин. — Л.: Медицина, 1973. — 141 с.
5. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. — Х.: РИРЕГ, 2001. — 556 с.
6. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. — Доп. 2. — Х.: Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — 620 с.
7. Зубков М.И. Цефалоспорины при внебольничных пневмониях: альтернатива выбора / М.И.Зубков // Антибиотики и химиотерапия. — 2005. — Т.50, №2-3. — С. 73-78.
8. Микробиология / И.Л. Дикий, И.И. Сидорчук, И.Ю. Холупяк [и др.]. — Х.: Изд-во НФаУ, 2002. — 404 с.
9. Ребенко Ж.А. Линезолид (Зивокс) — высокоэффективный антибиотик для лечения грамположительных инфекций // Антибиотики и химиотерапия. — 2004. — Т. 49, №2. — С. 26-28.
10. Светухин А.М., Блатун Л.А., Ухин С.А. Моксифлоксацин — новый фторхинолон расширенного спектра действия в лечении тяжелых инфекционно-воспалительных заболеваний // Антибиотики и химиотерапия. — 2005. — Т. 50, №2-3. — С. 64-72.
11. Сидоренко С.В., Иванов Д.В. Результаты изучения распространения антибиотикорезистентности среди возбудителей внебольничных инфекций мочевыводящих путей в Москве. Фаза I // Антибиотики и химиотерапия. — 2005. — Т. 49, №1. — С. 3-10.
12. Соловьев М.Е., Соловьев М.М. Компьютерная химия. — М.: СОЛОН-Пресс, 2005. — 536 с.
13. Халафян А.А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. 3-е изд. Учебник. М.: Бином-Пресс, 2007. — 512 с.
14. Agmon N. Structure-reactivity correlations in state-to-state chemistry // J. Chem. Phys. — 1982. — Vol. 76. — №4. — P. 1759-1769.
15. Hansch C., Leo A., Hoekman D. Exploring QSAR. Hydrophobic, electronic and Constants. ACS Professional Reference Book. — Washington, 1995. — 348 p.

**С.В.Колесник, Е.Н.Свечникова, А.А.Алтухов, О.С.Крыськив. Противомикробная активность N-[2-ариламино-2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)этил]бензамидов и ее связь с молекулярной структурой. Харьков, Украина.**

**Ключевые слова:** противомикробная активность, липофильность, корреляция, оксамиды.

Проведены микробиологические исследования 12 синтезированных N-[2-ариламино-2-оксо-1-(2-оксо-1,2-дигидро-3H-индол-3-илиден)этил]бензамидов. Установлены количественные закономерности «структура — действие» в этом гомологическом ряду соединений на основе проведения корреляции теоретически рассчитанных значений  $\log P$  с результатами изучения противомикробного действия.

**S.V.Kolesnik, E.N.Svechnikova, A.A.Altukhov, O.S.Kryskiw. Antimicrobial activity of N-[2-aryl-amino-2-oxo-1-(2-oxo-1,2-dihydro-3H-indol-3-ilidene)ethyl]benzamides and its connection with molecular structure. Kharkiv, Ukraine.**

**Key words:** antimicrobial activity, lipophilicity, correlation, oxamides.

Microbiological researches of new N-[2-aryl-amino-2-oxo-1-(2-oxo-1,2-dihydro-3H-indol-3-ylidene)ethyl]benzamides are conducted. Some quantitative conformity to the law are set «structure-action» among the indicated connections on the basis of conducting of correlation of the values of  $\log P$  expected in theory with the results of study of antimicrobial action.

Надійшла до редакції 04.02.2011 р.