

М. М. БАБКІНА <sup>1</sup>,  
О. В. ВАСИЛЬЧЕНКО.<sup>2</sup>

А. М. ГОЛОВКО <sup>3</sup>, доктор ветеринарних наук, академік НААН

<sup>1</sup>Інститут ветеринарної медицини УААН, м. Київ

<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, м. Київ

## ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ ДІЇ ПОХІДНИХ ТРИАЗИНУ, ФЕНАЗИНУ ТА ТРИАЗИНОБЕНЗОТІАЗИНУВ ПРОТИ МІКРООРГАНІЗМУ *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE*

Досліджено антимікробну активність похідних триазину, триазинобензотіазину та феназину у відношенні до культури музейного штаму *Erysipelothrix rhusiopathiae* ВР-2. Скринінг 40 синтезованих сполук виявив 22 досліджуваних речовин, мінімальна інгибуюча концентрація (МІК), яких визначалася у межах 1,8 – 0,95 μМ. Найефективнішою виявилася похідна триазинобензотіазину №56, яка повністю пригнічувала ріст бактерій *Erysipelothrix rhusiopathiae* за концентрації 0,95 μМ.

*Ключові слова:* *erysipelothrix rhusiopathiae*, похідні триазину, триазино-бензотіазину, феназину, антимікробна активність, мінімальна інгибуюча концентрація.

Бешиха є однією з найбільш поширених хвороб свиней на Україні та в світі, а її збудник *Erysipelothrix rhusiopathiae* здатний викликати захворювання тварин багатьох видів та людей [1].

За кількістю неблагополучних пунктів та рівнем летальності бешиха посідає сьоме місце серед 14 найбільш поширених інфекційних хвороб свиней [2].

Дослідженнями вітчизняних та зарубіжних вчених встановлено етіологію бешихи свиней, визначено епізоотологічні особливості її перебігу, розроблено методи діагностики, лікування та специфічної профілактики [3].

Однак, незважаючи на систематичні щеплення свиней, застосування антибіотиків та проведення ветеринарно-санітарних заходів, захворювання на бешиху свиней виявляють як в Україні, так і в країнах близького та далекого зарубіжжя. За допомогою проведених в останні роки досліджень встановлено, що спалахи бешихи в нашій державі зумовлені відсутністю достатньо ефективних та безпечних засобів профілактики та лікування цього захворювання.

**Мета** представленої роботи полягала у дослідженні антимікробної активності похідних триазину, триазинобензотіазину та феназину у відношенні до *Erysipelothrix rhusiopathiae* з перспективою подальших досліджень щодо створення нових засобів боротьби із бешихою свиней.

**Матеріали та методи.** При проведенні досліджень використовували мікроорганізм *Erysipelothrix rhusiopathiae* (штам ВР-2) з колекції Інституту ветеринарної медицини НААН.

Для культивування *Erysipelothrix rhusiopathiae* використовували поживне середовище – м'ясо-пептонний бульйон за Хоттінгером (МПБХ). У середовище також додавали 10% інактивованої сироватки крові великої рогатої худоби та 1% глюкози (40%).

Чисту культуру для проведення досліджень отримували, висіваючи її на тверде живильне середовище (МПАХ) та інкубуючи протягом 48 годин за температури  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Колонії мікроорганізму після мікробіологічного контролю чистоти культури (мікроскопія забарвлених за Грамом зразків), суспендували у фізіологічному розчині до рівня каламутності, що відповідає значенню 0,5 за стандартом МакФарланда.

Антимікробну активність досліджуваних речовин вивчали методом одноразових серійних мікроразведень у рідкому поживному середовищі Мюллера-Хінтона (Россія) та бульйоні ВНІ (Biomerieux, France) (або МПБХ). Середовища готували згідно рекомендацій виробника. Досліди проводили у 96-лункових стерильних полістиролових планшетах фірми «Sarstedt», Німеччина.

У підготовлені стерильні планшети за асептичних умов вносили 140 мкл середовища, додавали 50 мкл суспензії збудника бешихи у кінцевій концентрації  $1\times 10^7$  КУО в  $1\text{ см}^3$  і 10 мкл тестових речовин (розчинник ДМСО) у відповідних концентраціях та інкубували впродовж 18-24 години за температури  $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  протягом 24 годин. В якості контролю використовували лунки із внесеним поживним середовищем (К-) та лунки, засіяні культурою мікроорганізмом (К+). Для контролю токсичності в окремі лунки додавали ДМСО (Merk, Німеччина). Для кожного зразка використовували по дві лунки. Реєстрацію результатів проводили візуально в проникаючому світлі. Ріст культур в МПБ з додаванням АБС порівнювали з негативним контролем, який містив лише вихідний інокулом посіяний в МПБ. МІК визначали за найменшою концентрацією АБС, яка повністю пригнічувала видимий ріст мікроорганізмів.

#### **Результати та обговорення.**

У дослідженнях використано низку похідних триазину, як аналогу нуклеїнових основ та дві групи трициклічних сполук – похідних феназину та триазинобензотіазину, які за пласкою багатоядерною структурою можна віднести до аналогів тетрацикліну – одного з препаратів першого вибору для лікування бешихи. Всі сполуки розчиняли у ДМСО. При внесенні зразків до бактеріальної культури концентрація ДМСО становила 2,5 %, яка не впливала на ріст культури. У попередніх дослідженнях (дані не наведені) нами було встановлено, що ДМСО у концентрації 2,5% не впливає негативно на ріст *Erysipelothrix rhusiopathiae* у порівнянні із контрольними посівами росту культури.

У таблиці 1 представлено результати антимікробного скринінгу досліджуваних сполук – похідних триазину, феназину та триазинобензотіазину. В результаті проведених досліджень встановлено, що всі досліджувані сполуки проявили виражену антимікробну дію у концентрації 100 мкг/мл. Найвищу активність у відношенні до бактерій досліджуваного штаму проявили речовини № 50 (), 51(), 52, 54, 56, 57, 60, 129, 130 які повністю пригнічували видимий ріст культури *Erysipelothrix rhusiopathiae* в концентраціях від  $0,98\pm 0,09\mu\text{M}$  до  $1,1\pm 0,15\mu\text{M}$ . Сполуки № 1, 2, 3, 12, 14, 15, 45, 46 проявили антибактеріальну активність у концентраціях більше  $1,5\pm 0,15\mu\text{M}$ . Речовини № 57, 125, 126, 128 проявили інгібуючий ефект тільки в концентраціях від  $9,5\pm 0,5\mu\text{M}$  до  $11,6\pm 0,5\mu\text{M}$ . Найвищою концентрацією, яка викликала інгібування росту досліджених бактерій –  $114,0\pm 0,5\mu\text{M}$  була зареєстрована для речовини 58.

Найефективнішою виявилася похідна триазинобензотіазину №56 (7-methyl-3-oxo-N-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-2,3-dihydro-1H-[1,2,4]triazino[5,6-b][1,4] benzo-

thiazine-9-carboxamide), яка повністю пригнічувала ріст бактерій *Erysipelothrix rhusiopathiae* за концентрації  $0,95 \pm 0,09 \mu\text{M}$ .

Таблиця 1.

**Результати вивчення мінімальної інгибуючої концентрації похідних триазину, феназину та триазинобензотіазину**

Речовини	Хімічна назва	Мінімальна інгибуюча концентрація, $\mu\text{M}$
Похідні триазину 1	6-[(4-butylphenyl)amino]-1,2,4-triazine-3,5(2 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-dione	$1,5 \pm 0,15 \mu\text{M}$
2	5-[(4-butylphenyl)amino]pyrimidine-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> )-dione	$1,5 \pm 0,15 \mu\text{M}$
3	6-[(4-butylphenyl)amino]pyrimidine-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> )-dione	$1,5 \pm 0,15 \mu\text{M}$
5	6-[(4-fluorophenyl)amino]-1,2,4-triazine-3,5(2 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-dione	$1,8 \pm 0,17 \mu\text{M}$
6	6-[(4-hydroxyphenyl)amino]-1,2,4-triazine-3,5(2 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-dione	$1,8 \pm 0,17 \text{mM}$
8	6-[(4-aminophenyl)amino]-1,2,4-triazine-3,5(2 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-dione	$1,8 \pm 0,18 \mu\text{M}$
9	6-[(4-methoxyphenyl)amino]-1,2,4-triazine-3,5(2 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-dione	$1,7 \pm 0,17 \mu\text{M}$
10	6-[(4-ethylphenyl)amino]-1,2,4-triazine-3,5(2 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-dione	$1,72 \pm 0,14 \mu\text{M}$
12	6-[(4-propoxyphenyl)amino]-1,2,4-triazine-3,5(2 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-dione	$1,5 \pm 0,15 \text{mM}$
14	6-[(4-isobutylphenyl)amino]-1,2,4-triazine-3,5(2 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-dione	$1,5 \pm 0,11 \mu\text{M}$
15	6-[[4-(pentyloxy)phenyl]amino]-1,2,4-triazine-3,5(2 <i>H</i> ,4 <i>H</i> )-dione	$1,4 \pm 0,13 \mu\text{M}$
Похідні триазинобензотіазину 44	3-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -[1,2,4]triazino[5,6- <i>b</i> ][1,4]benzothiazine-7-carboxylic acid	$1,5 \pm 0,14 \mu\text{M}$
45	7-methyl-3-oxo-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -[1,2,4]triazino[5,6- <i>b</i> ][1,4]benzothiazine-9-carboxylic acid:	$1,4 \pm 0,09 \text{mM}$
46	2,4-dioxo-1,3,4,5-tetrahydro-2 <i>H</i> -pyrimido[4,5- <i>b</i> ][1,4]benzothiazine-7-carboxylic acid	$1,4 \pm 0,05 \mu\text{M}$
49	3-oxo- <i>N</i> -phenyl-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -[1,2,4]triazino[5,6- <i>b</i> ][1,4]benzothiazine-7-carboxamide:	$1,18 \pm 0,07 \mu\text{M}$
50	3-oxo- <i>N</i> -[3-(trifluoromethyl)phenyl]-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -[1,2,4]triazino[5,6- <i>b</i> ][1,4]benzothiazine-7-carboxamide	$0,98 \pm 0,09 \mu\text{M}$
51	3-oxo- <i>N</i> -[4-(trifluoromethyl)phenyl]-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -[1,2,4]triazino[5,6- <i>b</i> ][1,4]benzothiazine-7-carboxamide:	$0,98 \pm 0,08 \mu\text{M}$
52	3-oxo- <i>N</i> -[4-butylphenyl]-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -[1,2,4]triazino[5,6- <i>b</i> ][1,4]benzothiazine-7-carboxamide	$1,0 \pm 0,09 \mu\text{M}$
54	7-methyl-3-oxo- <i>N</i> -phenyl-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -[1,2,4]triazino[5,6- <i>b</i> ][1,4]benzothiazine-9-carboxamide:	$1,14 \pm 0,08 \mu\text{M}$
56	7-methyl-3-oxo- <i>N</i> -[3-(trifluoromethyl)phenyl]-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -[1,2,4]triazino[5,6- <i>b</i> ][1,4]benzothiazine-9-carboxamide	$0,95 \pm 0,09 \mu\text{M}$
57	7-methyl-3-oxo- <i>N</i> -[4-(trifluoromethyl)phenyl]-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -[1,2,4]triazino[5,6- <i>b</i> ][1,4]benzothiazine-9-carboxamide	$9,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$
58	7-methyl-3-oxo- <i>N</i> -pyridin-2-yl-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -[1,2,4]triazino[5,6- <i>b</i> ][1,4]benzothiazine-9-carboxamide	$114,0 \pm 0,5 \mu\text{M}$

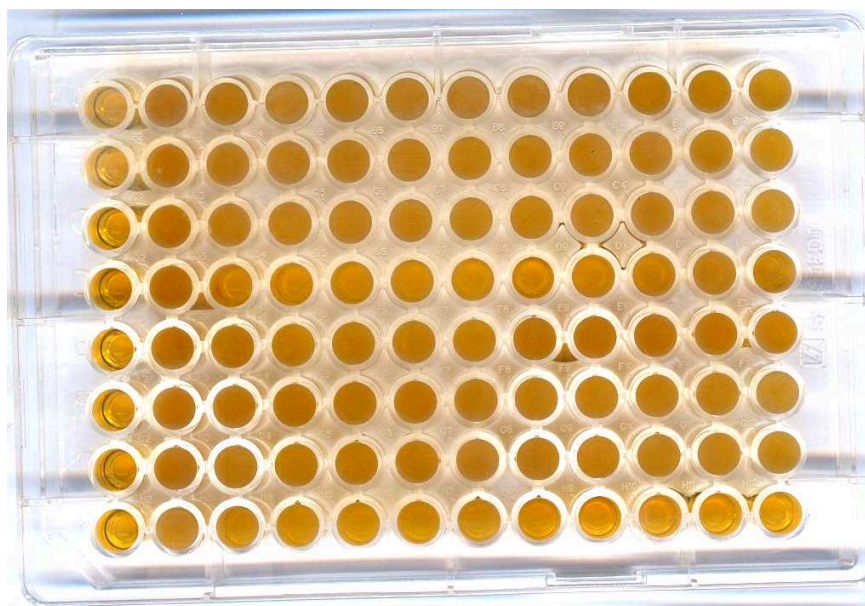
60	7-methyl-3-oxo- <i>N</i> -pyrimidin-2-yl-2,3-dihydro-1 <i>H</i> -[1,2,4]triazino[5,6- <i>b</i> ][1,4]benzothiazine-9-carboxamide	1,1±0,15μM
Похідні феназину 122	9-methoxyphenazine-1-carboxylic acid	1,13±0,15μM
123	9-methoxy- <i>N</i> -phenylphenazine-1-carboxamide	1,21±0,15μM
124	9-methoxy- <i>N</i> -(2-methylphenyl)phenazine-1-carboxamide	1,16±0,15μM
125	9-methoxy- <i>N</i> -(3-methylphenyl)phenazine-1-carboxamide	11,6±0,5μM
126	9-methoxy- <i>N</i> -(4-methylphenyl)phenazine-1-carboxamide	11,6±0,5μM
128	<i>N</i> -(3,4-dimethylphenyl)-9-methoxyphenazine-1-carboxamide	11,3±0,5μM
129	<i>N</i> -(3,5-dichlorophenyl)-9-methoxyphenazine-1-carboxamide	1,0±0,15μM
130	<i>N</i> -(5-chloro-2-methylphenyl)-9-methoxyphenazine-1-carboxamide	1,1±0,15μM

### Висновки.

1. У результаті проведених досліджень встановлено антибактеріальну активність у відношенні до культури музейного штаму *Erysipelothrix rhusiopathiae* ВР-2 та мінімальну інгибуючу концентрацію похідних триазину, феназину та триазинобензотіазину в концентраціях від 0,98±0,09μM до 1,5±0,15μM.

2. Скринінг 40 синтезованих сполук виявив 22 досліджуваних речовин, мінімальна інгибуюча концентрація (МІК), яких визначалася у межах 1,8 – 0,95μM. Найефективнішою виявилася похідна триазинобензотіазину №56 (7-methyl-3-oxo-*N*-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-2,3-dihydro-1*H*-[1,2,4]triazino[5,6-*b*][1,4]benzothiazine-9-carboxamide), яка повністю пригнічувала ріст бактерій *Erysipelothrix rhusiopathiae* за концентрації 0,95±0,09μM.

За даними представленими в таблиці 1, бактеріальна культура *Erysipelothrix rhusiopathiae* виявилася чутливою до досліджуваних тест-агентів – знайдено 22 сполуки, які ефективно пригнічували її ріст в умовах *in vitro*. Зважаючи на це наступним етапом дослідницької роботи буде вивчення токсичності зазначених сполук та їхнього впливу на резистентні штами *Erysipelothrix rhusiopathiae*.



### Список використаної літератури

1. *Lorian V.* Antibiotics in laboratory medicine (4<sup>th</sup> ed.) / V. Lorian –1996.- Baltimore:Williams and Wilkins.- 642P.
2. *National committee for clinical laboratory standarts.* Performance standarts for antimicrobial susceptibilty testing approved standart– 1993. – 4 ed.- Document M2-A4.- Villanova, PA:NCCLS
3. *Weidemann B.* Evaluation of data from susceptibilty testing/ B. Weidemann // International journal of antimicribial agents. – 1998.- №10. – P.218 –219
4. *Падейская. Е.Н.* Фторхинолоны: значение, развитие исследований, новые препараты, дискуссионные вопросы/ Е.Н. Падейская. // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – №43 (11). – С. 38–44.
5. *Методичні вказівки "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів", затверджено Наказом МОЗ України N 167. – Київ, 2007.*
6. *Boulos A.* Antibiotic Susceptibility of *Tropheryma whipplei* in MRC5 Cells / A. Boulos, J-M Rolain., D. Raoult [et al.]// Antimicrob Agents Chemother. 2004. – 48 (3). – P. 747-752.
7. *Witte W.* Medical Consequences of Antibiotic Use in Agriculture Science / W. Witte // Science. – 1998, Feb. 13. – P. 996-997 .

### ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИАЗИНА, ФЕНАЗИНА ТА ТРИАЗИНО-БЕНЗОТИАЗИНА В ОТНОШЕНИИ МИКРООРГАНИЗМА *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE* / Бабкина М. М., Васильченко О. В., Головка А. Н.

*Досліджено антимікробну активність похідних триазину, триазинобензотіазину та феназину у відношенні до культури музейного штаму *Erysipelothrix rhusiopathiae* VR-2. Скринінг 40 синтезованих сполук виявив 22 досліджуваних речовин, мінімальна інгібуюча концентрація (МІК), яких визначалася у межах 1,8 – 0,95 μМ. Найефективнішою виявилася похідна триазинобензотіазину №56, яка повністю пригнічувала ріст бактерії *Erysipelothrix rhusiopathiae* за концентрації 0,95 μМ.*

*Ключевые слова: *erysipelothrix rhusiopathiae*, производные триазина, триазино-бензотиазина, феназина, антимикробная активность, минимальная ингибирующая концентрация.*

### THE INVESTIGATION OF ANTIBACTERIAL ACTION OF TRIASIN, PHENASIN, TRIAZINOBENZOTHIAZIN AGAINST *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE* MICROORGANISM / M. M. Babkina, O. V. Vasilchenko, A. N. Golovko

*It was investigated the antimicrobial action of triazine, triazinbenzothiazine and phenazin generics compounds against of the *Erysipelothrix rhusiopathiae* VR-2 museum strain culture. The screening of 40 synthesized compounds revealed 22 investigated substances, the minimal inhibiting concentration (MIC) of which ranged in 1,8 -0,95 μM. The most effective compound was the derivative of triazinbenzothiazin 56, that completely inhibited the growth of *Erysipelothrix rhusiopathiae* test culture used in concentration 0,95 μM.*

*Key word: *erysipelothrix rhusiopathiae*, generics of triazine, triazinbenzothiazine, phenazine, antimicrobial action, the minimal inhybiting concentration*

**Рецензент – кандидат ветеринарних наук, О. А.Тарасов**