
ХИМИЯ

**СИНТЕЗ ТОЛУОЛ-4-СУЛЬФОИМИДАЗОЛИДА
И ЕГО ВОЗДЕЙСТВИЕ НА РОСТ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ
E. COLI M-17**

А.В. Драгунова¹, Ю.П. Зарубин², Н.А. Трещанина³, Е.А. Юркина⁴,
П.П. Пурыгин⁵

Толуол-4-сульфоимидазолид был исследован на антибактериальную активность путем воздействия на клетки энтеробактерий *Escherichia coli* M-17. Было установлено, что толуол-4-сульфоимидазолид нарушает процесс деления бактерий, понижает их каталазную активность, проявляет бактериостатическую и бактерицидную активности.

В настоящее время арсенал химиотерапевтических средств, применяемых в клинике инфекционных болезней, чрезвычайно разнообразен. За последние годы в лечебную практику вошло много ценных лекарственных веществ – новые антибиотики и сульфаниламиды пролонгированного действия [1,2]. Однако, несмотря на очень большое их разнообразие, мы еще не имеем достаточного количества хорошо действующих специфических препаратов против конкретных возбудителей, например, против протей, синегнойной палочки, нет надежных средств против брюшно-тифозного носительства [3]. Наряду с этим среди самых разнообразных систематических групп – *Escherichia* sp., *Shigella* sp., *Salmonella* sp. и *Staphylococcus* sp., возрастает число штаммов, обладающих множественной устойчивостью к лекарственным средствам, которая приобретает эпидемический характер [4]. Поэтому поиски новых лечебных препаратов, необходимых в клинике, активно продолжаются.

Нами была предпринята попытка синтезировать химическое соединение, предположительно обладающее антибактериальными свойствами. Синтезированное вещество – толуол-4-сульфоимидазолид – является гетероциклическим соединением, аналогом сульфаниламидных препаратов и имеет следующую структуру (схема 1):

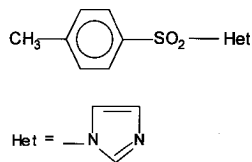


Схема 1

¹ Драгунова Алла Викторовна, кафедра органической химии СамГУ

² Зарубин Юрий Павлович, кафедра органической химии СамГУ

³ Трещанина Нинелла Александровна, кафедра биохимии СамГУ

⁴ Юркина Елена Александровна, кафедра биохимии СамГУ

⁵ Пурыгин Петр Петрович, кафедра органической химии СамГУ

Сульфаниламиды широко применяются в химиотерапевтической практике, однако все чаще клиницисты отмечают снижение эффективности сульфаниламидотерапии различных инфекций [5]. В связи с вышеизложенным было изучено влияние толуол-4-сульфоимидазолида на рост и жизнеспособность бактерий *E.coli* М-17.

1. Экспериментальная химическая часть

ИК-спектры снимали на приборе ИКС-29 ЛОМО (Россия) в таблетках KBr. Индивидуальность соединения определена методом ТСХ на пластинах Silufol в системе бензол-циклогексан (1:2), проявление парами иода.

Толуол-4-сульфоимидазолид был получен по следующей схеме:

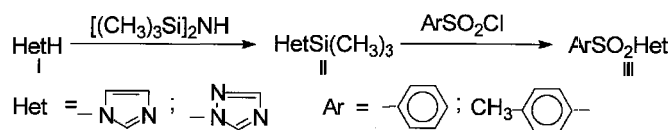


Схема 2

Синтез N-триметилсилилимидазола осуществляли согласно методике [6]. 0,9 мл N-триметилсилилимидазола (5 ммоль) прибавляли к 0,95 г (5 ммоль) толуол-4-сульфохлорида, растворенного в 25 мл абсолютного бензола, кипятили с обратным холодильником и хлоркальциевой трубкой 3,5 часа. После окончания реакции содержимое упаривали на роторном испарителе досуха, выпадали кристаллы белого цвета, перекристаллизовывали из смеси бензол-циклогексан (1:3), $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$. Т.пл. 78-78,5 °C; ИК-спектр, ν_{max} , cm^{-1} : 3120, 3150 (C-H (имидазол)), 1340, 1040 ($-\text{SO}_2-$).

2. Экспериментальная биологическая часть

Токсичность толуол-4-сульфоимидазолида выявляли на культуре бактерий *Escherichia coli* М-17.

Инокулят выращивали из оживленной суточной культуры клеток на рыбно-пептонном бульоне (РПБ) при $37 \pm 0,1$ °C в течение 12 часов. Затем клетки переносили в свежий РПБ, содержащий исследуемое соединение в конечных концентрациях 5, 10, 50, 100, 250, 500, 750 и 1000 мкг/мл (опытный вариант) и в РПБ без указанного химического соединения (контрольный вариант). Выращивание проводили в течение 8 часов при $37 \pm 0,1$ °C, каждый час с момента засева определяли прирост биомассы на ФЭК-56 ПМ (светофильтр 6, кювета 0,5 см). На основании полученных данных рассчитывали длительность лаг-периода, удельную скорость роста и время удвоения биомассы [7,8]. Кроме этого, через 3 и 8 часов культивирования с момента засева из контрольных и опытных вариантов отбирали пробы клеток и рассевали на чашки Петри с рыбно-пептонным агаром (РПА) по методу Коха [9]. Посевы культивировали при $37 \pm 0,1$ °C в течение 3-х суток, после чего подсчитывали количество выросших клонов. Рассчитывая число жизнеспособных клеток в 1 мл среды, судили о степени летального воздействия толуол-4-сульфоимидазолида на клетки бактерий [10].

Как видно из данных, представленных на рис.1 и 2, наличие исследуемого соединения в питательной среде в концентрациях от 5 до 200 мкг/мл не оказывало существенного влияния на прирост биомассы клеток и характер роста контрольных

и опытных бактерий в течение 8 часов культивирования. При данных концентрациях продолжительность лаг-периода как в контрольных, так и в опытных вариантах составила 1 час.

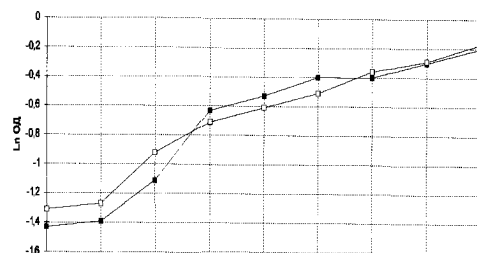


Рис. 1А

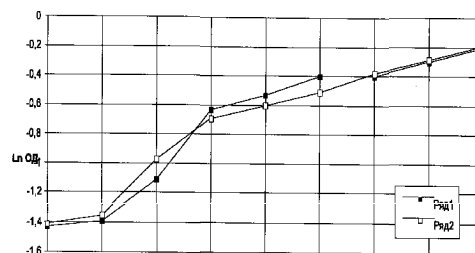


Рис. 1Б

Рис.1. Характер роста бактерий *E.coli* М-17 при 5 (А) и 10 (Б) мкг/мл толуол-4-сульфоимидазолида в среде: ряд 1 – контроль, ряд 2 – опыт

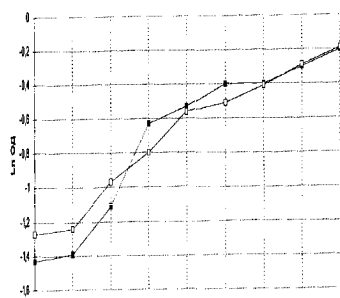


Рис. 2А

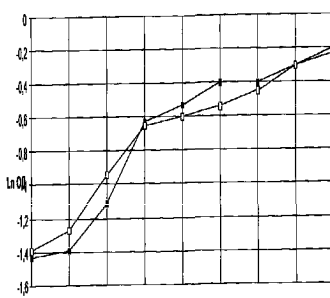


Рис. 2Б

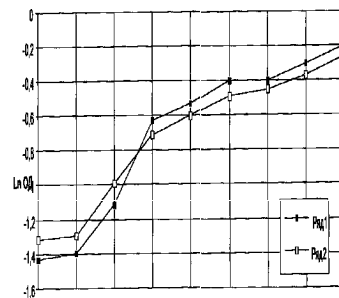


Рис. 2В

Рис.2. Характер роста бактерий *E.coli* М-17 при 50 (А), 100 (Б) и 200 (В) мкг/мл толуол-4-сульфоимидазолида в среде: ряд 1 – контроль, ряд 2 – опыт

Однако увеличение концентрации исследуемого соединения в среде до 500, 750 и 1000 мкг/мл приводило к снижению прироста биомассы клеток. Из данных, представленных на рис.3, видно, что после 8 часов культивирования с момента засева оптическая плотность клеточной суспензии в контрольном варианте достигала 0,84 ОД, а в опытных вариантах – 0,62; 0,56 и 0,44 ОД соответственно.

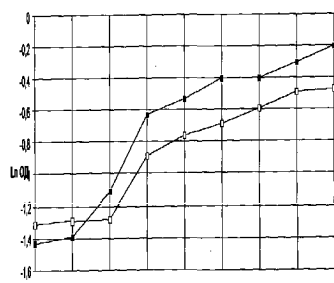


Рис. 3А

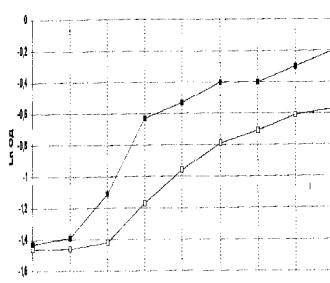


Рис. 3Б

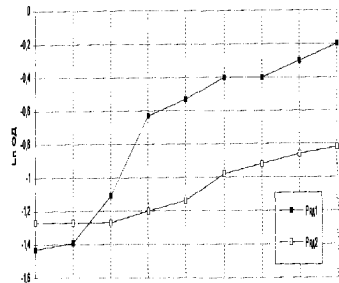


Рис. 3В

Рис.3. Характер роста бактерий *E.coli* М-17 при 500 (А), 750 (Б) и 1000 (В) мкг/мл толуол-4-сульфоимидазолида в среде: ряд 1 – контроль, ряд 2 – опыт

Табл.1 Удельная скорость роста бактерий *E.coli* М-17
на среде с толуол-4-сульфоимидазолидом, час⁻¹

Возраст культуры, час	Контроль	Концентрация толуол-4-сульфоимидазолида, мкг/мл		
		500	750	1000
0	—	—	—	—
1	0,04±0,01	0,02±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
2	0,16±0,01	0,02±0,00	0,02±0,00	0,00±0,00
3	0,27±0,01	0,13±0,02	0,10±0,03	0,02±0,00
4	0,22±0,01	0,14±0,01	0,12±0,01	0,03±0,01
5	0,21±0,03	0,12±0,02	0,13±0,02	0,05±0,01
6	0,21±0,01	0,12±0,01	0,12±0,02	0,06±0,01
7	0,16±0,02	0,12±0,02	0,12±0,01	0,06±0,02
8	0,15±0,02	0,10±0,01	0,11±0,01	0,06±0,01

Табл.2 Время удвоения биомассы бактерий *E.coli* М-17
на среде с толуол-4-сульфоимидазолидом, час

Время культуры, час	Контроль	Концентрация толуол-4-сульфоимидазолида, мкг/мл		
		500	750	1000
0	—	—	—	—
1	17,31,5	34,63,6	—	—
2	4,30,9	34,62,5	34,62,8	—
3	2,60,5	5,30,8	6,90,9	34,62,5
4	3,20,6	4,90,7	5,80,4	23,11,3
5	3,30,1	5,80,4	5,30,3	13,91,1
6	3,30,2	5,80,3	5,80,4	11,51,2
7	2,60,1	5,80,4	5,80,2	11,51,1
8	4,60,3	6,90,6	6,30,7	11,51,3

Таким образом, прирост биомассы бактерий в контрольной пробе составил 0,66 ОД, а в опытных вариантах – 0,35; 0,33 и 0,16 ОД соответственно, что в 1,7; 1,8 и 3,7 раз меньше по сравнению с контрольным вариантом. Кроме того, продолжительность лаг-периода у опытных культур при этом увеличивалась до 1,6; 2,0 и 2,3 часа соответственно, что свидетельствует о подавлении роста бактерий данными концентрациями толуол-4-сульфоимидазолида.

Данные, представленные в табл. 1 и 2 и на рис. 4, свидетельствуют о том, что максимальное значение удельной скорости роста и минимальное значение времени удвоения биомассы у бактерий из контрольной пробы были выявлены через 3 часа культивирования с момента засева и достигали 0,27±0,01 час и 2,6±0,5 час соответственно, а в опытных вариантах при концентрации соединения в среде 500, 750

и 1000 мкг/мл – через 4, 5 и 6 часов. При этом величины удельной скорости роста достигали $0,14 \pm 0,01$; $0,13 \pm 0,02$ и $0,06 \pm 0,01$ час⁻¹, а время удвоения биомассы опытных клеток составляло $4,9 \pm 0,7$; $5,3 \pm 0,3$ и $11,5 \pm 0,3$ час соответственно. На основании полученных результатов было выявлено, что толуол-4-сульфоимидазол в концентрациях 500, 750 и 1000 мкг/мл существенно замедляет процесс роста микроорганизмов, уменьшая прирост биомассы и удельную скорость роста и увеличивая длительность лаг-периодов и время удвоения биомассы. При этом степень влияния на клетки *E.coli* M-17 возрастает с увеличением концентрации данного соединения в среде. Максимальное ингибирующее влияние на рост бактерий было выявлено в присутствии исследуемого вещества в концентрации 1000 мкг/мл.

При анализе полученных результатов было высказано предположение о том, что толуол-4-сульфоимидазол замедляет метаболизм бактериальных клеток, что сказывается на скорости их роста, либо оказывает влияние на их жизнеспособность. Для выявления действия исследуемого соединения на клетки бактерий была определена степень его летальности. Для этого определяли число живых клеток в контрольных и опытных пробах в процессе роста в средах с веществом в концентрациях 500, 750 и 1000 мкг/мл. Как видно из данных, представленных в табл. 3 и рис.5, число жизнеспособных клеток после 3-х часового роста в опытных пробах незначительно уменьшилось при концентрации 500 мкг/мл, а при 750 и 1000 мкг/мл снизилось по сравнению с контролем в 1,4 и 1,5 раза соответственно. В результате 8-ми часового инкубирования при данных концентрациях в опытных пробах количество живых клеток уменьшилось в 1,3; 1,6 и 1,9 раза.

Табл.3 Число жизнеспособных клеток в 1 мл суспензии

Возраст культуры, час	Контроль	Концентрация толуол-4-сульфоимидазолида, мкг/мл		
		500	750	1000
3	$408 \cdot 10^{23}$	$380 \cdot 10^{23}$	$291 \cdot 10^{23}$	$272 \cdot 10^{23}$
8	$776 \cdot 10^{23}$	$575 \cdot 10^{23}$	$496 \cdot 10^{23}$	$410 \cdot 10^{23}$

Таким образом, было выявлено, что при 3-х часовом культивировании бактерий в присутствии толуол-4-сульфоимидазолида их жизнеспособность понижалась только при концентрациях 750 и 1000 мкг/мл, в то время как при 8-ми часовом выращивании на жизнеспособность бактерий оказывали влияние все три исследуемые концентрации вещества.

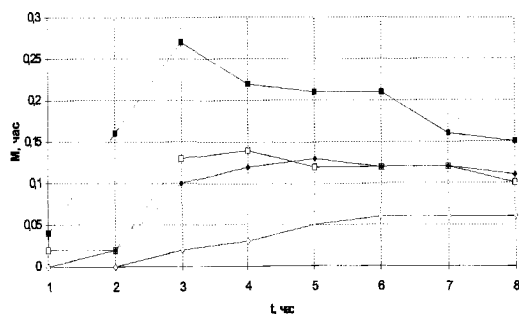


Рис. 4А

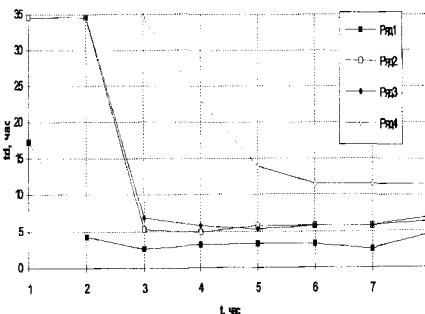


Рис. 4Б

Рис.4 Динамика удельной скорости роста (А) и времени удвоения биомассы (Б) *E.coli* M-17 при разных концентрациях толуол-4-сульфоимидазолида: ряд 1 – контроль, ряд 2 – 500 мкг/мл, ряд 3 – 750 мкг/мл, ряд 4 – 1000 мкг/мл

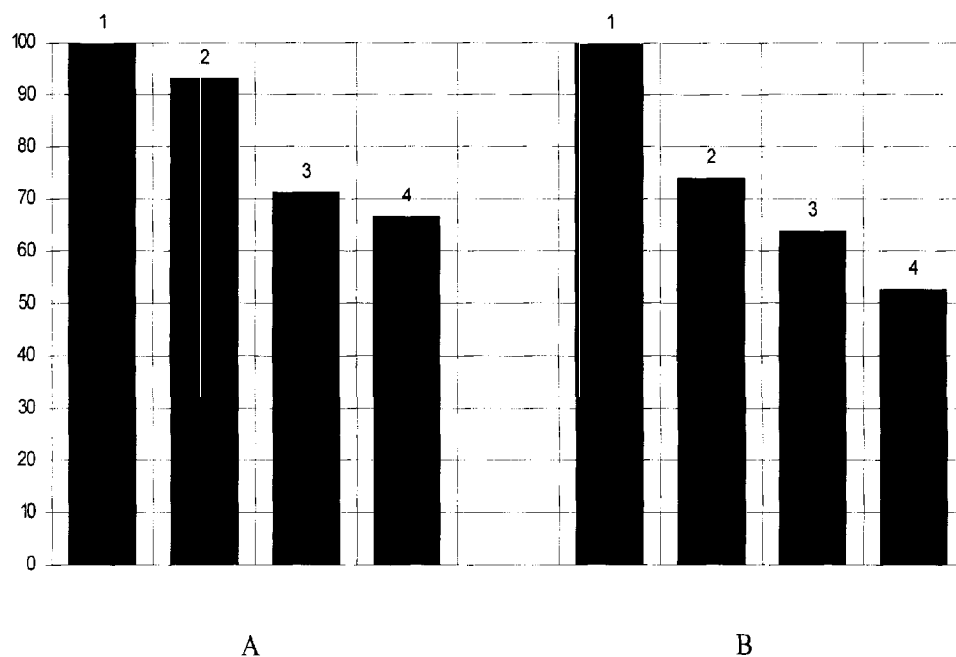


Рис.5 Количество жизнеспособных бактерий *E.coli* M-17 в зависимости от концентрации толуол-4-сульфоимидазолида и продолжительности культивирования: А – возраст культуры 3 часа, В – возраст культуры 8 часов; 1 – контроль, 2 – 500 мкг/мл, 3 – 750 мкг/мл, 4 – 1000 мкг/мл.

Таким образом, в отличие от известных сульфаниламидных препаратов, оказывающих преимущественно бактериостатическое действие, толуол-4-сульфоимидазолид проявляет бактериостатическую и бактерицидную активности.

Литература

- [1] Белоусов Ю.Б., Моисеев В.С., Лепахин В.К. Клиническая фармакология и фармакотерапия. М.: Универсум, 1993. С.397.
- [2] Лепахин В.К., Белоусов Ю.Б., Моисеев В.С. Клиническая фармакология с международной номенклатурой лекарств. М.: Изд-во УДН, 1988. С.444.
- [3] Петровская В.Г. Роль множественной лекарственной устойчивости в биологии патогенных и условно-патогенных бактерий // Антибиотики. 1984. N 2.
- [4] Бельский В.В., Московцева А.И. Некоторые вопросы эпидемиологии множественной лекарственной устойчивости шигелл и эшерихий. Химиотерапия инфекций и лекарственная устойчивость патогенных микроорганизмов. // Тезисы всесоюзной конференции. Москва, 17-18 апреля, 1973. С.20.
- [5] Терешин И.М. Преодоление лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний. М.: Медицина, 1980. С.182.
- [6] Birkofer L., Richter P. "Aktivierung" N-haltiger Heterocyclen durch Silylierung // Chem. Ber. 1960. Bd 93. N 12. P.2804-2809.
- [7] Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978. С.336.
- [8] Ждан-Пушкина С.М. Основы роста культур микроорганизмов. Л.: ЛГУ, 1983. С.188.
- [9] Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1978. С.394.
- [10] Практикум по микробиологии //Под ред. Н.С. Егорова. М.: МГУ, 1976. С.307.

SYNTHESIS TOLUENE-4-SULFOIMIDAZOLIDE AND INVESTIGATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY ON THE BACTERIA E.COLI M-17

A.V.Dragunova,⁶ Yu.P.Zarubin,⁷
N.A.Treshchanina,⁸ Ye.A.Yurkina,⁹
P.P.Purygin¹⁰

Toluene-4-sulfoimidazolidine – azolidine aromatic sulfonic acid were tested on antibacterial activity in the cell enterobacteria *Escherichia coli* M-17. The results obtained confirm that toluene-4-sulfoimidazolidine acted on process division of bacteria, reduces their catalase activity.

⁶Dragunova Alla Viktorovna, Dept. of organic chemistry Samara state university

⁷Zarubin Yuriy Pavlovich, Dept. of organic chemistry Samara state university

⁸Treshchanina Ninella Aleksandrovna, Dept. of biochemistry Samara state university

⁹Yurkina Yelena Aleksandrovna, Dept. of biochemistry Samara state university

¹⁰Purygin Pyotr Petrovich, Dept. of organic chemistry Samara state university