

УДК 579.26+547.541.52.77

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРНЫХ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ N,N'-ТИОКАРБОНИЛ- И N,N'-СУЛЬФУРИЛДИАЗОЛОВ НА ИХ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА¹

© 2007 З.П. Белоусова², Е.С. Селезнева³

Сравнение антибактериальной активности N,N'-тиокарбонил- и N,N'-сульфурилдиазолов в тестах на *Staphylococcus aureus* показало, что N,N'-тиокарбонилдиазолы достоверно сильнее ингибировали рост *Staphylococcus aureus*, чем их сульфурильные аналоги. Выявлена высокая корреляция между величинами дипольного момента, молекулярной массы, молекулярного объема и их антибактериальными свойствами. Обсуждается связь между способностью веществ контактировать с рецепторами на поверхности бактериальных клеток и их пространственной структурой и антибактериальной активностью.

Введение

Биологическая активность соединений зависит от стереохимических и некоторых физико-химических свойств, которые, как правило, определяют механизм их проникновения через мембраны в клетки. Не смотря на большое количество исследований в этой области, до сих пор нет однозначного ответа на вопрос, какие параметры являются наиболее важными в развитии биологического ответа [1-3, 5, 7]. Для проявления одних типов биологической активности необходимым требованием является объемность и трехмерная структура для других – планарность.

И планарные и трехмерные молекулы могут обладать избирательной токсичностью, что используется для получения высокоэффективных фармакологических препаратов и пестицидов. Особый интерес представляют собой гетероциклические азолы, которые являются основным структурным фрагментом многих биологически активных соединений, используемых в медицине и сельском хозяйстве.

¹ Представлена доктором биологических наук О.Н. Макуриной.

² Белоусова Зоя Петровна (zbelousova@mail.ru), кафедра органической химии Самарского государственного университета.

³ Селезнева Екатерина Сергеевна, кафедра зоологии, генетики и общей экологии Самарского государственного университета.

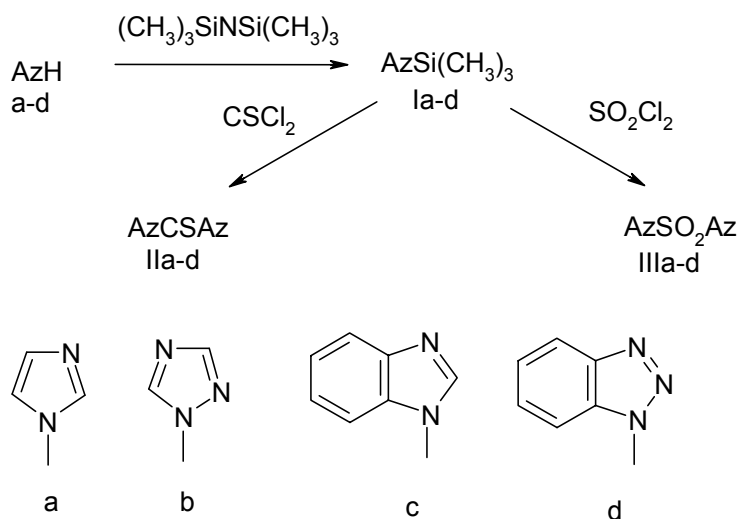
Антибактериальные свойства химических соединений складываются из способности контактировать с мембраной бактериальной клетки и преодолевать мембранный барьер, скорости связывания с мишенью и нарушать клеточный метаболизм, что и вызывает, в конечном счете, гибель бактериальной клетки. Несмотря на многочисленные синтезированные препараты, которые с успехом используются в фармакологической практике общие закономерности, определяющие эффективность антибактериальных свойств не изучены, что заставляет проводить синтез новых препаратов по принципу подобия, направляя усилия на снижение общей токсичности и усиления избирательного действия.

Между тем знание корреляций типа «структура-функция» не только бы облегчил поиск новых эффективных лекарственных средств, но позволил разобратся в механизмах возникновения резистентности прокариот ко многим известным антибактериальным препаратам при длительном их использовании

Целью нашего исследования является изучение влияния на антибактериальные свойства структуры и ряда физико-химических свойств некоторых производных азотсодержащих гетероциклов.

Материал и методы

Исследовали тиокарбонильные и сульфурильные производные имидазола, 1,2,4-триазола, бензимидазола и бензотриазола синтезированные согласно следующей схеме:



Синтез N,N'-тиокарбонилдиимидазола (Im)₂CS (IIa), N,N'-тиокарбонилдитриазола (Tr)₂CS (IIb), N,N'-тиокарбонилдибензимидазола (BzIm)₂CS (IIc) и N,N'-тиокарбонилдибензотриазола (BzTr)₂CS (IId) осуществляли через соответствующие силильные производные азолов реакцией с тиофосге-

ном. N,N'-сульфурилдиимидазол (Im)₂SO₂ (IIIa), N,N'-сульфурилдитриазол (Tr)₂SO₂ (IIIb), N,N'-сульфурилдибензмидазол (BzIm)₂SO₂ (IIIc), N,N'-сульфурилдибензотриазол (BzTr)₂SO₂ (IIId) получали также через силильные производные азолов реакцией с хлористым сульфуром.

Все синтезированные соединения (IIa-d) и (IIIa-d) были очищены и высушены, их физико-химические характеристики совпали с описанными в литературе данными.

Антибактериальная активность оценивалась по способности веществ ингибировать рост *Staphylococcus aureus*, для этого соединения использовали в виде спиртовых растворов в следующих концентрациях: 0,001; 1; 10 мг/мл. Растворителем служил 20% изопропиловый спирт.

Испытания антибактериальной активности проводили в соответствии с «Методическими указаниями по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков». В качестве культуральной среды использовали мясопептонный агар (на 1000 мл мясопептонного бульона 15 г агар-агара, 3 г двузамещенного фосфорнокислого натрия, pH=7,4). Расплавленную среду разливали по 20 мл в стерильные чашки Петри диаметром 100 мм, расположенные на горизонтальной поверхности.

Суспензию бактерий готовили из чистой 20-ти часовой культуры *Staphylococcus aureus*, выращенной на бульонной культуре и разведенной изотоническим раствором хлористого натрия до мутности оптического стандарта ГПСК имени Л.А. Тарасевича на 10 единиц. Затем полученную взвесь разводили в 10 раз. Таким образом, в культуре содержалось $5 \cdot 10^9$ микробных клеток в 1 мл взвеси. Полученную суспензию в объеме 1 мл наносили на поверхность среды, равномерно втирали микробиологическим шпателем и подсушивали в течение 10 мин.

Тест-диски, пропитанные растворами исследуемых веществ, а также контрольные тест-диски, с помощью пинцета накладывали на поверхность засеянной золотистым стафилококком питательной среды на расстоянии 2 см от края чашки.

Всего было 7 повторов. Чашки, в которых располагались тест-диски с веществами в разных концентрациях, помещали в термостат сразу после наложения дисков и инкубировали в течение 24 час.

Контролем служили тест-диски, пропитанные растворителем. Кроме того, был поставлен дополнительный (активный) контроль. Для этого тест-диски пропитывали спиртовыми растворами разных концентраций исходных азолов (имидазол, триазол, бензимидазол и бензотриазол) в тех же концентрациях, что и исследуемые синтезированные диазолы.

Подсчет результатов производили на чашках, перевернутых кверху дном и помещенных на темную матовую поверхность так, чтобы свет настольной лампы падал на них под углом в 15°. Измеряли диаметр зоны ингибирования роста культуры при помощи штангенциркуля. Размер тест-диска был равен 6 мм.

С помощью полного двухфакторного дисперсионного анализа оценивали влияние строения и концентрации соединений на рост *Staphylococcus aureus*. С помощью корреляционного анализа оценивали связь между антибактериальной активностью соединений и их физико-химическими параметрами [4].

Физико-химические параметры: молекулярную массу, молекулярный объем, липофильность, величины дипольного момента и энергии гидратации для соединений I-III a-d, также исходных a-d рассчитали с помощью программы «HyperChem» (см. табл. 1).

Таблица 1

Физико-химические параметры II-III(a-d), рассчитанные с помощью программы «HyperChem»

Соединение	Мол.масса (г/моль)	Мол.объем (Å ³)	LogP	Дип.момент (дебай)	Энерг.гидратации (ккал/моль)
II a	178,21	511,28	-0,59	1,30	-9,33
III a	198,2	527,98	-0,26	0,99	-9,59
II b	180,19	493,67	0,51	0,20	-10,43
III b	200,17	508,3	-0,35	1,06	-11,77
II c	278,33	751,95	-0,07	2,16	-7,93
III c	298,32	773,03	-2,05	2,84	-8,32
II d	280,31	733,24	1,39	3,62	-16,06
III d	300,29	752,32	1,23	6,71	-14,24

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что изопропиловый спирт, используемый как растворитель (тиокарбонильные соединения плохо растворимы в воде), обладает слабой антибактериальной активностью (см. табл. 2)

Таблица 2

Анализ способности N,N'-тиокарбонил- и N,N'-сульфурилдиазолов ингибировать рост *Staphylococcus aureus*

Исследуемые соединения	Диаметр зоны ингибирования роста <i>Staphylococcus aureus</i> при воздействии спиртовых растворов соединений разной концентрации (мм)		
	0,001 мг/мл	1 мг/мл	10 мг/мл
изопропиловый спирт	7,1	7,2	7,1
a	6,5	7,4	8,4
IIa	6,8	8,7	10,0
IIIa	6,7	7,6	9,6
b	6,4	6,7	7,4

Продолжение таблицы 2

IIb	6,8	7,6	8,4
IIIb	6,7	6,9	7,5
c	6,5	8,3	10,1
IIc	6,7	8,2	11,8
IIIc	6,4	7,9	11,5
d	6,6	8,1	11,1
IId	6,8	9,4	12,6
IIId	6,8	8,1	11,9

Все проанализированные соединения проявили слабую антибактериальную активность, причем в концентрации 0,001 мг/мл их способность ингибировать рост *Staphylococcus aureus* оказалась ниже, чем у изопропилового спирта. Таким образом, в низких концентрациях соединения (a-d) и II-III(a-d) обладали слабыми протекторными свойствами, снижая токсическое действие изопропилового спирта. Это совпадает с результатами, полученными нами ранее для нитропроизводных имидазола [6].

В более высоких концентрациях, исследованных нами, все соединения проявили более высокую антибактериальную активность (см. таблица 2). Как видно из представленных результатов N,N'-тиокарбонил- и N,N'-сульфурилдиазолы II-III (a-d) оказались токсичнее исходных азолов (a-d) ($p < 0,05$).

Анализируя антибактериальную активность азолов в высокой концентрации (10 мг/мл) мы обнаружили, что тиокарбонильные производные: N,N'-тиокарбонилдиимидазол (Im)₂CS (IIa), N,N'-тиокарбонилдитридазол (Tr)₂CS (IIb), N,N'-тиокарбонилдобензимидазола (BzIm)₂CS (IIc) и N,N'-тиокарбонилдобензотриазол (BzTr)₂CS (IIId), N,N'-сульфурилдобензотриазол (BzTr)₂SO₂ (IIId) получали достоверно ($p < 0,05$) сильнее ингибируют рост *Staphylococcus aureus*, чем их сульфурильные аналоги: N,N'-сульфурилдиимидазол (Im)₂SO₂ (IIIa), N,N'-сульфурилдитриазол (Tr)₂SO₂ (IIIb), N,N'-сульфурилдобензимидазол (BzIm)₂SO₂ (IIIc), N,N'-сульфурилдобензотриазол (BzTr)₂SO₂ (IIId).

Построив с помощью программы «HyperChem» пространственные модели анализируемых азолов мы обнаружили, что все тиокарбонильные производные представляют собой планарные структуры, как и их исходные азолы. На рис.2 в качестве примера обнаруженной зависимости представлены тиокарбонильное и сульфурильное производные бензотриазола.

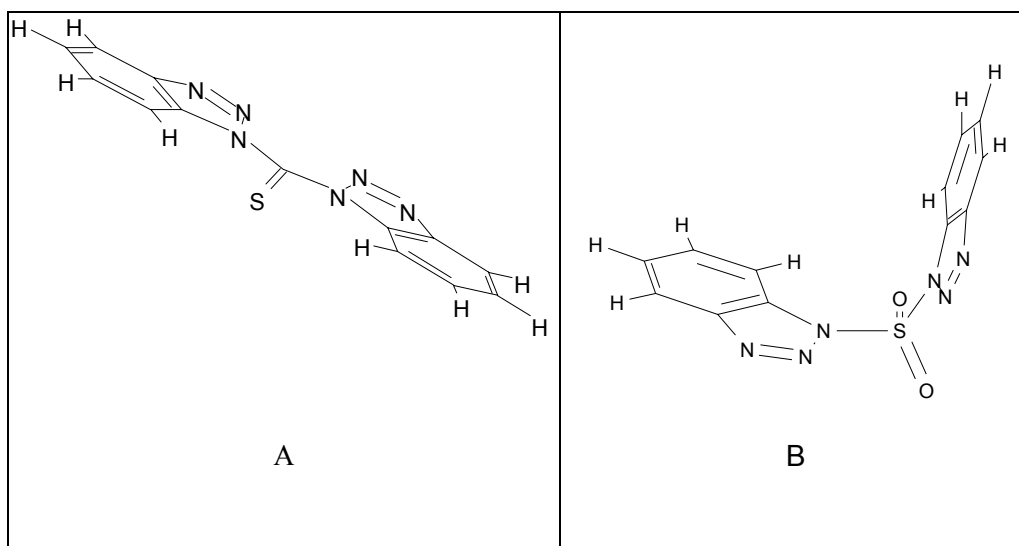
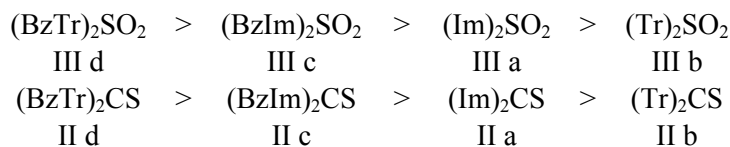


Рис. 2. Пространственная структура А – N,N'-тиокарбонилдибензотриазола,
В – N,N'-сульфурилдибензотриазол.

По видимому сульфурильные производные за счет электростатических свойств группы «SO₂», потеряли планарность, так как планарное кольцо одного азола, находятся в плоскости под углом к плоскости второго планарного кольца, создавая больший объем молекулы, чем у тиокарбонильных производных (см. рис.2)

Таким образом, видно, что химическая группа, которая формирует и определяет пространственную структуру молекулы диазола, определяет и антибактериальную активность соединения. Можно отметить еще одну особенность: все диазолы, в состав которых входило бензольное кольцо (III d, III c, II d, II c), обладают достоверно более высокой антибактериальной активностью, чем диазолы не имеющих это кольцо (III a, III b, II a, II b)

Проведенный полный двухфакторный дисперсионный анализ показал, что антибактериальная активность исследуемых соединений достоверно ($p < 0,05$) убывает в следующих рядах:



Анализ связи между антистафилококковой активностью и физико-химическими параметрами исследованных соединений выявил высокую положительную корреляцию с рядом параметров. Так коэффициент корреляции между антибактериальной активностью и молекулярной массой составляет 0,8, а с молекулярным объемом и величиной дипольного момента – 0,9 и 0,7, соответст-

венно. Мы не обнаружили корреляции между токсичностью II-III(a-d) и величиной энергии гидратации, а также липофильности (LogP). С нашей точки зрения обнаруженные корреляции свидетельствуют в пользу того, что исследованные соединения проникают внутрь клеток через специализированные рецепторы, наподобие имидазолин-гуанидиновых, обнаруженных у эукариот [8].

Изменение пространственного расположения отдельных фрагментов молекулы относительно ее оси приводит к изменению ее конформаций, например делая молекулу менее планарной. В природе планарность молекулы играет исключительную роль при взаимодействии ее с рецепторными белками. Например, способность ацетилхолина к стимулированию одного из двух холинорецепторов определяется его нахождением в двух различных конформациях, а холинолитический эффект различных атропинподобных веществ во многом определяется конформационным сходством с медиатором – антагонистом [2].

Имидазол (a), 1,2,4-триазол(b), бензимидазол(c) и бензотриазол(d), использованные нами в эксперименте, относятся к планарным. Тиокарбонильные производные N,N'-тиокарбонилдиимидазол (Im)₂CS (IIa), N,N'-тиокарбонилдитриазол (Tr)₂CS (IIb), N,N'-тиокарбонилдибензимидазол (BzIm)₂CS (IIc) и N,N'-тиокарбонилдибензотриазол (BzTr)₂CS (IIId), сохраняют также планарность. Однако не планарные производные: N,N'-сульфурилдиимидазол (Im)₂SO₂ (IIIa), N,N'-сульфурилдитриазол (Tr)₂SO₂ (IIIb), N,N'-сульфурилдибензимидазол (BzIm)₂SO₂ (IIIc) и N,N'-сульфурилдибензотриазол (BzTr)₂SO₂ (IIId) – также способны контактировать с имидазолиновыми рецепторами, однако контакт по-видимому более затруднен стерически. Возможно в удержании вещества рецептором играет роль и молекулярный объем, который у тиокарбонильных производных II(a-d) меньше, чем у сульфурильных III(a-d). Нельзя не учитывать и особенности электронного строения тиокарбонильной группы, которая является более реакционно-способной по сравнению с сульфурильной. Облегчая контакт с рецептором, она также вносит вклад в негативное изменение метаболизма, что мы и наблюдали в нашем случае.

Список литературы

- [1] Альберт, А. Избирательная токсичность / А. Альберт. – М.: Медицина, 1989. – Т.2. – 428 с.
- [2] Голиков, С.Н. Стереоспецифичность действия лекарственных веществ / С.Н. Голиков, С.Г. Кузнецов, Э.П. Зацепин. – Л.: Медицина, 1975. – 185 с.
- [3] Закусов, В.В. Общая характеристика действия лекарственных средств / В.В. Закусов, И.Р. Комиссаров, В.Н. Синюхин // Клиническая фармакология. – М.: Медицина, 1978. – С. 35-61.
- [4] Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
- [5] Оксенгендлер, Г.И. Яды и организм / Г.И. Оксенгендлер. – Санкт-Петербург: Наука, 1991. – 317 с.

- [6] Селезнева, Е.С. Изучение механизмов биологической активности 2, 2'-диимидазола и его нитропроизводных / Е.С. Селезнева, З.П. Белоусова, Е.И. Теньгаев // Известия СХЦ РАН, 2003, спец. вып. «Актуальные проблемы экологии», В.2. – С. 326-333.
- [7] Barratt, M.D. Prediction of toxicity from chemical structure / M.D. Barratt // Cell Biology and Toxicology. – 2000. – V.16. – P. 1-13.
- [8] Visualization of multiple imidazoline/guanidinium-receptive sites / S.M. Lanier [et.al.] // J. Biol. Chem. – 1993. – V. 268 (210). – P. 16047-16051.

Статья поступила в редакцию 25/IX/2006;
в окончательном варианте – 26/XII/2006.

EFFECT OF STRUCTURAL AND PHYSICO-CHEMICAL FEATURES OF N,N'-THYOCARBONYL- AND N,N-SULPHURILDIAZOLES ON THEIR ANTIBACTERIAL ACTIVITIES⁴

© 2006 Z.P. Belousova⁵, E.S. Selezneva⁶

Comparing of N,N'-thyocarbonyl- and N,N-sulphurildiazoles antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* demonstrates that N,N'-thyocarbonyldiazoles inhibited the growth of microbe-biotest markedly stronger than sulphuril analogs. The high-level correlation among the dipole moment, molecular weight, molecular volume and their antibacterial features is shown. The possible connection of substances ability to contact the membrane receptors, antibacterial activity and their spatial structure are discussed.

Paper received 25/IX/2006.

Paper accepted 26/XII/2006.

⁴ Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. O.N. Makurina.

⁵ Belousova Zoya Petrovna, Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.

⁶ Selezneva Ekaterina Sergeevna, Dept. of Zoology, Genetics and General Ecology, Samara State University, Samara, 443011, Russia.