УДК 582.282.23.045

Н. В. Шматкова[1], О. Ю. Зінченко[2], І. Й. Сейфулліна[1], Т. О. Філіпова[2], В. А. Лерер[2]
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
[1]хімічний факультет, кафедра загальної хімії та полімерів,
e-mail: nshmatkova@ukr.net, тел.(0482)32-61-70
[2] біологічний факультет, кафедра мікробіології і вірусології,
e-mail: farmikr@mail.ru , тел.(0482)68-79-64
Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна

ВПЛИВ ІЗОНІКОТИНОЇЛГІДРАЗОНІВ 2-ГІДРОКСИНАФТ-, 4-ДІМЕТИЛАМІНОБЕНЗАЛЬДЕГІДІВ ТА ЇХ КОМПЛЕКСІВ ЗІ Sn(IV) НА РІСТ УМОВНО-ПАТОГЕННИХ БАКТЕРІЙ

Досліджено вплив ізонікотиноїлгідразонів 2-гідроксинафт-(H_2Inf, I), 4-диметиламінобензальдегідів HIdb(II) і відповідних комплексів стануму [$SnCl_3$(Inf·H)] (III), [H_2Inf·H]$_2$[$SnCl_6$] (IV), [$SnCl_3$(Idb·H)] (V) на ріст умовно-патогенних бактерій. Показано, що досліджені сполуки у концентраціях 25, 50 та 100 мкг/мл здатні значно пригнічувати накопичення біомаси тест-штамів *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* та *M. luteus*. У всіх сполук виявлено високу інгібувальну дію щодо культури *P. Vulgaris* та найменшу чутливість до *E. coli*. Найвищу активність щодо більшості мікроорганізмів виявили сполуки I та IV.

Ключові слова: ізонікотиноїлгідразони, комплекси стануму(IV), умовно-патогенні бактерії, антимікробний ефект.

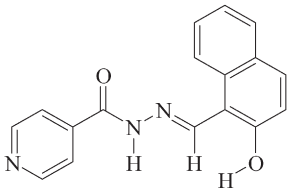
Раніше нами було виявлено, що комплекси германію(IV) та стануму (IV) з ізоникотиїлгідразоном 2-гідроксибензальдегіду здатні пригнічувати ріст умовно-патогенних мікроорганізмів, причому найбільш високу антибактеріальну активність та найширший її спектр проявляє вихідний гідразон, а дещо нижчу комплекс Sn(IV).[1]. Отримані дані підтвердили відоме з літератури, що комплекси гідразонів, зокрема Sn(IV) [2], характеризуються антибактеріальними властивостями, на які суттєво впливає природа центрального атому та наявність і положення замісників в молекулі гідразонів [3]. Останнім також притаманна різноманітна фізіологічна дія [4]. Необхідність подолання мікробної резистентності обумовила продовження сумісного (хіміків та мікробіологів) дослідження антимікробної активності нових комплексів Sn(IV) з гідразонами. Була сформульована мета даної роботи — визначити вплив заміни альдегідного фрагменту в молекулі ізонікотиноїлгідразону, комплексоутворювача стануму (IV) та будови відповідних комплексів на ріст умовно-патогенних бактерій.

Матеріали та методи дослідження

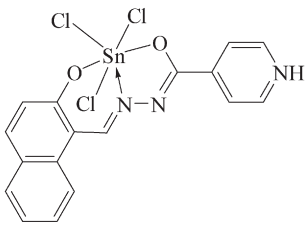
Ізонікотиноїлгідразони отримано реакцією конденсації гідразиду ізонікотинової кислоти з 2-гідроксинафтальдегідом (I) та 4-диметиламінобензальдегідом (II) за загальною методикою [5]. Комплекси стануму(IV) складу

 © Н. В. Шматкова, О. Ю. Зінченко, І. Й. Сейфулліна, Т. О. Філіпова, В. А. Лерер, 2009

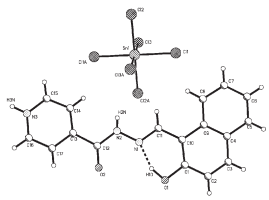
$[SnCl_3(Inf{\cdot}H)]$ (III), $[H_2Inf{\cdot}H]_2[SnCl_6]$ (IV), $[SnCl_4(Idb{\cdot}H)]$ (V) вперше синтезовано на кафедрі загальної хімії та полімерів Одеського національного університету імені І. І. Мечникова взаємодією $SnCl_4$ з гідразонами в неводних середовищах [6]. Отримані сполуки охарактеризовано сукупністю фізико-хімічних методів дослідження: ІЧ та ПМР спектроскопія, мас-спектрометрія, електропровідність, термогравіметрія, рентгено-структурний аналіз (комплекси III, IV) [6]. Схеми будови гідразонів і комплексів наведені на рис. 1.



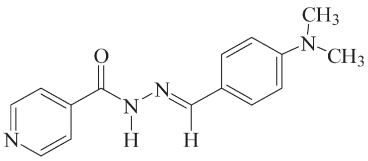
H_2Inf (I),
M = 291 г/моль



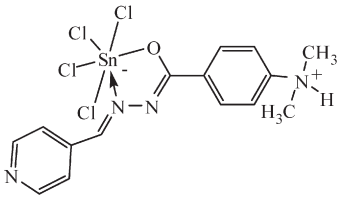
$[SnCl_3(Inf{\cdot}H)]$ (III)
M = 515,2 г/моль



Фрагмент структури
$[H_2Inf{\cdot}H]_2[SnCl_6]$(IV)
M = 915,7 г/моль



H_2Idb(II), M = 256 г/моль



$[SnCl_4(Idb{\cdot}H)]$(V), M = 528,7 г/моль

Рис. 1. Будова гідразонів та відповідних комплексів стануму(IV)

При вивченні антибактеріальних властивостей досліджених сполук як тест-мікроорганізми використовували штами бактерій *Staphylococcus aureus* АТСС 25923, *Escherichia coli* АТСС 25922, *Proteus vulgaris* АТСС 6896, *Pseudomonas aeruginosa* АТСС 27853, *Bacillus subtilis* АТСС 6633 та *Micrococcus luteus* АТСС 4698, отримані з музею культур мікроорганізмів Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського АМН України. Зберігання тест-штамів здійснювали на поверхні скошеного м'ясопептонного агару (МПА) за температури 4 °С. Для досліджень використовували добові культури, вирощені в пробірках на скошеному МПА при 37 °С.

Для визначення антибактеріальної активності сполук I–V готували робочі розчини, які містили по 5,0 мг, 2,5 мг та 1,25 мг кожної речовини в 1 мл диметилсульфоксиду. У дослідні пробірки відбирали по 20 мкл робочих розчинів та доводили об'єм до 1 мл рідким середовищем Гісса з глюкозою без індикатора Андреде.

Таким чином, кінцева концентрація сполук у середовищі становила 25, 50 та 100 мкг/мл. Кількість паралелей для кожної концентрації дорівнювала 5. Пробірки з середовищем стерилізували в автоклаві при 0,5 атм [7]. Усі експерименти проводили у 3 повторах.

Культури тест-мікроорганізмів змивали стерильним фізіологічним розчином. Концентрацію отриманої суспензії визначали за калібрувальною кривою, вимірюючи оптичну густину за допомогою спектрофотометру «Spekol-10» (Німеччина). Суспензію клітин розводили фізіологічним розчином до концентрації $2 \cdot 10^4$ клітин/мл. З отриманого інокуляту відбирали по 50 мкл та вносили до кожної експериментальної пробірки, отримуючи кінцеву концентрацію $1 \cdot 10^3$ КУО/мл. Культури інкубували в термостаті при температурі 37 °С протягом 24 годин. Інтенсивність росту тест-штамів визначали за оптичною густиною культури, яку вимірювали на спектрофотометрі "Spekol-10" при довжині хвилі 540 нм. За контроль правили культури мікроорганізмів, паралельно вирощені в середовищі Гісса без додавання досліджуваних речовин.

Результати дослідження

Встановлено, що сполуки (I–V) по різному впливають на ріст умовно-патогенних бактерій в залежності від концентрації (25, 50, 100 мкг/мл) і культури тест-штамів бактерій. Вони здатні викликати як пригнічувальний, так і стимулюючий ефекти. В табл. 1 зведено результати проведеного дослідження.

Таблиця 1

Вплив (інгібувальний або стимулюючий*) сполук I–V (%) на ріст тест-штамів бактерій

Сполука	Концентрація, мкг/мл	Тест-штам					
		S. aureus	B. subtilis	M. luteus	E. coli	P. vulgaris	P. aeruginosa
	25	29.3*	72,0*	29,8*	46,0*	23,3	35,8*
	50	73,3	3,7	97,0	2,7*	100	100
H_2Inf (I)	100	100	91.4	84,8	72,3	100	91,9
	25	21.6	67.3	55,4	0,7	100	6,9*
	50	17.5	55.8	49,3	6,1	100	6,3*
H_2Idb(II)	100	5.6*	100	63,1	20,3	100	20,8
	25	2,9	30,3	2,8	13,4*	100	20,6
	50	37,0	31,8	23,3	1,8	100	85,9
$[SnCl_3(HInf \cdot H)]$(III)	100	81,6	61,6	87,8	41,3	100	100
	25	28,4	13,4*	10,9	4,5*	100	2,3
	50	18,1	20,6*	43,6	18,0*	100	84,7
$[H_2Inf \cdot H]_2[SnCl_6]$(IV)	100	89,2	61,6	75,0	55,1	100	85,8
	25	6,4*	81,7	97.8	13,6*	44,6*	31,4
	50	20,4	92,0	95.5	1,3	50,6	46,7
$[SnCl_4(Idb \cdot H)]$(V)	100	34,2	100	71,6	12,5	100	54,6

Примітка: * — стимуляція росту.

Виявлено, що гідразон H_2Inf (I) в максимальній з використаних концентрацій викликає 100% пригнічення росту культури *S. aureus*. (табл. 1, рис. 2). При цьому спостерігається така залежність: зі зменшенням концентрації H_2Inf інгібуючий ефект дещо знижується, а при 25 мкг/мл спостерігається стимуляція росту бактерій на 29,3%. Повністю інша залежність спостерігається при введенні HIdb(II): при максимальній концентрації відбувається незначна стимуляція росту цієї культури, а при її зменшенні — інгібування. Слід відмітити, що сполука II по відношенню до всіх останніх культур при концентрації 100 мкг/мл є інгібітором, при цьому зменшення біомаси (%) відбувається у залежності: *B. subtilis* = *P.vulgaris* >*M. luteus* >*P. aeruginosa* ≈ *E. coli*. При додаванні до поживного середовища з *S. aureus* 100 мкг комплексів $[SnCl_3(Inf{\cdot}H)]$(III), $[H_2Inf{\cdot}H]_2[SnCl_6]$(IV) також спостерігається пригнічувальний вплив, однак у дещо меншому ступені у порівнянні з вихідним гідразоном (II). Зі зменшенням концентрації інгібуючий вплив по різному змінюється в залежності від комплексу: у випадку (III) він зменшується при концентрації 25 мкг/мл, а у випадку (IV) він проходить через мінімум при 50 мкг/мл, а потім збільшується при 25 мкг/мл до рівня 28,4%. Інгібуюча активність комплексу $[SnCl_4(Idb{\cdot}H)]$ (V) змінюється антибатно у порівнянні з активністю вихідного гідразону(II): в максимальній концентрації він пригнічує ріст культури, а в мінімальній незначно стимулює (рис. 2).

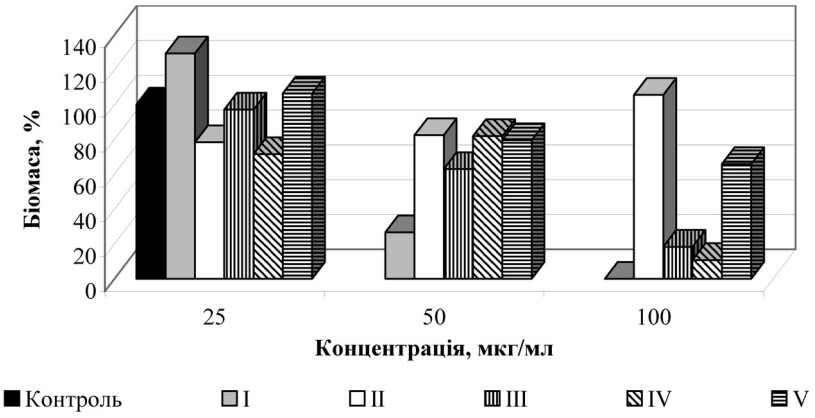


Рис. 2. Накопичення біомаси тест-штаму *S. aureus* за присутності сполук I–V

У випадку культури *B. subtilis* гідразони H_2Inf (I), HIdb (II) при максимальній концентрації проявляють високу активність (91,4 (I), 100 % (II)) (рис. 3). Однак, при зниженні їх вмісту в середовищі до 50 мкг/мл інгібуючий ефект зменшується до 3,7% і 55,8 % для I, II відповідно. При мінімальній концентрації (I) виявляє вже стимулюючий ефект (72 %), а (II) дещо збільшує інгібуючий до 67,3 %. При концентрації 100 мкг/мл комплекси III, IV однаково інгібують цю культуру (зменшення біомаси на 61,6 %), але, у порівнянні з вихідним гідразоном (II), значно менше. Різниця між III та IV простежується при концентраціях 50 та 25 мкг/мл:

III викликає зменшення біомаси, а IV, навпаки, збільшення. Активність комплексу V при 100 мкг/мл, так само, як і вихідного гідразону, зберігається на рівні 100%, але, на відміну від нього, залишається високою при зниженні концентрації.

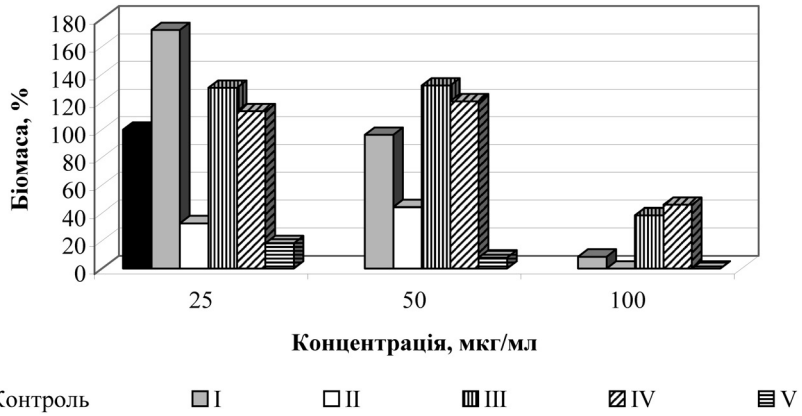


Рис. 3. Накопичення біомаси тест-штаму *B. subtilis* за присутності сполук I–V

На прикладі бактеріального середовища з *M. luteus* простежується різниця дії H_2Inf(I) та H_2Idb(II): у першого при концентраціях 100 та 50 мкг/мл спостерігається високий інгібуючий ефект, а при 25 мкг/мл стимулюючий, у той час, як у другого за всіх вказаних концентрацій спостерігається приблизно однакове інгібування на рівні 63–55 % (рис. 4). Комплекси III, IV, так само, як і H_2Inf, при концентрації 100 мкг/мл демонструють достатньо високу активність 87,8 % (III) та 75 % (IV), а при 25 мкг/мл різко втрачають її. Комплекс (V) спричиняє більш сильний, у порівнянні з відповідним гідразоном(II), пригнічувальний ефект, який навіть дещо збільшується при зменшенні концентрації (V): 71,6 % (100 мкг/мл), 95,5 % (50 мкг/мл) та 97,8 % (25 мкг/мл).

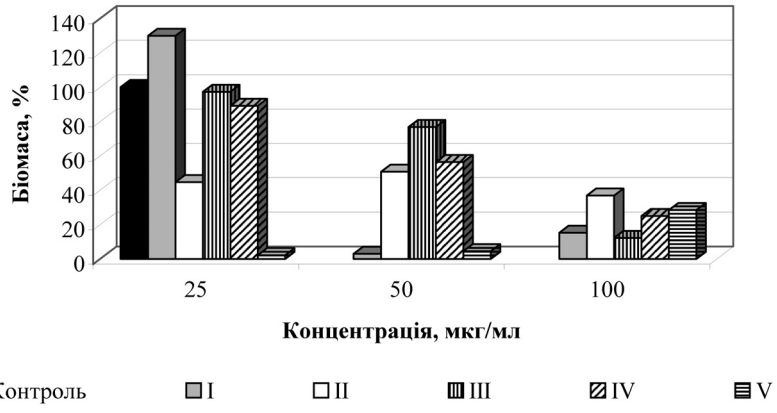


Рис. 4. Накопичення біомаси тест-штаму *M. luteus* за присутності сполук I–V

При порівнянні впливу H_2Inf(I) і відповідних комплексів III, IV на ріст культури *E. coli* (рис. 5) було виявлено, що вони зі зменшенням концентрації однаково викликають інгібуючий ефект, який змінюється на стимулюючий, правда активність гідразона дещо більша, ніж у комплексів. Гідразон H_2Idb(II) незалежно від концентрації не спричиняє помітного впливу на *E. coli*, а активність відповідного комплексу (V) навіть знижується.

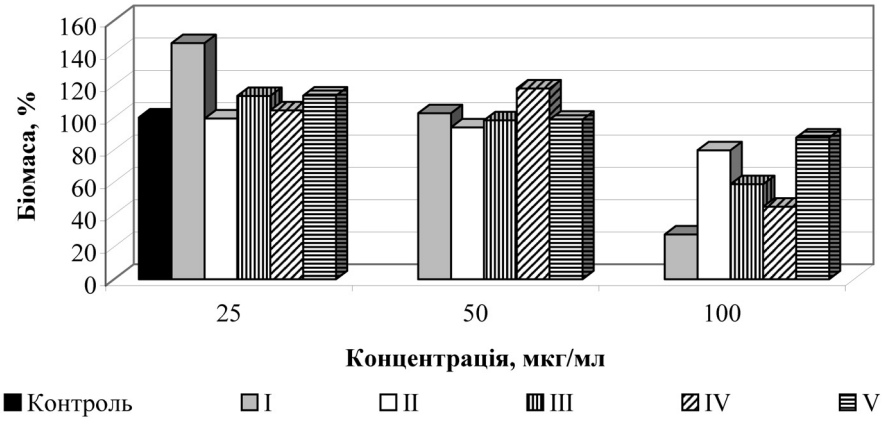


Рис. 5. Накопичення біомаси тест-штаму *E. coli* за присутності сполук I–V

Обидва гідразони повністю інгібують ріст культури *P. vulgaris* у максимальній концентрації. Ефект зберігається на тому ж рівні у випадку H_2Inf при концентрації 50 мкг/мл, а для HIdb і при 25 мкг/мл (рис. 6). У цьому випадку активність комплексів III, IV виявилась вищою, ніж у вихідного гідразону(I): 100 %-ве пригнічення росту незалежно від концентрації комплексів. Комплекс (V) спричиняє таку ж дію, але тільки у концентрації 100 мкг/мл.

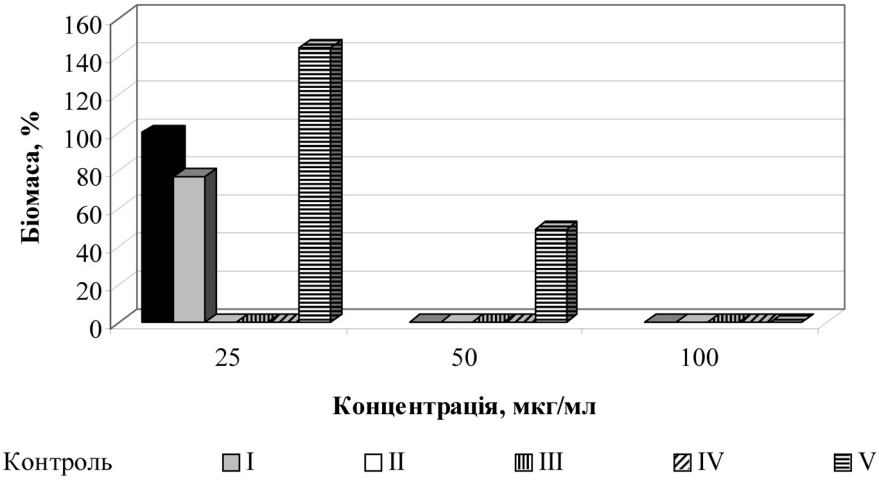


Рис. 6. Накопичення біомаси тест-штаму *P. vulgaris* за присутності сполук I–V

По відношенню до культури *P. aeruginosa* H_2Inf також виявляє високий інгібувальний ефект у концентрації 100 та 50 мкг/мл, однак, у мінімальній концентрації спричиняє стимулювальний (рис. 7). У порівнянні з H_2Inf комплекси III, IV ефективно інгібують ріст цієї культури як при 100 мкг/мл — 100 %(III), 85,8 % (IV), так і при 50 мкг/мл — 85,9 %(III), 84,3(IV). На відміну від H_2Inf, гідразон HIdb практично не діє на цей мікроорганізм навіть у максимальній концентрації, а при зниженні спричиняє вже стимулювальний ефект. Для відповідного комплексу (V) останнє не притаманно, однак його інгібувальна активність не перевищує 54,6 % навіть при концентрації 100 мкг/мл.

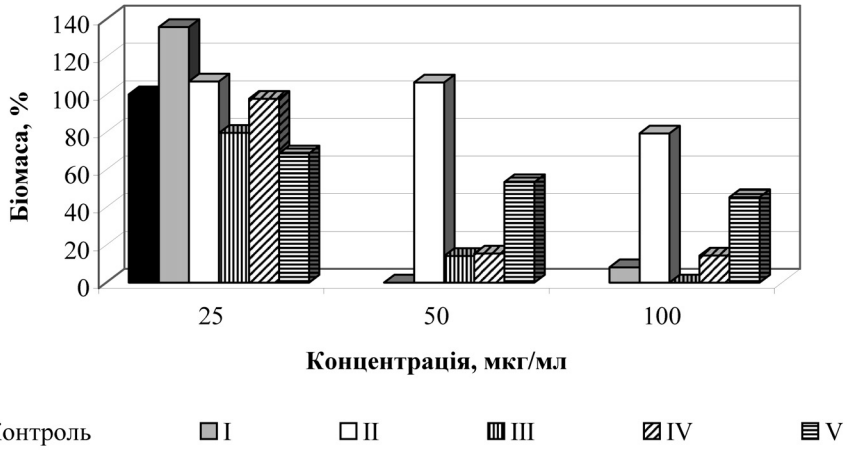


Рис. 7. Накопичення біомаси тест-штаму *P. aeruginosa* за присутності сполук I–V

Висновки

Порівнюючи активність досліджених сполук щодо окремих штамів (табл. 2), можна стверджувати, що найбільш високою активністю по відношенню до клітин стафілокока відрізнялися I, III та IV, які у максимальній концентрації викликали пригнічення росту *S. aureus* більше, ніж на 80 %. Культура *B. subtilis* найвищу чутливість виявила до I, II та V (пригнічення росту більше 90 %). Ріст *M. luteus* найефективніше пригнічували I, III та V, причому I та II у концентраціях 50 та 25 мкг/мл відповідно викликали більш потужний ефект, ніж сполука V у максимальній концентрації. Клітини *E. coli* в цілому виявилися найменш чутливими до досліджених сполук: так, найбільш значне інгібування, яке становило 72,3 %, спостерігалося лише у присутності сполуки I в максимальній концентрації. Цікаво, що ріст *P. vulgaris*, відомого своєю резистентністю до широкого кола антимікробних засобів, повністю пригнічували всі досліджені сполуки, причому II, III та IV у мінімальній концентрації. Сполуки I, III та IV ефективно пригнічували ріст *P. aeruginosa*, яка також характеризується високим рівнем антибіотикорезистентності.

Таблиця 2

Концентрація досліджуваних сполук (мкг/мл), що викликає максимальне інгібування росту (%) тест-штамів

Сполука Штам	$H_2Inf(I)$	$H_2Idb(II)$	$[SnCl_3$ (HInfH)](III)	$[H_2Inf\ H]_2$ $[SnCl_6](IV)$	$[SnCl_4$ (Idb·H)](V)
	Концентрація (мкг/мл) / максимальне інгібування росту (%) штамів бактерій				
S. aureus	100 / 100	25 / 21,6	100 / 81,6	100 / 89,2	100 / 34.2
B. subtilis	100 / 91,4	100 / 100	100 / 61,6	100 / 61,6	100 / 100
M. luteus	50 / 97,0	100 / 63,1	100 / 87,8	100 / 75,0	25 / 97.8
E. coli	100 / 72,3	100 / 20,3	100 / 41,3	100 / 55,1	100 / 12.5
P. vulgaris	50 / 100	25 / 100	25 / 100	25 / 100	100 / 100
P. aeruginosa	50 / 100	100 / 20,8	100 / 100	100 / 85,8	100 / 54.6

Аналіз антимікробного спектру кожної сполуки показав, що найбільш активними щодо усіх тест-штамів були I та IV. При цьому, інгібувальний ефект першої був вищим. Таким чином, було доведено, що специфіку впливу на ріст умовно-патогенних бактерій визначають особливості складу і будови I–V та ступінь їх комплементарності до кожного з розглянутих текст-штамів.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Шматкова Н. В., Зінченко О. Ю., Сейфулліна І. Й., Філіпова Т. О., Подуст В. С.* Вплив ізонікотиноїлгідразона 2-гідроксибензальдегіду та його комплексів на ріст умовно-патогенних бактерій // Вісник ОНУ. 2009. — Т. 14, № 4 — С. 67–73.
2. *Malhotra Rajesh, Kumar Sudhir, Dhindsa Kuldip Singh.* Synthesis, characterization and antimicrobial activity of organotin and organosilicon complexes of substituted hydrazones // Indian J. Chem. — 1997. — Vol. 4A. — P. 321–323.
3. *Зеленин К. Н.* Физиологически активные комплексы гидразонов // СОЖ. — 1996. — № 12. — С. 41–46.
4. *Зеленин К. Н., Хорсеева Л. А., Алексеев В. В.* Физиологически активные комплексы гидразонов // Хим.-фарм. журн. — 1992. — Т. 26, № 5. — С. 30–36.
5. *Вейганд-Хильгетаг.* Методы эксперимента в органической химии: Пер. с нем. — М.: Химия, 1968. — 944 с.
6. *Сейфуллина И. И., Шматкова Н. В.* Новый этап в развитии координационной химии ароил-(пиридиноил)гидразонов замещенных бенз-(1-нафт)альдегидов // Вісник ОНУ. — 2007. — Т. 13, № 2. — С. 5–26.
7. *Справочник* по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М. О. Биргера. — М.: Медицина, 1972. — С. 175–177.

Н. В. Шматкова[1], О. Ю. Зинченко[2], И. И. Сейфуллина[1], Т. О. Филиппова[2], В. А. Лерер [2]
Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова
[1] химический факультет, кафедра общей химии и полимеров,
[2] биологический факультет, кафедра микробиологии и вирусологии,
Дворянская, 2, Одесса 65082, Украина

ВЛИЯНИЕ ИЗОНИКОТИНОИЛГИДРАЗОНОВ 2-ГИДРОКСИНАФТ-, 4-ДИМЕТИЛАМІНОБЕНЗАЛЬДЕГИДОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ С SN (IV) НА РОСТ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Резюме
Исследовано влияние изоникотиноилгидразонов 2-гидроксинафт-(H_2Inf, I), 4-диметиламинобензальдегидов (HIdb(II)) и соответствующих комплексов олова [$SnCl_3$(Inf·H)] (III), [H_2Inf H]$_2$[$SnCl_6$] (IV), [$SnCl_3$(Idb·H)] (V) на рост условно-патогенных бактерий. Показано, что соединения I–V при концентраціях 25, 50 и 100 мкг/мл способны значительно угнетать накопление биомассы тест-штаммов *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* та *M. luteus*. Все соединения обладают высоким ингибирующим действием на культуру *P. Vulgaris* и наименее чувствительны к *E. coli*. Наибольшую активность к большинству микроорганизмам проявили соединения I, IV.

Ключевые слова: изоникотиноилгидразоны, комплексы олова(IV), условно-патогенные бактерии, антимикробный эффект.

N. V. Shmatkova[1], O.Yu. Zinchenko[2], I. I. Seifullina[1], T. O. Philippova[2], V. A. Lerer[2]
Odesa National Mechnykov University
[1] Chemical Department, general chemistry and polymers chair,
[2] Biological Department, microbiology and virology chair
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65082

THE INFLUENCE OF IZONICOTINOILHYDRAZONE 2-HYDROXYNAPHT-, 4-`DIMETHILAMINOBENZALDEHYDES AND ITS SN(IV) COMPLEXES ON OPPORTUNISTIC BACTERIA GROWTH

Summary
The influence of izonicotinoilhydrazone 2-hydroxynapht-(H_2Inf, I), 4-dimethilaminobenzaldehydes (HIdb(II)) and its complexes with tin(IV) [$SnCl_3$(Inf·H)] (III), [H_2Inf H]$_2$[$SnCl_6$] (IV), [$SnCl_3$(Idb·H)] (V) on the opportunistic bacteria growth has been investigated. It has been shown that studied compounds are able to suppress the biomass increase of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *M. luteus* and *P. vulgaris* test-strains at concentrations 25, 50 and 100 μg per ml. All compounds have demonstrated the highest activity towards *P. vulgaris*. The most wide spectrum of antimicrobial activity have demonstrated compounds I, IV.

Key words: izonicotinoilhydrazone, complexes of tin(IV), opportunistic bacteria, antimicrobial effect.