

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 616.9 – 093/098:547.789

СОКОЛОВА Татьяна Николаевна

АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ
5-НИТРОТИАЗОЛА

03.00.07 – микробиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Минск, 2005

Работа выполнена в учреждении образования
«Гродненский государственный медицинский университет»

- Научный руководитель:** доктор медицинских наук, профессор
Цыркунов В.М. учреждение образования
«Гродненский государственный
медицинский университет», зав. кафедрой
инфекционных болезней
- Официальные оппоненты:** доктор медицинских наук, профессор
Римжа М.И. заместитель министра
здравоохранения Республики Беларусь
- кандидат медицинских наук, доцент
Королевич М. П. учреждение образования
«Белорусский государственный
медицинский университет», доцент кафедры
клинической фармакологии
- Опонирующая организация:** учреждение образования «Витебский
государственный медицинский университет»

Защита диссертации состоится « 20 » апреля 2005 г. в 14⁰⁰ часов на заседании совета по защите диссертации Д03.18.05 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Республики Беларусь по адресу: 220116 г. Минск, проспект Держинского, 83, тел. 272-55-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Автореферат разослан « ____ » марта 2005 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций,
кандидат медицинских наук, доцент

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

В настоящее время наблюдается возрастающая роль инфекций в общей патологии, рост заболеваемости и летальности от новых и вновь возникающих инфекций во всем мире (В.П. Филонов, 2004; Л.П. Титов, 2004). Кроме этого, в последние годы нарастает удельный вес госпитальных штаммов бактерий устойчивых к антибиотикам и дезинфектантам (А.А. Адарченко, 1997; Н.А. Семина и др., 1998). В связи с этим весьма актуальным является поиск новых антимикробных химиотерапевтических препаратов.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению возможности химической модификации известных, хорошо зарекомендовавших себя в медицинской практике химиотерапевтических препаратов (С.М. Навашин 1998). С другой стороны, одним из путей повышения эффективности антимикробной терапии является «переоценка возможностей старых препаратов» с выявлением их не востребуемых свойств, а также направленный синтез новых производных с целью усиления их антимикробного действия (С.М. Навашин 1998, В.М. Семенов, 2004). Примером использования старых препаратов по новому назначению может служить нитазол – производное 5-нитротиазола, который применяется в качестве противопаразитарного средства при заболеваниях, вызванных трихомонадами и другими простейшими (М.Д. Машковский, 2004). В последующем, в 80-90-х годах, были установлены высокие антибактериальные свойства нитазола и широкий спектр его активности в отношении многих микроорганизмов (В.С. Топузов и др., 1990, Л.А. Блатун и др., 1998, Н.Ф. Калиниченко, 1998).

В Гродненском государственном медицинском университете впервые были синтезированы различные производные 5-нитротиазола (51 вещество). По синтезу 5 производных был получен патент Республики Беларусь (№1046, «Производные 5-нитротиазола, обладающие противомикробной активностью»). В связи с этим представлялось актуальным изучить антибактериальную активность новых синтезированных производных 5-нитротиазола, и выделить наиболее активные соединения, которые могут быть перспективными в плане дальнейшего получения антимикробных препаратов.

Связь работы с научными программами, темами

Работа выполнена в рамках плановых НИР в Гродненском государственном медицинском университете: «Поиск биологически активных веществ в ряду алкандиондидамидов и модифицированных природных полисахаридов», № гос. регистрации - 1993297, «Функциональное состояние микробиоценоза кишечника при различной патологии желудочно-кишечного тракта», № гос. регистрации - 1999224.

Цель и задачи исследования

Цель исследования - оценить антимикробную активность (in vitro) новых производных 5-нитротиазола.

В соответствии с поставленной целью в *задачи исследования* входило:

1. Осуществить синтез новых производных 5-нитротиазола.
2. Провести скрининг (in vitro) антимикробной активности новых производных 5-нитротиазола на музейных штаммах различных микроорганизмов.
3. Провести углубленную качественную (индивидуальная, среднегеометрическая, среднеарифметическая МИК, амплитуда МИК, МИК₅₀ и МИК₉₀) и количественную (среднее число выживших бактерий - КОЕ/мл; концентрация и экспозиция исследуемых веществ; фактор редукции - RF) оценку антимикробной активности наиболее активных производных 5-нитротиазола.
4. Исследовать (in vitro) действие наиболее активных производных 5-нитротиазола на штаммы возбудителей, выделенные от инфекционных больных.

Объект и предмет исследования

Работа относится к области медицинской микробиологии. Объектами исследования были музейные штаммы микроорганизмов (28 штаммов) и 170 штаммов микроорганизмов, выделенные от больных, находившихся на лечении в инфекционном стационаре: по 20 штаммов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* и 30 штаммов микроорганизмов *Clostridium* sp.; вновь синтезированные производные 5-нитротиазола (всего 51 вещество).

Предметом исследования была оценка антимикробной активности впервые синтезированных новых производных 5-нитротиазола по показателям индивидуальной, среднегеометрической, средне-арифметической МИК, амплитуде МИК, МИК₅₀ и МИК₉₀ и подсчету среднего числа выживших бактерий - КОЕ/мл в опыте и контроле, концентрации и экспозиции исследуемых веществ, фактору редукции - RF.

Гипотеза

Новые производные 5-нитротиазола обладают различной степенью антимикробной активности, среди которых производные N-(5-нитротиазол-2-ил)-N'-(4-R'-бензолсульфониламино) алкандиоил-диамид (соединения №12 и №13) и производное моно-N-(5-нитротиазол-2-ил) амид дикарбоновой кислоты (соединение №35) являются перспективными для применения в качестве антисептических средств терапевтического назначения.

Методология и методы исследования

Методологическую основу работы составили эмпирические (наблюдение, измерение, моделирование и др.) и логические (доказательство, объяснение, выведение следствий и др.) методы научного познания.

В работе использовались методы: микроскопический метод, качественный суспензионный метод серийных разведений препаратов в мясопептонном агаре для оценки антимикробной активности производных 5-нитротиазола *in vitro* по отношению к факультативным и облигатным анаэробам; оценка индивидуальной минимальной ингибирующей концентрации (МИК), амплитудной МИК, среднегеометрической МИК, среднеарифметической МИК, МИК₅₀ и МИК₉₀; количественный суспензионный метод для определения концентрации экспозиции и фактора редукции для наиболее активных производных 5-нитротиазола.

Новые производные 5-нитротиазола были получены путем моноамидирования дикарбоновой кислоты 2-аминотиазолом в oleume, оригинальным методом, разработанным на кафедре общей и биоорганической химии Гродненского государственного медицинского университета совместно с профессором Н.А. Кравченок и защищенным авторскими свидетельствами на изобретение.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета компьютерных программ Statistica V.5.5A, Microsoft Excel 97.

Научная новизна и значимость полученных результатов

Впервые синтезировано 51 новое соединение - производное 5-нитротиазола (патент №1046 «Производные 5-нитротиазола, обладающие противомикробной активностью»).

Впервые доказана антибактериальная активность новых производных 5-нитротиазола (вещества №№ 1-51), определены наиболее активные вещества, обладающие антибактериальной активностью. Предложены более перспективные средства среди новых производных 5-нитротиазола для применения в клинике и для создания на их базе новых антимикробных препаратов, используемых в медицине.

Впервые доказан (*in vitro*) антибактериальный эффект новых производных 5-нитротиазола на различные штаммы микроорганизмов, выделенных от инфекционных больных с различной патологией.

Практическая значимость работы

Впервые осуществлен синтез новых соединений 5-нитротиазола, обладающих антимикробной активностью (соединения №№12,13,35) в отношении различных грамположительных и грамотрицательных штаммов, факультативных и облигатных анаэробов; обоснована возможность применения более активных новых производных 5-нитротиазола в качестве антимикробных средств в медицине.

Получено авторское свидетельство на изобретение (патент №1046) «Производные 5-нитротиазола, обладающие противомикробной активностью» реализация которого позволит укрепить фармакоэкономическую независимость Республики Беларусь.

Внедрены 2 рационализаторских предложения (№ 1261 «Устройство для кратковременного встряхивания пробирок»; № 1396 «Способ повышения противомикробной активности производных 5-нитротиазола»).

Результаты исследований внедрены в учебный процесс кафедр УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Основные положения, выносимые на защиту

1. Основой новых производных 5-нитротиазола является 5-нитро-2-аминотиазоловый компонент, использование которого позволяет синтезировать новые соединения, обладающие антимикробной активностью.
2. Впервые синтезированные производные 5-нитротиазола оказывают антимикробное действие (*in vitro*) на музейные штаммы микроорганизмов, проявляя различную степень бактериостатической активности.
3. Большую антимикробную активность проявляют производные N-(5-нитротиазол-2-ил)-N'-(4-R'-бензолсульфонил)амино) алкандиондиамида (соединения №12 и №13) и моно-N-(5-нитротиазол-2-ил) амид дикарбоновой кислоты (соединение №35).
4. Впервые синтезированные производные 5-нитротиазола обладают различной степенью антимикробной активности (*in vitro*) в отношении факультативных и облигатных анаэробных микроорганизмов, выделенных от больных.

Личный вклад соискателя.

Автором совместно с зав. кафедрой общей химии Гродненского государственного медицинского университета, профессором Кравчней Н.А. проведен синтез новых производных 5-нитротиазола. На музейных штаммах микроорганизмов лично проведено изучение антибактериальной активности новых производных 5-нитротиазола, в отношении штаммов микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* и *Clostridium*, выделенных от больных с различным диагнозом.

Статистическая обработка, теоретическое обобщение результатов и оформление диссертационной работы выполнены лично автором.

Апробация результатов диссертации

Основные положения и результаты диссертации доложены на: научно-практической конференции «Достижения медицинской науки в практику здравоохранения» (Гродно, 1991 г.); на 7 Гродненской областной конференции молодых ученых и специалистов, посвященной 250-летию Ж.Э. Жилибера (Гродно, 1991 г.); на итоговой научно-практической конференции ГГМУ

(Гродно, 1992 г.); на международной научной конференции посвященной 35-летию ГГМИ (Гродно, 1993 г.); на научной конференции «Актуальные проблемы современной медицины», посвященной 60-летию ВГМИ (Витебск, 1994 г.); на международном конгрессе «4th European Congress of Chemotherapy and infection», Paris, 2002 (Париж, 2002 г.); на заседаниях кафедры микробиологии, вирусологии и микробиологии им. С.И. Гельберга и кафедры инфекционных болезней ГГМУ (1998-2004 г.г.).

Опубликованность результатов.

По материалам исследований опубликовано 14 печатных работ, из них статей в научных журналах – 4, статьи в сборниках – 2, тезисов – 8 (за рубежом – 1). В том числе 10 без соавторов. Получено авторское свидетельство на изобретение, 2 рационализаторских предложения. Объем публикаций составил 29 стр.

Структура и объем диссертации.

Диссертация написана на русском языке, содержит 5 глав, состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, заключения и выводов, списка использованной литературы, включающего 202 источника (из них русскоязычных – 137). Работа изложена на 96 страницах машинописного текста, содержит 13 иллюстрации и 20 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Материалы и методы исследования

Изучена антимикробная активность впервые синтезированных производных 5-нитротиазола (51 вещество) на штаммах микроорганизмов, находящихся в музее кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга и в разное время полученных из бактериологических лабораторий научно-исследовательских и учебных учреждений Республики Беларусь (всего 28 штаммов). Также были использованы микроорганизмы выделенные от больных, находящихся в инфекционном стационаре: по 20 штаммов *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и *Yersinia enterocolitica*; по 20 штаммов *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus intermedius*. 30 штаммов *Clostridium sp.* были предоставлены бактериологической лабораторией Гродненской узловой железнодорожной больницы, проводящей бактериологическое исследование испражнений больных на дисбиоз кишечника. Перед исследованием музейных штаммов и культур, выделенных от больных (взятие в опыт) проверялись следующие параметры: чистота культуры, вид - по основным морфологическим, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам по схемам и ключам, рекомендованным в определителе бактерий Берджи (1997).

Для изучения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) и минимальной бактерицидной концентрации исследуемых соединений использовали качественный суспензионный метод серийных разведений в агаровой среде с помощью штампа-репликатора (А.П.Красильников, 1995).

Получали следующие концентрации исследуемых вещества в агаре (1250, 625, 312, 156, 78, 39, 19, 9, 4, 2 мкг/мл) и с помощью штампа-репликатора вносили суспензию 24-часовую культуру микроорганизмов из расчета 850 млн бактерий/мл (бактериальный стандарт №10).

В результате скрининга антимикробной активности всех синтезированных соединений, нами были отобраны наиболее активные производные 5-нитротриазола. Проведено углубленное изучение их МИК по ряду показателей (индивидуальная, среднегеометрическая, среднеарифметическая МИК, амплитуда МИК, МИК₅₀ и МИК₉₀) на широком круге микроорганизмов, полученных от больных. С помощью количественного суспензионного метода проводили подсчет среднего числа выживших бактерий - КОЕ/мл в опыте и контроле, фактор редукции (RF) числа бактерий в опыте и в контроле. Оценивали уровень активности этих веществ, при разных концентрациях (4, 8, 16, 32 мкг/мл) и экспозициях (30 мин, 1, 3, 4, 6, 12 часов) исследуемых веществ.

Для оценки антимикробной активности новых производных 5-нитротриазола в отношении анаэробов использовали качественный суспензионный метод серийных разведений в среде Вильсона-Блера (Т.В. Ушакова и др., 1991, NCCLS, 1999).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета компьютерных программ Statistica V.5.5A, Microsoft Excel 97.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Характеристика основных групп синтезированных соединений

В основу создания новых производных 5-нитротриазола был положен 5-нитро-2-аминотриазоловый компонент, к которому ковалентно были присоединены другие биологически активные соединения различных групп триазолов, бензолсульфамидов, пиридинов, мочевины, биурета, ациламинотетразолов и других с помощью дикарбоновых кислот, образуя амидные связи. Для этого применен метод получения амидов, разработанный на кафедре общей и биоорганической химии Гродненского государственного медицинского университета профессором Н.А. Кравченок. Синтезировано 51 новое соединение 5-нитротриазола 5 из которых были получены нами совместно. В качестве связующего звена двух компонентов, содержащих аминогруппы, в последствии образующих амидные группы, использовали алифатические дикарбоновые кислоты с 5-10 атомами углерода.

Все синтезированные соединения были разделены на 7 основных (А-Ж) и 4 вспомогательных (З-Л) группы. В основных группах всегда содержался 5-нитротриазоловый фрагмент. Во вспомогательных или 5-сульфатриазоловый, или 4(4-бромфенил)-5-нитротриазоловый, или только пиридиновый фрагмент. Исследования вспомогательных групп позволило ближе подойти к пониманию роли каждого фрагмента, в том числе и роли дикарбоновой кислоты как антимикробного фактора синтезированных соединений.

Антимикробная активность новых производных 5-нитротиазола.

Скрининг антимикробной активности всех синтезированных производных 5-нитротиазола на музейные штаммы микроорганизмов показал, что спектр их антимикробного действия достаточно широк. МИК разных производных 5-нитротиазола колебалась в значительных пределах: от 2 мкг/мл до 1250 мкг/мл и более. Соединением для сравнения был выбран известный фармакопейный препарат «нитазол» - так же производное 5-нитротиазола. Контролем служила питательная среда, не содержащая антимикробные агенты, на которую заседали исследуемые микроорганизмы.

Все синтезированные производные 5-нитротиазола по антимикробной активности были разделены на 4 группы с учетом показателей МИК.

1 группа – соединения, не обладающие противомикробной активностью *in vitro*, МИК которых по отношению ко всем (100%) исследуемым музейным микроорганизмам превышала 1250 мкг/мл. В эту группу вошли следующие соединения: из групп Д - производное N-(5-нитротиазол-2-ил)-N'-(тетразол-5-иламино) глутарилдиамида, группы Е - производные N-(5-нитротиазол-2-ил)-N'-(R'-карбамоиламино) глутарилдиамида, группы З - производные N,N'-ди-(5-сульфотиазол-2-ил) алкандиолдиамида, группы И - производные N-(5-сульфотиазол-2-ил)-N'-(2- или 4-пиридил) алкандиолдиамида, группы К - производные моно-(2-или 4-пиридил) амидов дикарбоновых кислот, группы Л - производные моно-4 ди-5-нитро-4-(4-бромфенол) тиазол-2-ил амидов дикарбоновых кислот. Соединения групп Д и Е содержали в своем составе 5-нитро-2-аминотиазоловый фрагмент и аминотетразоловый компонент или мочевины, или биурет, или дитиобиурет. Известно, что эти вещества входят в состав антибактериальных, дезинфицирующих, акарицидных, инсектицидных и фунгицидных препаратов (М.Д. Машковский, 2004). Однако желаемого антимикробного эффекта нами не получено.

Соединения групп З, И, К и Л вошли в состав вспомогательных групп так как не содержали в своем составе 5-нитро-2-аминотиазоловый фрагмент. Они были синтезированы специально для определения антимикробной активности отдельных компонентов. Эти соединения не проявляли антимикробного действия на исследуемые микроорганизмы. Вероятно, без дополнительных радикалов данные соединения не могли включиться во внутриклеточные процессы бактерий и оказать ингибирующее действие на микроорганизмы. Тем самым подтверждалось значение 5-нитро-2-аминотиазолового фрагмента в обеспечении антимикробного действия синтезированных соединений.

2 группа – соединения, антимикробная активность которых *in vitro*, в отличие от 1 группы, широко варьировала в зависимости от вида микроорганизма. У большинства соединений МИК была в пределах 625-1250 мкг/мл и более. Это были соединения группы А - производные N-(5-нитротриазол-2-ил)-N'-(5-R'-1,2,4-триазол-3-ил) алкандиоилдиамида и группы Г - производные N, N'-ди-(5-нитротриазол-2-ил) алкандиоилдиамида. Распределение чувствительности музейных штаммов к соединениям этой группы, в зависимости от концентрации исследуемых веществ представлено на рис. 1.

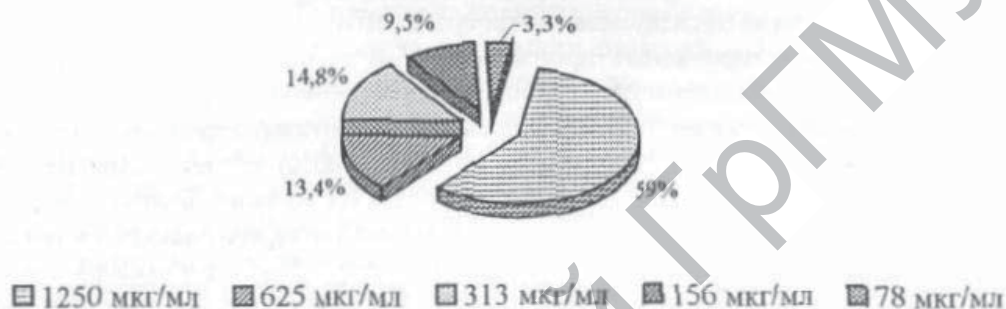


Рис. 1. Распределение чувствительности микроорганизмов к соединениям 2 группы.

3 группа – соединения, большинство которых проявили умеренную антимикробную активность *in vitro*, и МИК которых была в пределах 78-625 мкг/мл. К этой группе были отнесены соединения группы В: N-(5-нитротриазол-2-ил)-N'-(2- или 4-пиридиламино) алкандиоилдиамида. Распределение чувствительности микроорганизмов к соединениям 3 группы в зависимости от концентрации веществ, представлено на рис. 2.

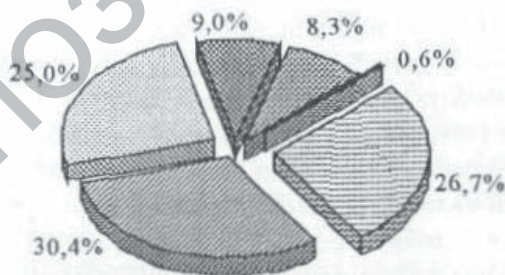


Рис. 2. Распределение чувствительности микроорганизмов к соединениям 3 группы.

4 группа – новые соединения, большинство из которых обладали высокой антимикробной активностью, МИК была в пределах 2-78 мкг/мл. К ним отнесены соединения из групп Б - N-(5-нитротриазол-2-ил)-N'-(4-R'-

бензолсульфониламино) алкандиоилдиамида и Ж - N-(5-нитротиазол-2-ил)-N'-(2-или 4-пиридиламино) алкандиоилдиамида (рис. 3).

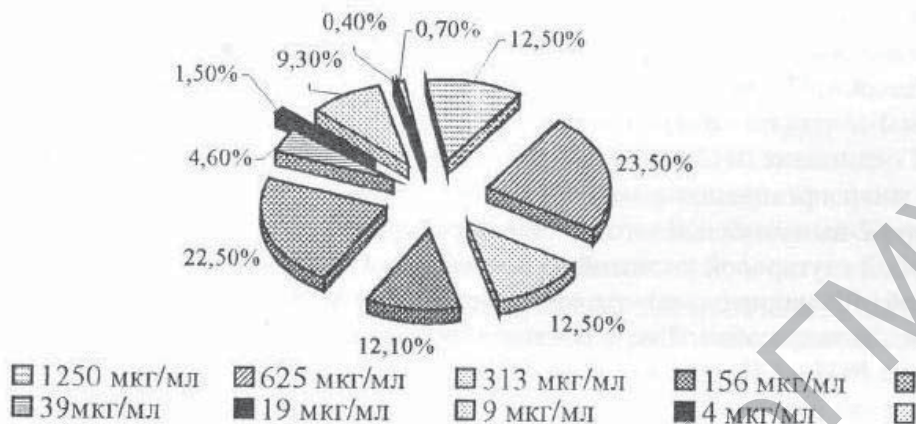


Рис.3. Распределение чувствительности микроорганизмов к соединениям 4 группы.

В результате из всех исследуемых групп новых производных 5-нитротиазола были выделены соединения, обладающие самой высокой антимикробной активностью в своей группе. Результаты сравнительной антимикробной активности этих производных 5-нитротиазола и нитазола представлены в табл. 1.

Таблица 1.

Уровни чувствительности музейных штаммов микроорганизмов к наиболее активным производным 5-нитротиазола и нитазолу

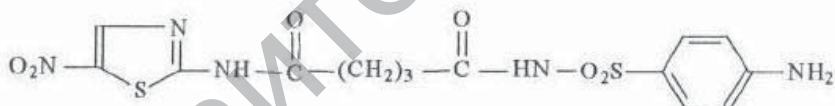
Иссл. соединения	Мин. МИК, мкг/мл	Макс. МИК, мкг/мл	Амплитуда МИК, мкг/мл	Ср. геом. МИК, мкг/мл	Ср. арифм. МИК, мкг/мл, $M \pm m$	МИК ₅₀ мкг/мл	МИК ₉₀ мкг/мл
Нитазол	2	1250	625	32,18	$86 \pm 42,04$	39	78
№1	78	1250	16	484,56	$714,69 \pm 94,85^{*..}$	625	1250
№2	78	1250	16	440,33	$682,34 \pm 98,53^{*..}$	313	1250
№17	39	1250	32	230,83	$438,48 \pm 86,67^{*..}$	156	1250
№12	9	625	69	104,18	$195,93 \pm 42,63^{*..}$	78	625
№13	9	625	69	34,41	$102,07 \pm 31,06^{*..}$	39	313
№35	2	156	78	21,07	$38,38 \pm 7,21$	19	78

Примечание: * - различия достоверны при сравнении с нитазолом ($p < 0,05$); .. - различия достоверны при сравнении с соединением №35 ($p < 0,05$).

Сравнивая различные показатели МИК в отношении музейных штаммов микроорганизмов установлено, что самая высокая антимикробная активность оказалась у соединений №12 и №13 из группы Б - производных N-(5-нитротиазол-2-ил)-N'-(4-R'-бензолсульфонил-амино) алкандионилдиамида (рис. 4.) и соединения №35 (рис. 5) из группы Ж - производного N-(5-нитротиазол-2-ил)-N'-(2- или 4-пиридиламино) алкандионилдиамида ($p < 0,05$).

Соединения №12 и №13 оказывали антимикробное действие на музейные штаммы микроорганизмов в концентрации 9-625 мкг/мл. Эти вещества состояли из 5-нитро-2-аминотиазолового и бензолсульфамидного радикалов, связанных между собой глутаровой кислотой. В положении 4 бензольного кольца они имели небольшой R' радикал, по которому соединения этой химической группы отличались между собой. Так, у соединения №12 он был представлен -NH₂, а у соединения №13 - CH₃ (рис.4) Полагаем, что этот небольшой радикал R' сыграл существенную роль в антимикробной активности соединений №12 и №13. Это доказывается на примерах структуры других соединений этой химической группы, у которых радикал R' или отсутствовал (соединение №11), или был представлен другими атомами (соединения №14-16), и антимикробная активность которых была значительно ниже. Наше мнение подтверждается результатами ряда исследователей (Л.С. Страчунский и др., 2002), которые считают, что между препаратами одного поколения, отличающимися только на одну молекулу могут быть существенные различия в их антимикробной активности.

12



13

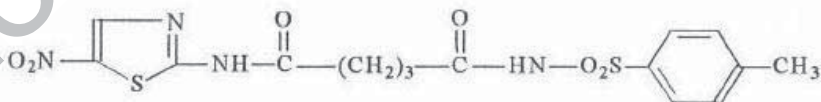


Рис.4. Химические формулы соединений №12 и №13

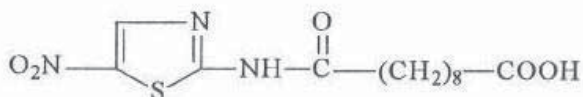


Рис.5. Химическая формула соединения №35

Соединение №35 на исследуемые штаммы микроорганизмов оказывало антимикробное действие в концентрации 2-78 мкг/мл. По химическому строению

оно отличалось от других соединений наличием в своем составе только 5-нитро-2-аминотиазолового компонента и себациновой кислоты (рис.5). Такое сочетание, скорее всего, сыграло решающую роль в усилении антимикробной активности. Общеизвестно, что себациновая кислота, обладая гибкостью алкиленового мостика, может образовывать различные пространственные конформации, среди которых возможны и комплементарные с белками и нуклеиновыми кислотами микроорганизмов. Возможно, это позволило 5-нитро-2-аминотиазоловому компоненту стать более биодоступным.

В дальнейшем соединения №12, 13 и 35 были отобраны для углубленного изучения их антимикробной активности.

Количественная оценка антимикробной активности новых производных 5-нитротиазола. Исследования проводили на грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных (*E. coli*) микроорганизмах.

Количественная оценка антимикробной активности новых производных 5-нитротиазола показала, что при экспозиции *E.coli* и *S.aureus* в растворе соединений №12, 13, и 35 менее 30 минут, в концентрации от 1хМИК (4 мкг/мл) до 8хМИК (32 мкг/мл), эти вещества не оказывали заметного антимикробного действия на исследуемые возбудители. Динамика антимикробной активности соединения №35 на *E.coli* представлена на рис.6.

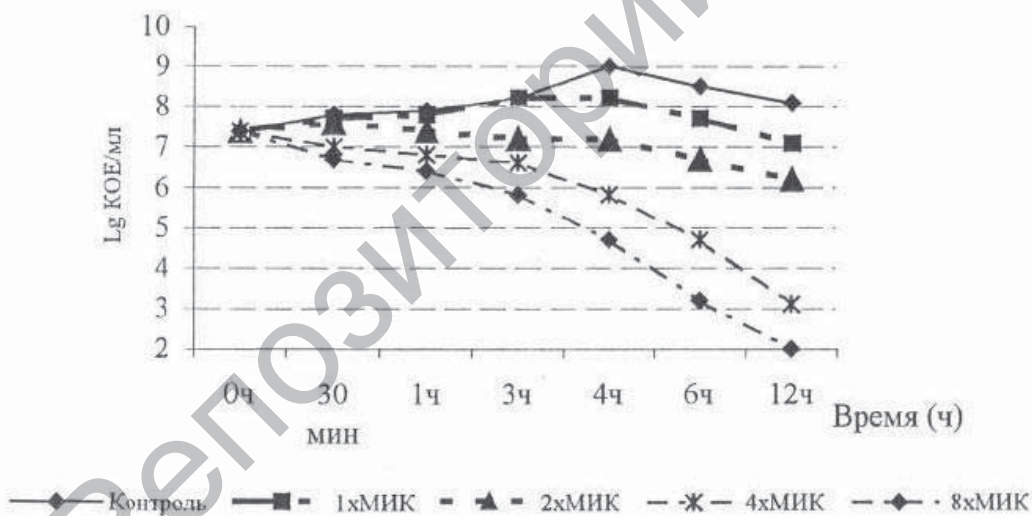


Рис. 6. Зависимость выживаемости *E.coli* (Lg КОЕ/мл) от времени экспозиции и концентрации соединения №35.

При экспозиции 30 минут и более антимикробное действие соединений №12, 13, и 35 увеличивалось особенно в концентрации 8хМИК (32 мкг/мл). Так фактор редукции RF для соединения №35 составил 1,1 КОЕ/мл для *E.coli* и 0,5 КОЕ/мл для *S.aureus*. При большей экспозиции в этой концентрации, разница с контролем была более значительной (рис. 7).

Такая тенденция сохранялась и у соединений №12 и №13. Изучение кинетики гибели культур микроорганизмов *in vitro* под действием соединения №12, 13 и 35 показало, что эти производные 5-нитротиазола являются веществами с концентрационно-зависимой антимикробной активностью. Показано, что антимикробная активность соединений №12 и №13 в большей степени проявлялась в концентрации 32 мкг/мл.

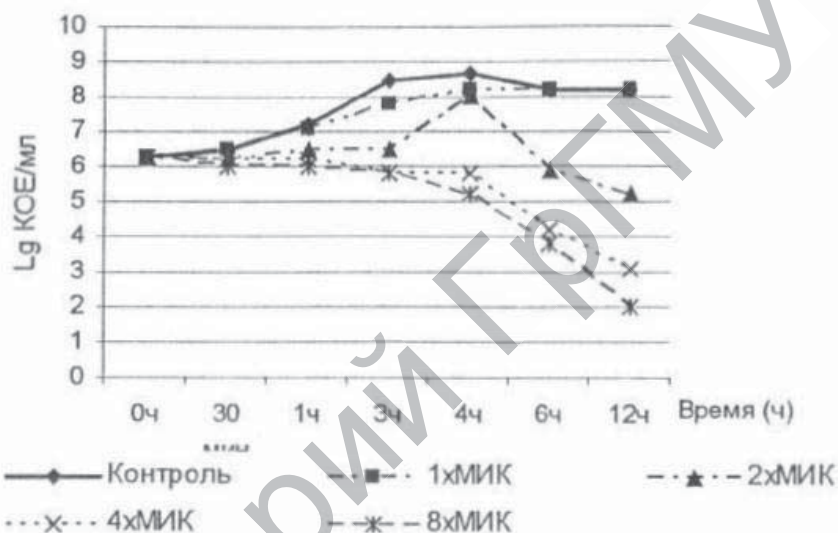


Рис.7. Зависимость выживаемости *S. aureus* (Lg КОЕ/мл) от времени экспозиции и концентрации соединения №35.

Антимикробная активность производных 5-нитротиазола в отношении возбудителей, выделенных от больных.

Представлялось важным оценить антимикробную активность новых производных 5-нитротиазола на различных видах микроорганизмов, выделенных от больных. По мнению Л.С. Страчунского (2002), более целесообразно рассматривать антимикробные препараты с точки зрения их клинической эффективности и действия на конкретный возбудитель, выделенный от больного. Как известно, чувствительность бактерий к антимикробным средствам может быть разной у микроорганизмов, растущих в условиях организма и на питательных средах. Это может быть связано с изменением диффузии веществ через клеточные оболочки, либо меньшей доступностью для препарата транспортных систем бактериальной клетки или ее реактивных центров (О.А. Беляева, 1998).

Исследования антимикробной активности новых соединений на *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* и *S. intermedius*, выделенных от больных инфекционного стационара показали, что чувствительность грамположительных бактерий к этим соединениям, как правило, зависела от таксономической группы

микроорганизмов и типа соединения (рис. 8). В целом, наиболее чувствительными к производным 5-нитрогиазола оказались *S. epidermidis*, менее чувствительными были *S. saprophyticus*. Активность конкретных синтезированных соединений на эти микроорганизмы была различной. Меньшая антимикробная активность оказалась у соединения №12. Его среднегеометрическая МИК находилась в границах от 15,49 мкг/мл до 51,51 мкг/мл. Наибольшая антимикробная активность на эти микроорганизмы была у соединения №35. Среднегеометрическая МИК находилась в границах от 6,5 мкг/мл до 20,44 мкг/мл. Антимикробная активность соединения №13 на стафилококки оказалось большей, чем у соединения №12 ($p < 0,05$), а в отношении *S. epidermidis* и *S. aureus* была такая же, как у соединения №35.

Исследования антимикробной активности в отношении стафилококков, выделенных от больных, показали (рис 8.), что наиболее эффективными были соединения №13 и №35 и по действию на *S. aureus* и *S. saprophyticus* имели преимущество перед нитазолом ($p < 0,05$; $p < 0,005$, соответственно).

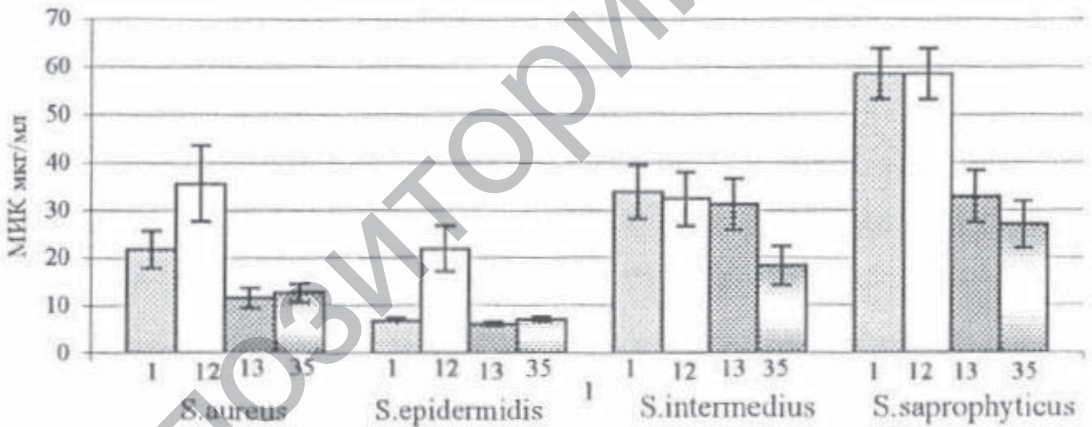


Рис.8. Среднеарифметическая МИК (мкг/мл) соединений №12, 13, 35 к различным стафилококкам. Примечание: 1- нитазол, №12, 13, 35 - производные 5-нитрогиазола.

Исследования антимикробной активности этих соединений на грамотрицательные энтеробактерии *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* и *Yersinia enterocolitica*, выделенных от больных показали, что чувствительность данных возбудителей к этим соединениям была меньше чем грамположительных кокков и, как правило, зависела от типа соединения (рис. 9.).

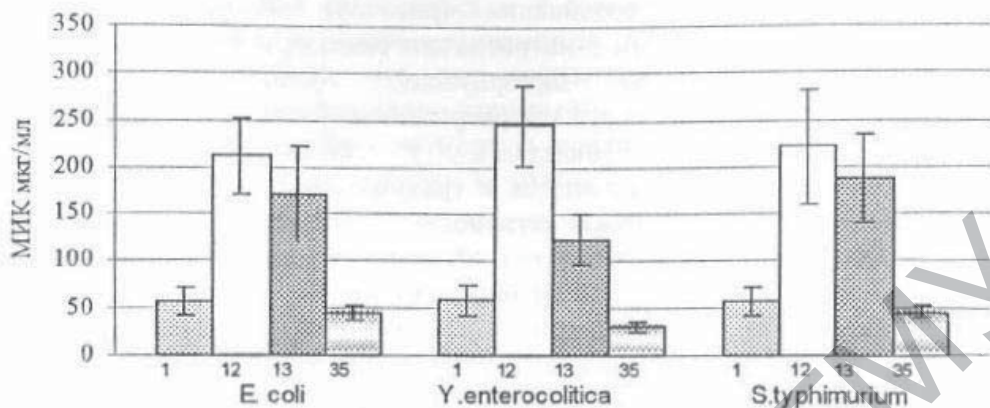


Рис. 9. Среднеарифметическая МИК (мкг/мл) соединений №12, 13, 35 к различным энтеробактериям. Примечание: 1- нитазол, №12, 13, 35 - производные 5-нитрогиазола.

Наибольшая антимикробная активность в сравнении с другими соединениями была у соединения №35, меньшая – у соединения №12. Такая устойчивость энтеробактерий к синтезированным соединениям вполне закономерна, так как из литературы известно, что резистентность сальмонелл к сульфаниламидным препаратам встречается очень часто (М.П. Королевич, 1995), а соединения № 12 и 13 в своем составе содержат бензолсульфамидный радикал. Соединение №35 и нитазол, не содержащее его, были более активными по действию на изучаемые микроорганизмы. Это указывало на то, что 5-нитро-2-аминотиазоловый и бензолсульфамидный радикалы у соединений № 12 и 13 действуют на грамположительные микроорганизмы аддитивно.

Исследования антимикробной активности этих соединений на облигатные анаэробы - *Clostridium* sp., выделенные из патологического материала больных, выявили высокую антимикробную активность всех новых производных 5-нитрогиазола (рис. 10)

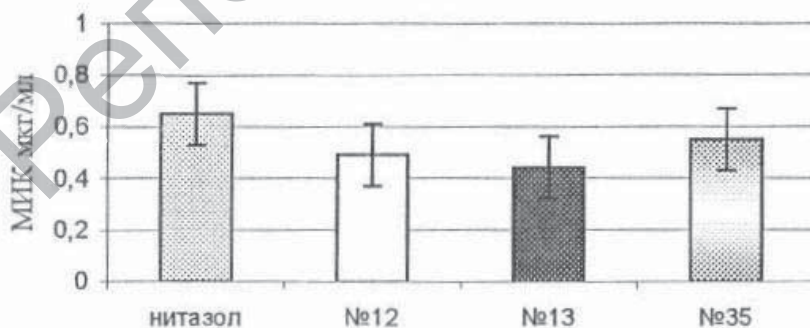


Рис.10. Среднеарифметическая МИК (мкг/мл) нитазола и соединений №12, 13, 35 к *Clostridium* sp.

Все значения МИК соединений №12, 13 и 35 для *Clostridium sp.*, оказались невысокими. Так, минимальная МИК для всех исследуемых веществ составляла 0,03 мкг/мл. Средняя геометрическая у соединения №13 составила 0,17 мкг/мл, а для №12 этот показатель был 0,23 мкг/мл, для соединения №35 – 0,24 мкг/мл, тогда как действию этих веществ на факультативные анаэробы эти значения были на несколько порядков выше.

Представленные результаты исследований показали однонаправленность антимикробного действия на микроорганизмы новых производных 5-нитротиазола и нитазола. Меньшая активность синтезированных соединений была выявлена в отношении энтеробактерий, большая - в отношении стафилококков и значительная антимикробная активность у синтезированных соединений отмечена в отношении анаэробных бактерий.

Это свидетельствует о схожести антимикробного эффекта новых производных 5-нитротиазола и нитазола, механизм которого, связан с нарушением формирования спирали бактериальной ДНК с одновременным прямым или косвенным ингибированием восстановления эндонуклеаз (Н.Ф. Калининченко, 1998; А. Альберт, 1989). Полагаем, что это, в первую очередь, относится к микроорганизмам, ферментные системы которых способны восстанавливать нитрогруппу производных 5-нитротиазола. Именно восстановленные формы этих веществ нарушают репликацию ДНК и синтез белка в микробной клетке, ингибируя тканевое дыхание (Л.С. Страчунский и др., 2002). Выявленное нами антимикробное действие производных 5-нитротиазола на облигатные и факультативные анаэробы (стафилококк, кишечная палочка) не исключает у них мутагенной активности (А.Я. Цыганенко и др., 1991). По мнению Н. Hof (1985, 1987), высокая мутагенная активность наблюдается у веществ действующих на анаэробные и на аэробные микроорганизмы, т.к. восстановление нитрогрупп этих производных бактериальными редуктазами является предпосылкой для такой активности.

Таким образом, можно полагать, что приведенные механизмы имели место в реализации антимикробной активности новых производных 5-нитротиазола. Присоединение к 5-нитро-2-аминотиазолу бензолсульфамида с NH_2 - или CH_3 -радикала (соединения №12 и 13), или присоединение себациновой кислоты (соединение №35), усиливало их антимикробную активность на грамположительные и грамотрицательные музейные штаммы и на микроорганизмы, выделенные от больных. Кроме этого, такое сочетание химических компонентов привело к усилению антибактериальных свойств соединений №12, №13 и №35 на анаэробные микроорганизмы.

Проведенные исследования показали, что соединения №13 и №35 по своей антимикробной активности они не только не уступают нитазолу, а в отношении *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. intermedius* и *Y. enterocolitica* преобладают.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования позволили сделать следующие выводы:

1. Основой новых производных 5-нитротриазола является 5-нитро-2-аминотриазоловый компонент. Присоединение ковалентными связями биологически активных соединений различных групп триазолов, бензолсульфамидов, пиридинов, мочевины, биурета, ациламинотетразолов и других с помощью дикарбоновых кислот к 5-нитро-2-аминотриазолового компонента позволяет осуществить синтез новых производных 5-нитротриазола имеющих различную степень антимикробной активности [1, 2, 12, 15].

2. Скрининг (in vitro) антимикробной активности новых производных 5-нитротриазола в отношении различных музейных штаммов микроорганизмов показал, что синтезированные соединения обладают бактериостатическим действием, антимикробная активность различных химических групп соединений неодинакова и находится в диапазоне от 2 до 1250 мкг/мл и более. Высокой антимикробной активностью в отношении музейных штаммов микроорганизмов обладали соединения № 12 и № 13 - производные N-(5-нитротриазол-2-ил)-N'-(4-R'-бензол-сульфониламино) алкандиоилдиаминов и соединение № 35 - производное моно-N-(5-нитротриазол-2-ил) амида себаценовой кислоты, которые по антимикробному действию на эти микроорганизмы не уступали фармакопейному препарату «нитазол» [7, 8, 9, 10, 11, 13, 14].

3. Производные N-(5-нитротриазол-2-ил)-N'-(4-R'-бензолсульфонил-амино) алкандиоилдиамида (соединения № 12 и № 13) и производное моно-N-(5-нитротриазол-2-ил) амида себаценовой кислоты (соединение № 35) обладают концентрационнозависимой антимикробной активностью. Оптимальный антимикробный эффект на эшерихии и стафилококки составляет концентрация 32 мкг/мл [5].

4. Полученные новые производные 5-нитротриазола обладают высокой антимикробной активностью в отношении различных штаммов микроорганизмов, выделенных от больных: стафилококков (МИК=2-19 мкг/мл) и энтеробактерий (МИК=4-39 мкг/мл). Антимикробная активность новых соединений (№ 12, 13, 35) на облигатные анаэробные микроорганизмы была на несколько порядков выше, чем на факультативные анаэробные микроорганизмы (МИК=0,03-0,06 мкг/мл) [3, 4, 6].

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах

1. Соколова Т.Н., Кравченя Н.А. Синтез и противомикробная активность производных 5-нитротиазола // Хим. фарм. журнал. – 1993. - №3. – С. 36-37
2. Соколова Т.Н., Кравченя Н.А. Синтез и изучение противомикробной активности N-(5-нитротиазол-2-ил)-N-гетерил- или бензосульфонил-глутарилдиамидов // Весці АН Беларусі / Серыя хімічных навук. – 1993. - №4. – С. 61-63.
3. Соколова Т.Н. Антимикробная активность новых производных 5-нитротиазола в отношении Clostridium sp., выделенных от больных с дисбактериозом // Журнал ГТМУ. – 2004. - №4. – С. 51-53.
4. Соколова Т.Н. Антимикробная активность новых производных 5-нитротиазола // Рецепт. – 2004. - №6. – С.38-44.

Статьи в сборниках

5. Соколова Т.Н. Антибактериальное действие новых производных 5-нитротиазола на различные виды и штаммы стафилококков выделенных от больных // Эпидемиология, диагностика, патогенез, лечение и профилактика инфекционных заболеваний: Материалы Республиканской научно-практической конференции инфекционистов и эпидемиологов, Гомель, 13-14 декабря 2001г. – Мозырь : издательский Дом «Белый ветер», 2001. – С. 296-298.
6. Соколова Т.Н. Цыркунов В.М. Антибактериальное действие новых производных 5-нитротиазола на различные виды и штаммы шигелл, сальмонел и нерсиний выделенных от больных // Эпидемиология, диагностика, патогенез, лечение и профилактика инфекционных заболеваний: Материалы Республиканской научно-практической конференции инфекционистов и эпидемиологов, Гомель, 13-14 декабря 2001г. – Мозырь: издательский Дом «Белый ветер», 2001. – С. 299-301.

Тезисы

7. Соколова Т.Н. О бактериостатическом действии некоторых производных нитазола // Материалы 7 Гродненской областной конференции молодых ученых и специалистов, посвященных 250-летию со дня рождения Ж.Э. Жилибера. – Гродно, 1991. - С.71.
8. Соколова Т.Н. Сравнительная оценка антибактериальной активности производных 5-нитротиазола // Актуальные вопросы гигиены и эпидемиологии в Беларуси: Материалы III объединенного съезда гигиенистов, микробиологов, эпидемиологов и паразитологов, Пинск, 1991г. - Минск, 1991. – С 185-186.
9. Соколова Т.Н. Антимикробное действие производных 5-нитротиазола // Итоговая научно-практическая конференция ГТМИ: Аннотированная программа. – Гродно: ГТМИ, 1992. – С.32.

10. Соколова Т.Н. Антибактериальные свойства новых диамидов дикарбоновых кислот // *Материалы международной научной конференции.* – Гродно, 1993. – С. 217.
11. Соколова Т.Н. К изучению бактериостатической активности новых производных амидов и моноамидов дикарбоновых кислот // *Актуальные проблемы современной медицины: Материалы научной конференции, посвященной 60-летию ВГМИ.* – Витебск, 1994. – С 149.
12. Соколова Т.Н. Кравчяня Н.А. Синтез и противомикробная активность диамидов, содержащих сульфамидный фрагмент // *Витамины и здоровье населения Беларуси и смежных регионов: Тез. докл. Международного симпозиума, посвященного 75-летию со дня рождения академика Ю.М. Островского и 25-летию основания института биохимии.* – Гродно, 1995. – С. 218.
13. Соколова Т.Н. Перспектива применения новых производных 5-нитротиазола для профилактики внутрибольничных инфекций // *«Новые лекарственные средства – синтез, технология, фармакология, клиника»: Материалы международной научной конференции, Минск, 14-16 ноября 2001г.* – Минск, 2001г. – С. 136
14. . Sakalova T.N. Synthesis of new derivatives of 5-nitrothiazole and antibacterial activity // *4th European Congress of Chemotherapy and infection, Paris, France, 4-7 May 2002; International Journal of Antimicrobial agents.* – 2002. – Vol. 19, Suppl. 1. – P. S36

Патент

15. Пат.1046 ВУ, МПК С 07 d 277/58, С 07 d 417/12, А 61 К 31/425, А 61 К 31/44. Производные 5-нитротиазола, обладающие противомикробной активностью / Т.Н. Соколова, Н.А. Кравчяня. - №39А; Заявл. 16.12.1992; Оpubл. 14.03.96.

Рационализаторские предложения

16. Соколова Т.Н., Способ повышения противомикробной активности производных 5-нитротиазола. Удостоверение №1396 от 03.03.03, выданное Гродненским государственным медицинским университетом.
17. Соколова Т.Н., Соколов К.Н. Устройство для кратковременного встряхивания пробирок. Удостоверение №1261 от 25.12.91, выданное Гродненским государственным медицинским институтом.

Считаю своим долгом выразить искреннюю благодарность и сердечную признательность научному руководителю, зав. кафедрой инфекционных болезней ГГМУ, д.м.н., профессору Цыркунову В.М. Автор выражает искреннюю благодарность руководителю работы, профессорам Н.А. Кравчяне, А.А. Адарченко – за содействие и помощь в проведении исследований, сотрудникам кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга, лабораторий инфекционной, железнодорожной больниц, Гродненского ОЦГЭ за представленный для исследований материал и методическую помощь.

РЭЗІЮМЭ

Сакалова Таццяна Мікалаеўна

Антымікробная актыўнасць новых праіздных 5-нітратыязола

Ключавыя словы: вытворныя 5-нітратыязола, антымیکробная актыўнасць, мікраарганізмы.

Аб'ект і прадмет даследавання: новыя вытворныя 5-нітратыязола, музейныя штамы мікраарганізмаў, мікраарганізмы выдзеленыя ў хворых.

Мэта даследавання: ацаніць антымیکробную актыўнасць (in vitro) новых вытворных 5-нітратыязола.

Метады даследавання: мікробіялагічныя.

Атрыманыя вынікі: атрыманы новыя вытворныя 5-нітратыязола, якія маюць розны ўзровень антымیکробнай актыўнасці, у аснове якіх знаходзіцца 5-нітра-2-амінатыязолавы кампанент; сярод сінтэзаваных рэчываў найбольшая антымیکробная актыўнасць выяўлена ў вытворных N-(5-нітратыязол-2-іл)-N'-(4-R'-бензолсульфаніламіна) алкандыяілдыяміда - вытворы №12 і №13 і вытворнага мона-N-(5-нітратыязол-2-іл) амід себацынавай кіслаты – вытвор №35; гэтыя рэчывы аказвалі высокае антымیکробнае ўздзеянне на музейныя штамы і штамы мікраарганізмаў, выдзеленых у хворых; устаноўлена, што іх антымیکробная актыўнасць на аблігатныя анаэробныя мікраарганізмы значна вышэй, чым на факультатыўныя анаэробныя мікраарганізмы; устаноўлена канцэнтрацыйна залежная антымیکробная актыўнасць сінтэзаваных рэчываў (in vitro).

Навуковая навізна: упершыню сінтэзавана 51 новае рэчыва - вытворныя 5-нітратыязола (патэнт №1046); упершыню даказана антымیکробная актыўнасць новых вытворных 5-нітратыязола; вызначаны найбольш актыўныя вытворы; даказана (in vitro) антымیکробная актыўнасць іх на музейныя штамы мікраарганізмаў і мікраарганізмы, выдзеленыя ў хворых з рознай паталогіяй; вызначаны перспектывы выкарыстоўвання новых вытворных 5-нітратыязола ў клініцы і для ўтварэння на іх базе новых антымیکробных сродкаў, якія могуць быць выкарыстаны ў медыцыне.

Рэкамендацыі па выкарыстанню: адкрываецца перспектыва для выкарыстання найбольш актыўных вытворных 5-нітратыязола: вытворныя N-(5-нітратыязол-2-іл)-N'-(4-R'-бензолсульфаніламіна) алкандыяілдыяміда - вытворы №12 і №13 і вытворнага мона-N-(5-нітратыязол-2-іл) амід себацынавай кіслаты – вытвор №35; у якасці антысептыкаў і хіміятэрапеўтычных прэпаратаў у медыцыне.

Галіна выкарыстання: медыцына – у якасці новых антымیکробных (антысептычных) сродкаў прафілактыкі і лячэння.

РЕЗЮМЕ

Соколова Татьяна Николаевна

Антимикробная активность новых производных 5-нитротиазола

Ключевые слова: производные 5-нитротиазола, антимикробная активность, изучение, микроорганизмы.

Объект исследования: новые производные 5-нитротиазола, музейные штаммы и микроорганизмы, выделенные от больных.

Цель работы: оценить антимикробную активность (*in vitro*) новых производных 5-нитротиазола.

Методы исследования: микробиологические.

Полученные результаты: получены новые производных 5-нитротиазола, имеющие различную степень антимикробной активности, в основе которых находится 5-нитро-2-аминотиазоловый компонент; среди синтезированных соединений наибольшая антимикробная активность установлена у производных N-(5-нитротиазол-2-ил)-N'-(4-R'-бензолсульфониламино) алкандионилдиамида - соединения №12 и №13 и производного моно-N-(5-нитротиазол-2-ил) амид себациновой кислоты - соединения №35; данные соединения оказывали высокое антимикробное действие на музейные штаммы и штаммы микроорганизмов, выделенных от больных; установлено, что их антимикробная активность на облигатные анаэробные микроорганизмы существенно выше, чем на факультативные анаэробные микроорганизмы; установлена концентрационнозависимая антимикробная активность синтезированных соединений (*in vitro*).

Научная новизна: впервые синтезировано 51 новое соединение - производные 5-нитротиазола (патент №1046, приоритет изобретения от 16 декабря 1992 г., зарегистрирован 25 мая 1995 г); впервые доказана антибактериальная активность новых производных 5-нитротиазола; определены наиболее активные вещества; доказана (*in vitro*) антимикробная активность их на музейные штаммы микроорганизмов и микроорганизмы, выделенные от больных с различной патологией; определена перспектива применения новых производных 5-нитротиазола в клинике и для создания на их базе новых антимикробных препаратов, используемых в медицине.

Рекомендации для использования: открывается перспектива для использования наиболее активных производных 5-нитротиазола: производные N-(5-нитротиазол-2-ил)-N'-(4-R'-бензолсульфониламино) алкандионилдиамидов (соединения №12 и №13) и производное моно-N-(5-нитротиазол-2-ил) амида дикарбоновой кислоты (соединение №35) в качестве антисептиков и химиотерапевтических препаратов в практической медицине.

Область применения: медицина - в качестве новых антимикробных (антисептических) средств профилактики и лечения.

RESUME

Sokolova Tatjana Nikolajevna

Antimicrobial activity of new derivatives of 5-nitrothiazole

Key words: derivatives of 5-nitrothiazole, antimicrobial activity, research, microorganisms.

Subject of the research: new derivatives of 5-nitrothiazole, strains from the bank of bacterial cultures, patients.

bank of bacterial cultures, patients. of new derivatives of 5-

nitrothiazole

synthesized

chemical

synthesized

alkanediol

5-nitrothiazole have been synthesized and tested for antimicrobial activity. The basic compound is 5-nitrothiazole. Among the derivatives (with a 4-R'-benzole sulphonylamino group) the highest antimicrobial activity. It has been found that mono-N-(5-nitrothiazole-2-yl) amide of sebacic acid - compound №35 shows the same high antimicrobial activity. The synthesized compounds displayed high antimicrobial effect against the strains isolated from patients as well as against the strains from the bank of bacterial cultures. It has been established that antimicrobial activity of the new synthesized derivatives against obligate anaerobic microorganisms was much more pronounced than the activity against facultative anaerobic ones. The dependence of the antimicrobial activity upon the concentrations of the derivatives has been determined (in vitro).

Scientific novelty : for the first time 51 new compounds - derivatives of 5-nitrothiazole, have been synthesized (Patent №1045, the priority of the invention was dated by the 16th December, 1992 and registered on the 5th May, 1995); for the first time antimicrobial activity of new derivatives of 5-nitrothiazole has been proved; the most active compounds have been found; antimicrobial activity of the synthesized derivatives against the strains from the bank of bacterial cultures and the strains isolated from the patients with different forms of pathology has been proved (in vitro); the perspectives for the application of the new derivatives of 5-nitrothiazole in clinic as well as the perspectives of the production of new antimicrobial preparations on their basis for practical use in prophylactic medicine have been defined.

Recommendations for use: new perspective has been opened for use of the most active derivatives of 5-nitrothiazole: the derivatives of N-(5-nitrothiazole-2-yl)-N'-(4-R'-benzole sulphonylamino) alkanediol diamide (compounds №12 and №13) and derivatives of mono-N-(5-nitrothiazole-2-yl) amide of dicarboxylic acid (compound №35) as antiseptics and chemotherapeutical preparations in medicine.

The field of application: medicine - as new antimicrobial compounds (antiseptic) for prophylaxis and treatment.