ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, ФАРМАКОГНОЗИЯ / PHARMACEUTICAL CHEMISTRY, PHARMACOGNOSY

DOI: https://doi.org/10.23670/IRJ.2024.142.34

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ 1– (3,5–ДИ–ТРЕТ–БУТИЛ–4–ГИДРОКСИФЕНИЛ) – 2–АРИЛБЕНЗИМИДАЗОЛОВ

Научная статья

Цакулова Т.В.[1, *], Кисиева М.Т.[2], Бидарова Ф.Н.[3], Асланиди Е.М.[4]
[1] ORCID : 0009-0004-9358-6772;
[2] ORCID : 0000-0002-0960-0980;
[3] ORCID : 0000-0002-6346-9872;
[4] ORCID : 0000-0002-1674-3189;
[1, 2, 3, 4] Северо-Осетинская государственная медицинская академия, Владикавказ, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (tsakulova7[at]mail.ru)

Аннотация

Изучена антимикробная активность 1–(3,5–ди–трет–бутил–4–гидроксифенил)–2–арилбензимидазолов диско-диффузионным методом в отношении тест-штаммов (Escherichia coli ATCC 25922; Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027; Staphylococcus aureus ATCC 6538–1). Определена острая токсичность I–V на основе люминесцентного бактериального теста. Установлена допустимая степень токсичности для образцов. Выявлена взаимосвязь «структура–активность», обусловленная наличием гибридных структур бензимидазола и экранированного фенола. Показана актуальность поиска и целенаправленный синтез потенциальных перспективных соединений-производных бензимидазола с фрагментом экранированного фенола, обладающих большим спектром фармакологического применения.

Ключевые слова: бензимидазолы, пространственно-затрудненные фенолы, антимикробная активность, метод «дисков».

A STUDY OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF 1– (3,5-DI–TERT-BUTYL–4–HYDROXYPHENYL)–2–ARYLBENZIMIDAZOLES

Research article

Tsakulova T.V.[1, *], Kisieva M.T.[2], Bidarova F.N.[3], Aslanidi Y.M.[4]
[1] ORCID : 0009-0004-9358-6772;
[2] ORCID : 0000-0002-0960-0980;
[3] ORCID : 0000-0002-6346-9872;
[4] ORCID : 0000-0002-1674-3189;
[1, 2, 3, 4] North Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russian Federation

* Corresponding author (tsakulova7[at]mail.ru)

Abstract

The antimicrobial activity of 1–(3,5–di–tert–butyl–4–hydroxyphenyl)–2–arylbenzimidazoles was studied by disco-diffusion method against test strains (Escherichia coli ATCC 25922; Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027; Staphylococcus aureus ATCC 6538–1). The acute toxicity of I-V was determined on the basis of luminescent bacterial test. The permissible degree of toxicity for the samples was established. The structure-activity relationship due to the presence of hybrid structures of benzimidazole and shielded phenol has been determined. The relevance of search and purposeful synthesis of potential promising compounds-derivatives of benzimidazole with a fragment of shielded phenol with a wide range of pharmacological applications is demonstrated.

Keywords: benzimidazoles, sterically hindered phenols, antimicrobial activity, "disc" method.

Введение

Одним из современных направлений в фармацевтической химии является концепция привилегированных структур при разработке соединений, увеличивающих вероятность нахождения потенциальных фармакофорных структур, способных влиять на разные биомишени. В настоящее время одними из гибридных подструктур являются гетероциклическая система бензимидазола и пространственно–затруднённого (экранированного) фенола. В частности, экранированные фенолы проявляют такие виды активности, как антиоксидантная, антимикробная, противовоспалительная [1], [3]. Широкий спектр биологической активности проявляют и производные бензимидазола, для которых характерно противовирусное, противоопухолевое действие и ряд других эффектов [2]. Сочетание в одной гибридной структуре фармакофорных фрагментов бензимидазола и экранированного фенола может привести к созданию веществ с заданной активностью, а также перспективных соединений в разных областях практического применения, что становится вполне актуальным.

В продолжение систематических исследований в работе сообщается об изучении антимикробной активности 1-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)-2-арилбензимидазолов.

Целью исследований является оценка антимикробного действия 1-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)-2-арилбензимидазолов диско–диффузионным методом и определение острой токсичности образцов с помощью люминесцентного бактериального теста.

Для реализации поставленной цели надо выполнить следующие *задачи:*

1. Провести оценку антимикробной активности в изучаемом ряду соединений диффузным методом.
2. Определить острую токсичность для выбранных соединений.
3. Выделить перспективные соединения, облагающиеся высокой антимикробной активностью в сочетании с низкой токсичностью.
4. Проанализировать связь «структура–активность» для производных бензимидазола с фрагментом экранированного фенола для предсказания изучаемой фармакологической активности.

В качестве исследуемых образцов применялись ранее синтезированные 1-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)-2-арилбензимидазолы, проявившие себя перспективными антиоксидантными веществами [4], [5], [6]. Была изучена связь «структура-активность» [7]. В работе были использованы следующие методы: контент–анализ, микробиологический, математический, статистический методы.

Результаты и обсуждение

Оценку антимикробной активности 1-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)-2-арилбензимидазолов проводили диско–диффузионным методом (ДДМ) с использованием культур тест-микроорганизмов, рекомендованных Государственной Фармакопеей XIV-го издания для контроля антимикробной активности препаратов: *Escherichia coli* ATCC 25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538–1 [8].

Питательные среды. Использовались сухие и жидкие питательные среды, отечественного производства для контроля микробной загрязненности №1-15 (производства ОАО «Биотехновация» г. Москва), а также соево–казеиновый агар (*Casein Soya Bean Digest Agar*) производства фирмы «Merk».

Культуральные среды: среда №3 (для *Escherichia coli*); среда №8 (для *Pseudomonas aeruginosa*); среда №10 (для *Staphylococcus aureus*).

Состав среды №3, г/л: панкреатический гидролизат рыбной муки – 20,0; натрий гидрофосфат – 3,0; калий дигидрофосфат – 2,5; экстракт пекарных дрожжей или экстракт пекарных дрожжей импортный – 2,0; глюкоза – 10,0; феноловый красный – 0,08; малахитовый зеленый – 0,015

Состав среды №8, г/л: панкреатический гидролизат рыбной муки – 20,0; экстракт пекарных дрожжей или экстракт дрожжевой импортный – 2,0 ; калия сульфат – 10,0; магния хлорид – 1,4; агар – 10,0

Состав среды №10, г/л: панкреатический гидролизат рыбной муки – 15,0; панкреатический гидролизат казеина – 10,0; экстракт пекарных дрожжей или экстракт дрожжевой импортный – 2,0; натрий хлорид – 72,0; манит – 10,0; феноловый красный – 0,025; агар – 10,0

Жидкая среда №1: пептона ферментативного – 1,0 г; воды дистиллированной – до 1000 мл pH после стерилизации – 7,1.

Культуры *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* выращивали на жидкой среде №1 при температуре от 30-35 0С в течение 18-20 ч. Предварительно изучаемые соединения растворяли в 0,5% растворе твина-80.

Культуры разводили стерильным 0,9 % изотоническим раствором натрия хлорида, вносили по 1 мл взвеси каждого тест–штамма (в отдельности) в приготовленные растворы образцов веществ.

В работе использовали оптический стандарт мутности (Лондон, Великобритания), камеру Горяева, микроскоп «Jnaval».

Активность исследуемых соединений оценивали по размеру зоны ингибирования роста микроорганизмов на бактериальном газоне вокруг тест–диска, пропитанного раствором исследуемых веществ. Для измерения зоны ингибирования роста использовали штангенциркуль.

В качестве вещества–сравнения для исследуемых соединений использовали стандартизированные диски с ципрофлоксацином («Ципролет» – 5 мкг) («Промикс», Россия). Контрольные значения диаметров зон ингибирования роста тест-культур *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* при оценке качества определения чувствительности микроорганизмов диск–диффузионным методом (ДДМ) (среда АГВ сухая) для ципрофлоксацина составили соответственно 24–41 мм; 32–40 мм; 31–37 мм [9].

Исследование антимикробной активности. Взвесь исследуемого образца в 0,5% растворе твина–80 в объеме 1 мл наносили на поверхность агара стерильным ватным тампоном, погружали в микробную суспензию, ротировали его, отжимали. Затем культуру этим тампоном наносили на всю поверхность питательной среды. Поверхность агара обрабатывали таким образом 4 раза. Бумажные диски накладывали диски на расстоянии 2,4 см от центра по кругу. Использовали трафарет с нанесенными метками (5 по кругу в 2,4 см от центра), который положили под чашку Петри. Диск «без пустот» прижимали к поверхности питательной среды. Через 20 минут после нанесения среды чашки Петри ставили в термостат в перевернутом виде. Инкубировали при 35^0 С 18-24 ч.

Оценку острой токсичности проводили с применением прибора «Биотокс» с кюветами для измерения биолюминесценции и тетс-объект (биосенсор) «Эколюм», представляющий собой культуры люминесцентных бактерий в среде инертных газов. Параметром токсического действия является изменение интенсивности биолюминесценции тест-объекта в анализируемой пробе по сравнению с таковой для эталона (дистиллированной воды). Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту. Острое токсическое действие исследуемого образца определяется по ингибированию их биолюминесценции за 30 минут в периоде экспозиции (в экспрессном варианте – до 5 минут).

Количественно параметр токсического действия выражается в виде индекса токсичности «Т», которая равна:

$$T = 1 - (I_0 - I)/I_0,$$

где I_0 и I – соответственно интенсивность свечения контроля и опытного образца при фиксированном времени экспозиции образца с тест-объектом.

Статистическая обработка в ходе эксперимента проводилась с применением программ Statistica 6,0 (StatSoft, США) и Excel 2007 (MS, Office 2007, США), с применением критерия Стьюдента (t) [10].

Изучение острой токсичности. Флакон с лиофилизированной суспензией культур вскрывали, добавили 10 мл охлажденной до 4-8^0 С дистиллированной воды. Смесь охлаждали при температуре 4^0 С в течение 20 минут. Довели температуру смеси до 25 ^{0}С. Добавили 0,1 мл суспензии бактерий из флакона в кювету прибора, затем долили 0,9 мл дистиллированной воды. Кювету с раствором вставляли в люминометр и измерили величину интенсивности биолюминесценции за 10 сек.

Анализ приведенных данных показывает, что проверяемые образцы проявляют антимикробное действие относительно культур тест–микроорганизмов (табл. 1). Сравнение антимикробной активности по отношению культурам грамположительных и граммотрицательных микроорганизмов не позволяет выявить существенных отличий, хотя чувствительность грамотрицательных бактерий несколько выше, чем грамположительных. Бактериостатическая активность производных 1– (3,5–ди–трет–бутил–4–гидроксифенил)–2–арилбензимидазолов проявлялась в концентрации 0,0025–2,0 мг/мл. Необходимо отметить, что культура *Staphylococcus aureus* оказалась чувствительной к действию изучаемых соединений, причем бактериостатическая активность соединений IV и V в отношении этой культуры выше, чем у вещества сравнения – ципрофлоксацина. Граммотрицательные бактерии *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* также проявили наибольшую чувствительность в отношении образцов I–V, причем соединения IV и V также по антимикробному эффекту превысили таковой у ципрофлоксацина.

Таблица 1 - Антимикробное действие соединений I-V и вещества сравнения

DOI: https://doi.org/10.23670/IRJ.2024.142.34.1

Соединение	Концентрация, мг/мл	Зоны ингибирования роста микроорганизмов, мм		
		E. coli	*St. aureus*	*Ps. Aeruginosa*
I	0,0025	–	29,2±0,26	35,2±0,28
II	0,5000	37,2±0,23	29,1±0,20	37,1±0,23
III	0,5000	38,2±0,30	28,2±0,33	36,1±0,20
IV	0,0025	45,1±0,21	37,2±0,33	39,2±0,34
V	0,0025	41,2±0,33	33,3±0,40	39,3±0,41
Ципрофлоксацин	0,5000	38,2±0,11	30,02±0,24	37,1±0,21

В ряду 1-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)-2-арилбензимидазолов I–V доля активных соединений в бактериостатическом отношении составила 40% (2/5).

При исследовании взаимосвязи «структура-активность» была выявлена выраженное антимикробное действие анализируемых образцов, обусловленное наличием привилегированных структур бензимидазола и экранированного фенола. При анализе отдельных радикалов в разных положениях фенильного кольца, сопряженного с гетероциклической системой, могут приводить к усилению донорно-акцепторных свойств веществ. Например, при сопряжении гетероциклической структуры исследуемых соединений с замещенным фенилом (2-гидрокси-3,5-дибромфенил, 2-гидроксифенил) параметр антимикробной активности увеличивается.

Для образцов I–V, проявивших значительный антимикробный эффект, была изучена острая токсичность. Установлено, что индекс токсичности «Т» составляет для I (9,0); II 13,3); III (15,0); IV (16,3); V (18,2) соответственно, что свидетельствует о допустимой степени токсичности предлагаемых соединений.

Таким образом, по результатам проведенных исследований по оценке антимикробной активности и определения острой токсичности, а также выявления связи «структура-активность можно заключить:

1. Изучена антимикробная активность 1– (3,5–ди–трет–бутил–4–гидроксифенил)–2–арилбензимидазолов диско-диффузионным методом в отношении тест-штаммов (*Escherichia coli* ATCC 25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538– 1).

2. Бактериостатический эффект образцов проявляется в концентрации 0,0025–2,0 мг/мл, причем образцы IV и V по антимикробному эффекту в отношении всех культур превышают таковой у ципрофлоксацина.

3. Определена острая токсичность I–V на основе люминесцентного бактериального теста. Установлена допустимая степень токсичности для образцов.

4. Выявлена взаимосвязь «структура–активность», обусловленная наличием гибридных структур бензимидазола и экранированного фенола.

Заключение

Показана актуальность поиска и целенаправленный синтез потенциальных перспективных соединений-производных бензимидазола с фрагментом экранированного фенола, обладающих большим спектром фармакологического применения.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы / References

1. Чжоу Б. Оценка синтеза, антиоксидантных и противомикробных свойств некоторых производных 2-арилбензимидазола / Б. Чжоу // Письма по биоорганической и медицинской химии. — 2013. — Т. 23. — С. 3759-3763.

2. Ансари К.Ф. Синтез, физико-химические свойства и противоопухолевая активность производных бензимидазола / К.Ф. Ансари // Европейский журнал медицинской химии. — 2009. — Т. 44. — С. 4028-4033.

3. Сонг Д. Недавняя разработка производных антибактериальных средств, содержащих бензимидазол / Д. Сонг // Журнал медицинской химии. — 2016. — Т. 11. — №7. — С. 646-59.

4. Хубаева Т.О. 1-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)-2-арилбензимидазолы: синтез, свойства, перспективы / Т.О. Хубаева // Вестник Башкирского университета. — 2011. — Т.16. — №3. — С. 663-667.

5. Хубаева Т.О. Синтез, свойства и антиоксидантная активность производных бензимидазола с фрагментом пространственно-затрудненного фенола / Т.О. Хубаева // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2014. — №3. — С. 42-47.

6. Хубаева Т.О. Исследование антиоксидантной активности в области 1-(3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил)-2-арилбензимидазолов / Т.О. Хубаева // Журн. общей химии. — 2013. — Т. 83. — Вып. 9. — С. 1481-1485.

7. Хубаева Т.О. Изучение связи «структура-активность» производных бензимидазола с фрагментом пространственно-затрудненного фенола / Т.О. Хубаева // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2015. — №2. — С. 46-50.

8. Государственная фармакопея РФ XIV издания. — URL: https://femb.ru/record/pharmacopea14 (дата обращения: 11.02.2022).

9. Зуева Л.П. Микробиологический мониторинг и эпидемиологический анализ антибиотикорезистентности микроорганизмов с использованием компьютерной программы WHONET / Л.П. Зуева. — СПб.: МИАЦ, 2005. — С. 68.

10. Халафян А.А. STATISTICA 6 / А.А. Халафян. — М.: Бином-Пресс, 2007. — 512 с.

Список литературы на английском языке / References in English

1. Chzhou B. Ocenka sinteza, antioksidantnyh i protivomikrobnyh svojstv nekotoryh proizvodnyh 2-arilbenzimidazola [An Evaluation of Synthesis, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Some Derivatives of 2-arylbenzimidazole] / B. Chzhou // Pis'ma po bioorganicheskoj i medicinskoj himii [Letters on Bioorganic and Medicinal Chemistry]. — 2013. — Vol. 23. — P. 3759-3763. [in Russian]

2. Ansari K.F. Sintez, fiziko—himicheskie svojstva i protivoopuholevaja aktivnost' proizvodnyh benzimidazola [Synthesis, Physicochemical Properties and Antitumour Activity of Benzimidazole Derivatives] / K.F. Ansari // Evropejskij zhurnal medicinskoj himii [European Journal of Medicinal Chemistry]. — 2009. — Vol. 44. — P. 4028-4033. [in Russian]

3. Song D. Nedavnjaja razrabotka proizvodnyh antibakterial'nyh sredstv, soderzhashhih benzimidazol [Recent Development of Antibacterial Derivatives Containing Benzimidazole] / D. Song // Zhurnal medicinskoj himii [Journal of Medicinal Chemistry]. — 2016. — Vol. 11. — №7. — P. 646-59. [in Russian]

4. Hubaeva T.O. 1-(3,5-di-tret-butil-4-gidroksifenil)-2-arilbenzimidazoly: sintez, svojstva, perspektivy [1-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-arylbenzimidazoles: Synthesis, Properties, Prospects] / T.O. Hubaeva // Vestnik Bashkirskogo universiteta [Bulletin of Bashkir University]. — 2011. — Vol.16. — №3. — P. 663-667. [in Russian]

5. Hubaeva T.O. Sintez, svojstva i antioksidantnaja aktivnost' proizvodnyh benzimidazola s fragmentom prostranstvenno-zatrudnennogo fenola [Synthesis, Properties and Antioxidant Activity of Benzimidazole Derivatives with a Fragment of Spatially Hindered Phenol] / T.O. Hubaeva // Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Himija. Biologija. Farmacija [Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy]. — 2014. — №3. — P. 42-47. [in Russian]

6. Hubaeva T.O. Issledovanie antioksidantnoj aktivnosti v oblasti 1-(3,5-di-tret-butil-4-gidroksifenil)-2-arilbenzimidazolov [A Study of Antioxidant Activity of 1-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)-2-arylbenzimidazoles] / T.O. Hubaeva // Zhurn. obshhej himii [Journal of General Chemistry]. — 2013. — Vol. 83. — Iss. 9. — P. 1481-1485. [in Russian]

7. Hubaeva T.O. Izuchenie svjazi «struktura-aktivnost'» proizvodnyh benzimidazola s fragmentom prostranstvenno-zatrudnennogo fenola [A Study of the Structure-Activity Relationship of Benzimidazole Derivatives with a Fragment of Sterically Hindered Phenol] / T.O. Hubaeva // Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Serija: Himija. Biologija. Farmacija [Bulletin of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy]. — 2015. — №2. — P. 46-50. [in Russian]

8. Gosudarstvennaja farmakopeja RF XIV izdanija [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition]. — URL: https://femb.ru/record/pharmacopea14 (accessed: 11.02.2022). [in Russian]

9. Zueva L.P. Mikrobiologicheskij monitoring i jepidemiologicheskij analiz antibiotikorezistentnosti mikroorganizmov s ispol'zovaniem komp'juternoj programmy WHONET [Microbiological Monitoring and Epidemiological Analysis of Antibiotic Resistance of Microorganisms Using the WHONET Computer Programme] / L.P. Zueva. — SPb.: MIAC, 2005. — P. 68. [in Russian]

10. Halafjan A.A. STATISTICA 6 / A.A. Halafjan. — M.: Binom-Press, 2007. — 512 p. [in Russian]