

ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКАЯ СТАТЬЯ

Синтез и исследование противомикробной активности производных нифуроксазида**Н. Г. Сидоров^{1,2#}, А. Д. Кравченко¹, А. В. Поддубиков², В. Г. Арзуманян²**¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, Москва, Российская Федерация² ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова РАМН, Москва, Российская Федерация[#] Для корреспонденции: Никита Сидоров, e-mail: deel@yandex.ru**Ключевые слова:** нитрофураны, нифуроксазид, синтетические химиотерапевтические препараты**DOI:** 10.18527/2500-2236-2019-6-1-1-9

Получена 25 октября 2018 г.

Принята к печати 5 января 2019 г.

Опубликована 31 марта 2019 г.

АННОТАЦИЯ

В связи с постоянно растущим числом инфекций, вызываемых устойчивыми к синтетическим антибактериальным препаратам и антибиотикам микроорганизмами, основные усилия исследователей всего мира направлены на решение данной проблемы. Одним из самых эффективных среди антибактериальных препаратов является класс замещенных нитрофuranов. Синтезированы 4 аналога нифуроксазида (представителя нитрофuranового ряда), структура которых подтверждена с помощью ЯМР, ИК спектроскопии и масс-спектрометрии. Все полученные соединения изучены на противомикробную и противогрибковую активность.

Активность по отношению к бактериям *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* и *Pseudomonas aeruginosa* оценивали методом диффузии в агар. Полученные вещества подавляли рост всех исследованных штаммов бактерий, кроме *Escherichia coli*; диаметр зон ингибирования находился в пределах от 13.5 до 28 мм в зависимости от концентрации исследуемого вещества и штамма бактерий. Одно из изученных в этой работе соединений – пиридиновый аналог нифуроксазида – превзошло по активности стандарт (нифуроксазид) по отношению к *Staphylococcus aureus* и поэтому может считаться перспективным соединением для разработки новых антибактериальных средств. Определение ингибирующей активности синтезированных препаратов по отношению к дрожжевым грибам *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans* проводили с помощью метода последовательных разведений с оценкой эффекта по изменению окраски индикатора. Ни одно из полученных соединений не проявило активности в отношении данных культур.

Полученные результаты подтверждают, что замещенные аналоги нифуроксазида обладают противомикробной активностью и являются перспективными кандидатами для разработки новых антибактериальных средств.

Synthesis and study of the antimicrobial activity of nifuroxazole derivatives**Nikita G. Sidorov^{1,2#}, Alexey D. Kravchenko¹, Alexander V. Poddubikov², Vera G. Arzumanian²**¹ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation² Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation[#] Corresponding author: Nikita Sidorov, e-mail: deel@yandex.ru**Keywords:** nitrofuran, nifuroxazole, synthetic chemotherapeutic drugs**ABSTRACT**

The number of infections caused by microorganisms that are resistant to antibiotics and synthetic antibacterial drugs is growing fast worldwide. This is one of the most important and urgent problems in health care. The main efforts of researchers around the world are focused on solving this issue. Nitrofurans represent one of the most effective classes of antibacterial drugs. We have synthesized 4 analogues of nifuroxazole – a well known nitrofuran antibiotic – and confirmed their structures by NMR, IR spectroscopy, and mass-spectrometry. All of the obtained compounds were studied for antimicrobial and antifungal activity.

Activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Pseudomonas aeruginosa* was evaluated by the agar diffusion method. The synthesized compounds suppressed the growth of all the studied bacterial strains except *Escherichia coli*; the diameter of the inhibition zones ranged from 13.5 to 28 mm depending on the concentration of the tested compound and bacterial strain. One of the compounds studied in this project – the pyridine analogue of nifuroxazole – exceeded the activity of the standard (nifuroxazole) against the *Staphylococcus aureus*. The inhibitory activity of the synthesized compounds

against the *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* yeasts was determined using the microdilution method. The results were assessed according to the indicator color change. None of the studied compounds showed activity against these cultures.

The obtained results confirm that substituted nifuroxazides have significant antimicrobial activity and, therefore, can be considered as promising candidates for developing new antibacterial drugs.

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение числа штаммов микроорганизмов, резистентных к противомикробным препаратам, широко распространено по всему миру и является серьезной проблемой современного здравоохранения и ветеринарии [1]. Пациенты, инфицированные устойчивыми к противомикробным препаратам штаммами, имеют более высокий риск летального исхода, чем пациенты с инфекциями, вызванными нерезистентными штаммами микроорганизма того же вида [2]. Совершенствование и создание новых противомикробных синтетических препаратов является одной из главных задач современной фармацевтической науки [2, 3].

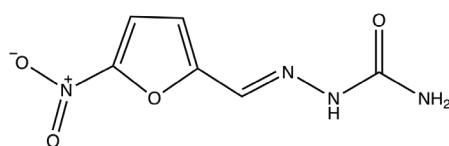
В научных исследованиях по поиску новых синтетических противомикробных препаратов отмечается интерес к производным нифуроксазида. Так, в статье Rollas *et al.* [4] приводится обзор достаточно большого числа соединений, структурно похожих на нифуроксазид, с различными заместителями в *пара*- и *орто*-положениях бензольного кольца, большинство из которых проявляют высокую фармакологическую активность, сравнимую с современными препаратами фторхинолонового ряда. В обзоре Thota *et al.* [5] приведены примеры производных нитрофурана, которые применяются в качестве антибактериальных средств (Рис. 1). Авторы этого обзора делают вывод о перспективности разработки новых лекарственных препаратов на основе ацилгидразонов, к которым относятся замещенные аналоги нифуроксазида.

Tavares *et al.* [6] описали синтез и изучение антибактериальной активности изостеров нифуроксазида по отношению к *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).

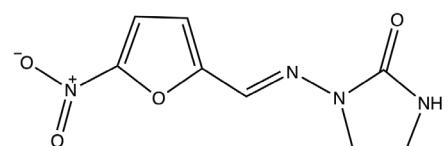
По данным Masunari *et al.* [7], новые соединения ряда нифуроксазида обладали активностью против мультирезистентного *S. aureus*. В этих исследованиях некоторые тиофеновые аналоги нифуроксазида проявили более высокую антибактериальную активность, чем сам нифуроксазид. Нифуроксазид и его аналоги также проявляли значительную активность по отношению к паразитам *Trypanosoma cruzi* [8, 9] и *Leishmania donovani* [10]. По данным Rando *et al.* [10], тиофеновые аналоги нифуроксазида значительно более активны по отношению к паразиту *Leishmania donovani*, чем соответствующие фурановые производные.

Нитрофураны активны в отношении многих грам-положительных и грамотрицательных микроорганизмов, некоторых видов грибов и простейших. В зависимости от концентрации эти вещества обладают бактериостатическим или бактерицидным действием [11]. Одним из главных достоинств нитрофуранов является медленное формирование устойчивости микроорганизмов к данному классу соединений [12].

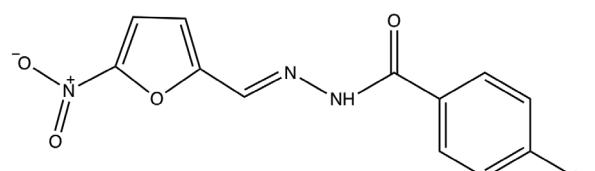
Несмотря на то, что несколько соединений ряда нитрофурана применяются в качестве лекарственных препаратов в различных странах, механизм действия этих соединений детально не изучен. Считается, что при восстановлении этих веществ соответствующими ферментами в бактериях образуются очень активные интермедиаты, которые разрушают ДНК, РНК и другие макромолекулы, а также нарушают ряд жизненно важных процессов, таких как формирование клеточной стенки или синтез белков [13].



Нитрофуразон



Нитрофурантоин



Нифуроксазид

Рис. 1. Антимикробные лекарственные препараты – производные нитрофурана [5].

Возможно, что именно широкий спектр антимикробной активности этих соединений является причиной отсутствия выраженной бактериальной резистенции к этим препаратам.

В последнее время в научной литературе также активно обсуждается возможность применения соединений нитрофуранового ряда в качестве антираковых препаратов. Так, несколько публикаций посвящено изучению ингибирующего действия нифуроксазида на рост раковых клеток и опухолей [14-17].

Целью данного исследования был поиск нового эффективного синтетического противомикробного средства группы нитрофуранов. Основываясь на литературных данных, было решено синтезировать изостеры нифуроксазида, содержащие диметиламино-группу, а также его тиофеновые аналоги и исследовать противомикробную активность полученных соединений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез соединений

Ацилгидразоны были синтезированы методом конденсации гидразидов с нитро-производными ароматических альдегидов по модифицированной методике [10] (Рис. 4). В круглодонную колбу объемом 500 мл вносили соответствующий ароматический альдегид и растворяли его в этаноле при нагревании до 50°C и перемешивании. После растворения к смеси порциями в течение 30 мин добавляли эквимолярное количество гидразида и продолжали перемешивать еще 10 мин, проводя контроль прохождения реакции с помощью тонкослойной хроматографии (TCX). После окончания реакции смесь выливали в холодную воду, а полученный продукт кристаллизовали из воды.

Подтверждение структуры и чистоты соединений

Полученные соединения были проанализированы с помощью ЯМР, ИК спектроскопии и масс-спектрометрии. Чистоту всех синтезированных веществ определяли с помощью методов TCX и LC-MS (liquid chromatography – mass-spectrometry) (Schimadzu Analytical HPLC LC10Avp, SPD-10A, autosampler Gilson 215, ELSD Sedex 75, Mass analyzer PE SCIEX API 165, Япония). Результаты ЯМР (HTLab AG Avance III, Швейцария) и ИК спектроскопии (HTLab AG MPA, Швейцария) подтвердили структуру полученных соединений, а данные TCX и LC-MS показали их высокую чистоту. Спектральные данные, а также результаты TCX и LC-MS представлены ниже.

5-Нитро-2-фуранкарбоксальдегид *p*-диметиламинобензоил гидразон (фурановый аналог) – ярко-оранжевый порошок, плохо растворимый в этаноле, почти нерастворимый в воде. Выход 91%. TCX (этанол: гексан 1:5, $R_f = 0.6$). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.94 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 7.82 (d, $J=8.14$ Hz, 2H), 7.79 (d, $J=4.42$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J=4.42$ Hz, 1H),

6.77 (d, $J=8.14$ Hz, 2H), 3.00 (s, 6H). ИК (KBr) ν (cm $^{-1}$): 3417 (NH), 1529 (C=O), 1354 (NO $_2$). LC-MS, вода/ацетонитрил/трифторуксусная кислота: 7.01 мин, (m/z): 303.4 (M+1).

3-Нитробензальдегид *p*-диметиламинобензоил гидразон (бензоидный аналог) – порошок желтого цвета, растворим в горячем этаноле, почти нерастворим в воде, плохо растворим в диоксане. Выход 92%. TCX (этанол: гексан 1:5, $R_f = 0.4$). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.60 (br s, 1H), 8.53 (s, 2H), 8.25 (d, $J=8.5$ Hz, 1H), 8.14 (d, $J=7.5$ Hz, 1H), 7.83 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 7.75 (m, 1H), 6.75 (d, $J=8.2$ Hz, 2H), 3.00 (s, 6H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 163.2, 153.6, 148.3, 143.5, 136.7, 133.2, 130.4, 129.4, 123.9, 120.6, 119.1, 110.9, 39.6. ИК (KBr) ν (cm $^{-1}$): 3039 (CH), 1628 (C=O), 1352 (NO $_2$). LC-MS: 7.32 мин., (m/z): 313.3 (M+1).

5-Нитро-2-тиоференкарбоксальдегид *p*-диметиламинобензоил гидразон (тиофеновый аналог) – кристаллический порошок ярко-красного цвета, хорошо растворим в горячем этаноле, плохо растворим в воде, гексане. Выход 87%. TCX (этанол: гексан 1:5, $R_f = 0.5$). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 11.90 (br s, 1H), 9.62 (s, 1H), 8.11 (d, $J=5.43$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J=7.84$ Hz, 2H), 7.51 (d, $J=5.43$ Hz, 1H), 6.26 (d, $J=7.84$ Hz, 2H), 3.00 (s, 6H). ^{13}C NMR (75.5 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 163.3, 152.7, 150.4, 147.5, 139.3, 130.6, 129.5, 128.9, 118.7, 110.8, 39.58. ИК (KBr) ν (cm $^{-1}$): 3052 (CH), 1342 (NO $_2$), 603/682 (C – S). LC-MS: 7.37 мин., (m/z): 319.3 (M+1).

5-Нитро-2-тиоференкарбоксальдегид изоникотинойл гидразон (пиридиновый аналог) – порошок зелено-желтого цвета, хорошо растворимый в горячем этаноле, плохо растворим в воде, гексане. Выход 91%. TCX (этанол: гексан 1:5, $R_f = 0.8$). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 12.5 (s, 1H), 8.8 (d, 2H), 8.7 (s, 1H), 8.3 (d, 1H), 7.8 (d, 2H), 7.6 (d, 1H). ИК (KBr) ν (cm $^{-1}$): 3392 (NH), 1652 (C=N), 583/672 (C – S). LC-MS: 5.72 мин., (m/z): 277.3 (M+1).

Используемые культуры

В качестве тест-культур использовали штаммы наиболее распространенных возбудителей инфекционных заболеваний и внутрибольничных инфекций [18]. Использовали штаммы *Escherichia coli* №241 (*E. coli*), *S. aureus* №906, *Staphylococcus haemolyticus* №209 (*S. haemolyticus*), *Pseudomonas aeruginosa* № 27853 (*P. aeruginosa*), *Candida albicans* №927 (*C. albicans*) и *Cryptococcus neoformans* №3465 (*Cr. neoformans*), полученные из Центра коллективного пользования, Коллекция НИИВС им. И. И. Мечникова.

Оценка антимикробной активности препаратов

Для оценки антимикробной активности использовали метод диффузии в агар; активность соединений определяли путем сравнения размеров зон ингибирования роста бактерий по описанной ранее методике [19, 20]. Поскольку исследуемые вещества плохо растворялись в воде и диффундировали в агар, метод модифицировали, увеличив концентрацию препаратов до 2 мг/мл (в отличие от 1 мг/мл, предлагаемого фармакопеей). Для получения нужной концентрации

предварительно растворяли 0.1 г исследуемых образцов в 1.3 мл 37% HCl с последующим добавлением 50 мл H₂O и нагреванием. Так как все исследованные соединения обладали основными центрами, которые протонировались в кислой среде, pH конечных растворов приближался к физиологическому. В качестве препарата сравнения использовали коммерческое лекарственное средство Энтерофурил (Bosnalijek, Босния и Герцеговина) в капсулах, содержащих 200 мг нифуроксазида. С целью определения пороговой чувствительности были оценены активности растворов в разведениях в 2, 4 и 8 раз. Разведение образцов проводили в физиологическом растворе.

Для оценки чувствительности бактерий использовали агар Мюллера-Хинтона (МХА) в соответствии с методикой, описанной ранее [21]. Для приготовления инокулята колонии бактерий суспенсировали в стерильном изотоническом растворе до плотности 0.5 по стандарту мутности МакФарлана. Инокуляты наносили на чашки с МХА и равномерно распределяли с помощью микробиологического шпателя Дригальского. Стерильным пробойником делали лунки диаметром 10 мм с последующим внесением в них 100 мкл растворов исследуемых веществ. На каждой чашке было проделано 4 лунки, концентрация в первой лунке составляла 2 мг/мл, в последней – 0.25 мг/мл для каждого из 5 исследуемых веществ. После внесения образцов в агар, содержащий культуру бактерий, чашки Петри инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение суток. После инкубации результат эксперимента определяли путем измерения диаметров зон ингибирования роста бактерий.

Определение противогрибковой активности препаратов по отношению к штаммам *C. albicans* и *Cr. neoformans*, выращенным на глюкозо-пептонно-дрожжевой среде при 25°C в течение 19 ч, проводили методом последовательных разведений в круглодонном 96-луночном планшете (Медполимер, Россия) (Рис. 5) [22-24]. Планшет был поделен на 2 части. В верхней части испытывали активность по отношению к *C. albicans*, в нижней части – по отношению к *Cr. neoformans*. Каждая часть состояла из пяти рядов для исследования активности каждого из пяти веществ. Шестой ряд служил контролем. Препараты, растворенные в диметилсульфоксиде (ДМСО), вносили в первую лунку ряда в объеме 10 мкл и далее осуществляли двукратные серийные разведения. Контролем служил ДМСО, разведенный аналогичным образом. Концентрация препарата в первой ячейке составляла 1024 мкг/мл, а в последней – 8 мкг/мл. Затем в каждую лунку вносили 190 мкл супензии клеток культуры дрожжей в синтетической питательной среде с конечной концентрацией клеток 10³ колониеобразующих единиц (КОЕ/мл), содержащей pH-индикатор бромкрезоловый синий (pH среды 5.5, цвет индикатора – голубой). Изменение цвета индикатора с голубого на желтый указывает на изменение pH среды культивирования, что свидетельствует о росте данных штаммов и об отсутствии активности испытуемых образцов. В эксперименте

была использована синтетическая питательная среда, приготовленная по методике Yarrow [25]. Перемешивание осуществляли в момент внесения большего объема среды в меньший объем препарата. Инкубацию проводили в стационарном режиме при 32°C. Результаты учитывали визуально через 48 ч инкубации.

Статистическая обработка данных

Эксперименты по определению антимикробной и антигрибковой активности проводили 3 раза и рассчитывали средние значения. Все данные были подвергнуты статистическому анализу. Результаты обрабатывали с помощью стандартного программного пакета Microsoft Excel для Windows. Данные представляли как среднее (M) ± квадратичное отклонение (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Синтез веществ и проверка их чистоты

При выполнении исследования исходили из предположения о возможности получения более эффективного изостера существующего лекарственного средства путем направленной модификации его структуры с сохранением фармакофора.

После изучения структуры активных нитрофuranов был выделен фармакологически значимый фрагмент – 2-иминометил-5-нитрофuran (Рис. 2).

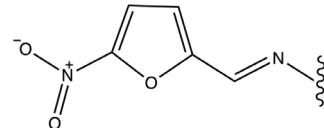


Рис. 2. Структура фармакофора (2-иминометил-5-нитрофuran).

За основную идею было принято предположение, что структура, необходимая для проявления антибактериальной активности, должна содержать нитрогруппу в пятом положении и иминометильную группу во втором положении фуранового кольца, что создает огромное разнообразие изостеров как бензодидного, так и гетероциклического ряда с различными группировками в боковой цепи. Структуры основных объектов исследования представлены на Рис. 3.

Схемы синтеза производных нифуроксазида приведены на Рис. 4. Реакции проводились в этаноле при кипячении.

Результаты ЯМР и ИК спектроскопии подтвердили структуру полученных соединений, а данные ТСХ и LC-MS показали их высокую чистоту. Данные анализа представлены в разделе «Материалы и методы».

Ингибирующая активность соединений в отношении бактерий и дрожжевых грибов

Результаты измерения зон ингибирования роста бактерий для всех образцов на тест-культурах бактерий представлены в Таблице 1. Положительным

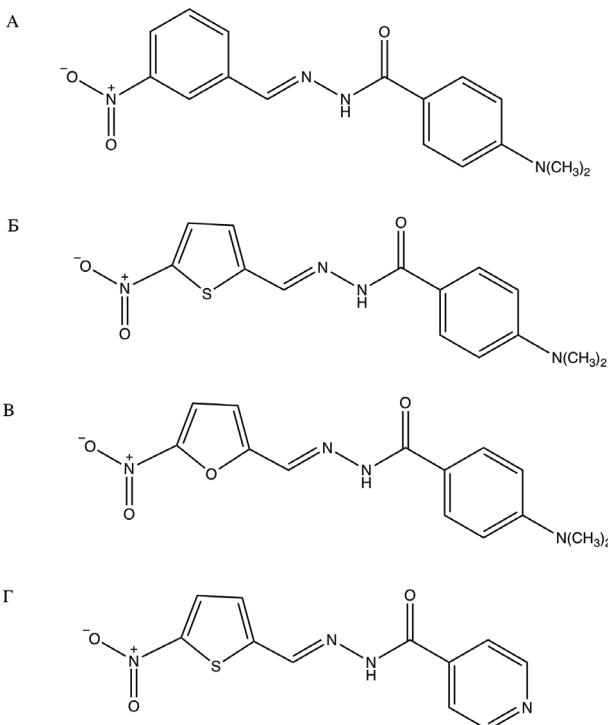
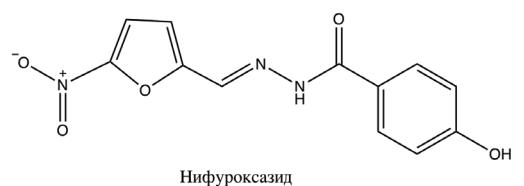


Рис. 3. Химические структуры изученных соединений. А – бензоидный аналог (аналог 1), гетероциклические аналоги: Б – тиофеновый аналог (аналог 2), В – фурановый аналог (аналог 3), Г – пиридиновый аналог (аналог 4).

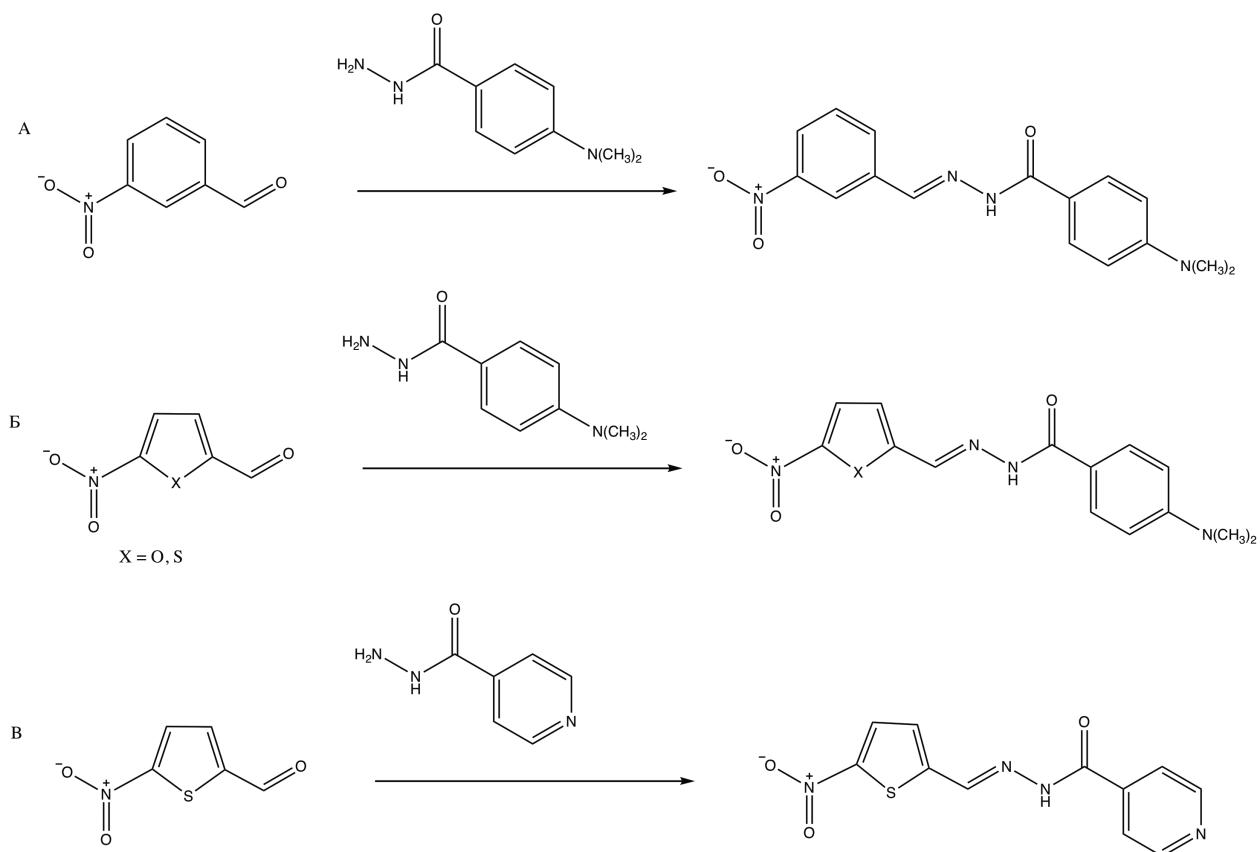


Рис. 4. Схемы синтеза производных нифуроксазида. А – синтез бензоидного аналога (аналог 1), Б – синтез тиофенового и фуранового аналогов (аналоги 2 и 3), В - синтез пиридинового аналога (аналог 4).

контролем служил коммерческий лекарственный препарат Энteroфурил. Определение зон ингибирования роста бактерий показало, что контрольный препарат Энteroфурил подавлял рост *S. aureus*, *S. haemolyticus* и *P. aeruginosa* в концентрации 2.0 мг/мл и не подавлял рост этих микроорганизмов в меньших концентрациях (1.0 и 0.5 мг/мл). Ни в одной из использованных концентраций Энteroфурил не подавлял рост *E. coli*. В работе использовали штамм *E. coli* № 241, не относящийся к энтеропатогенной группе, что не исключает чувствительности других штаммов, в том числе патогенных групп, к действию Энteroфурила. Аналогичные результаты были получены для аналогов 1, 2 и 3. В отличие от Энteroфурила и аналогов 1, 2 и 3, пиридиновый аналог (аналог 4) ингибировал рост *S. aureus* не только в концентрации 2.0 мг/мл, но и в концентрациях 1.0 и 0.5 мг/мл. Ингибирующая активность аналога 4 в отношении *P. aeruginosa*, *S. haemolyticus* и *E. coli* не отличалась от активности остальных веществ.

Результаты изучения ингибирующей активности полученных соединений в отношении *C. albicans* и *Cr. neoformans* представлены на Рис. 5. За 48 ч инкубации индикатор изменил цвет с голубого на желтый в контрольных лунках с раствором ДМСО и во всех лунках с испытуемыми образцами, что свидетельствует о закислении среды продуктами метаболизма дрожжей, т. е. об их беспрепятственном росте. Следовательно, ни один из исследованных образцов, так же как и контрольный препарат Энteroфурил, не был активен в отношении *C. albicans* и *Cr. neoformans* в указанном диапазоне концентраций.

ОБСУЖДЕНИЕ

Противомикробная активность полученных четырех аналогов нифуроксазида была изучена по отношению

к штаммам *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, а также к клинически значимым видам дрожжей *C. albicans* и *Cr. neoformans*. Изучение противомикробной активности полученных соединений показало, что при концентрации 2.0 мг/мл все исследуемые препараты проявляли активность в отношении штаммов *S. aureus*, *S. haemolyticus*, *P. aeruginosa*. Лишь пиридиновый аналог (аналог 4) ингибировал рост штамма *S. aureus* также при концентрациях 1.0 и 0.5 мг/мл. Ни один из исследованных препаратов не оказывал ингибирующего воздействия на штамм *E. coli*. Также ни один из испытуемых образцов не был активен в отношении дрожжей *C. albicans* и *Cr. neoformans* в рассмотренном диапазоне концентраций.

Анализ данных по антибактериальной активности изученных соединений позволяет сделать вывод, что замена пятичленного гетероароматического кольца на шестичленное бензольное привела к заметному уменьшению противомикробной активности, при этом все фурановые и тиофеновые изостеры ингибировали рост микроорганизмов не менее выражено, чем стандарт (нифуроксазид). Этот результат, вероятно, свидетельствует о принципиальной важности наличия пятичленной π-избыточной ароматической системы в структуре данных образцов. Переход от фуранового кольца к тиофеновому при наличии объемного заместителя в боковой цепи (диметиламино-группы) незначительно повлиял на противомикробную активность, при этом фурановые и тиофеновые изостеры мало отличались по степени ингибирования роста микроорганизмов от стандарта (нифуроксазида). Наибольший интерес представляет аналог 4 – пиридиновый нифуроксазид, в котором совмещены тиофеновое кольцо, пиридиновый фрагмент и отсутствие крупного заместителя в боковой цепи. Этот препарат превзошёл по активности стандарт (нифуроксазид).

Таблица 1. Диаметр зон ингибирования роста тест-культур для изученных соединений

Производные нифуроксазида, используемая концентрация (мг/мл)	Диаметр зон ингибирования роста тест-культур (мм)			
	<i>S.aureus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
1. Бензоидный аналог (аналог 1)				
2 мг/мл	15.5±0.5	17.5±0.5	14.0±0.5	0
1 мг/мл	0	0	0	0
0.5 мг/мл	0	0	0	0
2. Тиофеновый аналог (аналог 2)				
2 мг/мл	15.3±0.6	20.0±0	18.3±0.3	0
1 мг/мл	0	0	0	0
0.5 мг/мл	0	0	0	0
3. Фурановый аналог (аналог 3)				
2 мг/мл	18.5±0.5	22.3±0.6	16.0±0	0
1 мг/мл	0	0	0	0
0.5 мг/мл	0	0	0	0
4. Пиридиновый аналог (аналог 4)				
2 мг/мл	25.3±0.6	27.8±0.3	18.0±0	0
1 мг/мл	18.3±0.3	0	0	0
0.5 мг/мл	16±0	0	0	0
5. Энteroфурил				
2 мг/мл	19.7±0.3	21.2±0.3	21.5±0.5	0
1 мг/мл	0	0	0	0
0.5 мг/мл	0	0	0	0

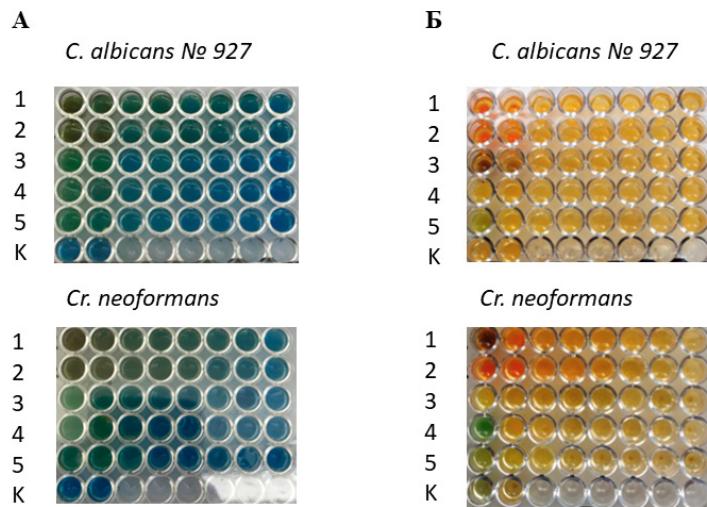


Рис. 5. Рост дрожжей *C. albicans* № 927 и *Cr. neoformans* № 3465 в присутствии исследованных образцов: А – 0 ч инкубации, Б – 48 ч инкубации. В первой лунке планшета концентрация препаратов равна 1024 мкг/мл и далее уменьшается с шагом 2 до 8 мкг/мл в последней лунке. Цифрами обозначены соединения: 1 – тиофеновый аналог (аналог 2), 2 – фурановый аналог (аналог 3), 3 – пиридиновый аналог (аналог 4), 4 – бензоидный аналог (аналог 1), 5 – Энтерофурил. К – отрицательный контроль (лунки 1 и 2), содержащий чистый ДМСО.

При изучении различных замещенных в ряду гетероциклических соединений одного класса обычно удается найти зависимость антибактериальной активности препаратов от их структуры и распределения электронной плотности в молекуле. В случае производных нифуроксазида анализ литературных данных и полученных нами результатов не позволил сделать конкретных выводов в этом отношении.

Согласно современным представлениям о механизме действия нифуроксазида и его аналогов, активная форма лекарственного препарата образуется в результате восстановления вещества соответствующими ферментами в бактериях [13]. Исходя из этого, логично предположить, что активность аналогов нифуроксазида зависит от их редокс-потенциала и, соответственно, от наличия электронно-донорных или электронно-акцепторных заместителей в молекуле. Действительно, по данным Masunari и Tavares [7], введение электронно-акцепторных заместителей в *пара*-положение бензольного кольца тиофеновых аналогов нифуроксазида приводит к повышению активности препаратов по отношению к *S. aureus*, а введение электронно-донорных заместителей соответственно понижает активность аналогов. Однако это противоречит данным Rando *et al.* [26], изучавших действие этих соединений на *Mycobacterium tuberculosis* и показавших, что препараты с донорными заместителями проявляют значительно большую активность, чем соответствующий галогенсодержащий аналог, по отношению к этому штамму бактерий. Данное предположение также не подтверждается результатами, полученными Popiolek и Biernasiuk [27] и Zorzi *et al.* [28], которые изучали активность фурановых аналогов нифуроксазида. Согласно данным этих авторов, биологическая активность препаратов по отношению к *S. aureus* не зависит от введения

электронно-донорных или электронно-акцепторных заместителей в *пара*-положение бензольного кольца. Отсутствие такой зависимости подтверждается также результатами Paula *et al.* [29], которые определили редокс-потенциалы фурановых и тиофеновых аналогов нифуроксазида. Эти авторы пришли к выводу, что введение различных заместителей в молекулу очень слабо влияет на редокс-потенциал, а редокс-потенциалы замещенных фуранового и тиофенового рядов различаются незначительно. Их выводы могут служить объяснением противоположных результатов, полученных в работах Tavares *et al.* [30] и Alsaeedi *et al.* [31] при сравнении активности замещенных фуранового и тиофенового рядов по отношению к различным штаммам бактерий.

Изучение активности синтезированных соединений по отношению к клинически значимым видам дрожжей *C. albicans* № 927 и *Cr. neoformans* № 3465 показало, что как полученные нами четыре аналога нифуроксазида, так и стандарт – Энтерофурил, – не оказывали ингибирующего действия на рост этих дрожжей в изученном диапазоне концентраций. Это соответствует литературным данным. Так, Popiolek и Biernasiuk [27] показали, что замена окси-группы в молекуле нифуроксазида на такие заместители, как галоген, метокси-группа, аминогруппа или диметиламино-группа, не приводила к появлению активности по отношению к *C. albicans* ATCC 10231. Единственный описанный ими ароматический аналог нифуроксазида, проявивший весьма слабую активность к этим дрожжам, содержал фрагмент гидразида никотиновой кислоты. Из двадцати двух ароматических аналогов нифуроксазида, изученных Zorzi *et al.* [28], лишь половина соединений проявила весьма слабую активность по отношению к *C. albicans* ATCC 537Y.

Поскольку на основании известных в настоящее время данных не удается определить зависимость антимикробной активности от структуры молекулы, поиск новых активных соединений в ряду аналогов нифуроксазида является весьма нетривиальной задачей. В этих условиях обнаружение нами нового активного соединения – пиридинового аналога нифуроксазида – представляет значительный интерес с точки зрения разработки новых гетероциклических антимикробных препаратов – производных фурана и тиофена.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы не преследуют коммерческих или финансовых интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Покудина ИО, Шкурат МА, Батталов ДВ. Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам. Живые и биокосные системы 2014; 10. <http://www.jbks.ru/archive/issue-10/article-10>.
- World Health Organization. Antimicrobial resistance. Available: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Зубов ПВ, Новикова ВВ. Разработка новых антибактериальных препаратов: проблемы и перспективы. Современные проблемы науки и образования 2015; 5. <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22672>.
- Rollas S, Kucukguzel SG. Biological activities of hydrazone derivatives. *Molecules* 2007; 12(8), 1910-39. PubMed PMID: 17960096.
- Thota S, Rodrigues DA, Pinheiro PSM, Lima LM, Fraga CAM, Barreiro EJ. N-Acylhydrazones as drugs. *Bioorg Med Chem Lett* 2018; 28(17), 2797-806. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.07.015.
- Tavares LC, Penna TC, Amaral AT. Synthesis and biological activity of nifuroxazole and analogs. *Boll Chim Farm* 1997; 136(3), 244-9. PubMed PMID: 9164164.
- Masunari A, Tavares LC. A new class of nifuroxazole analogues: synthesis of 5-nitrothiophene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorg Med Chem* 2007; 15(12), 4229-36. doi: 10.1016/j.bmc.2007.03.068.
- Paula FR, Jorge SD, de Almeida LV, Pasqualoto KF, Tavares LC. Molecular modeling studies and in vitro bioactivity evaluation of a set of novel 5-nitroheterocyclic derivatives as anti-*T. cruzi* agents. *Bioorg Med Chem* 2009; 17(7), 2673-9. doi: 10.1016/j.bmc.2009.02.056.
- Palace-Berl F, Pasqualoto KF, Jorge SD, Zingales B, Zorzi RR, Silva MN, et al. Designing and exploring active N'-(5-nitrofuran-2-yl) methylene] substituted hydrazides against three *Trypanosoma cruzi* strains more prevalent in Chagas disease patients. *Eur J Med Chem* 2015; 96, 330-9. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.03.066.
- Rando DG, Avery MA, Tekwani BL, Khan SI, Ferreira EI. Antileishmanial activity screening of 5-nitro-2-heterocyclic benzylidene hydrazides. *Bioorg Med Chem* 2008; 16(14), 6724-31. doi: 10.1016/j.bmc.2008.05.076.
- Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии. Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. Смоленск: НИИАХ СГМА; 2007.
- Козлов РС, Голуб АВ. Выбор антимикробных препаратов при неосложненных инфекциях мочевых путей: как принять соломоново решение? Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2014; 16(1), 18-25.
- Drugbank. Available: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00698>.
- Sarvi S, Crispin R, Lu Y, Zeng L, Hurley TD, Houston DR, et al. ALDH1 Bio-activates Nifuroxazole to Eradicate ALDH(High) Melanoma-Initiating Cells. *Cell Chem Biol* 2018; 25(12), 1456-69. e6. doi: 10.1016/j.chembiol.2018.09.005.
- Nelson MI, Viboud C, Simonsen L, Bennett RT, Griesemer SB, George KS, et al. Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918. *PLoS Pathog* 2008; 4(2), e1000012. doi: 10.1371/journal.ppat.1000012.
- Yang F, Hu M, Lei Q, Xia Y, Zhu Y, Song X, et al. Nifuroxazole induces apoptosis and impairs pulmonary metastasis in breast cancer model. *Cell Death Dis* 2015; 6, e1701. doi: 10.1038/cddis.2015.63.
- Zhu Y, Ye T, Yu X, Lei Q, Yang F, Xia Y, et al. Nifuroxazole exerts potent anti-tumor and anti-metastasis activity in melanoma. *Sci Rep* 2016; 6, 20253. doi: 10.1038/srep20253.

ЦИТИРОВАНИЕ

Сидоров НГ, Кравченко АД, Поддубиков АВ, Арзуманян ВГ. Синтез и исследование противомикробной активности производных нифуроксазида. *MIR J* 2019; 6(1), 1-9. doi: 10.18527/2500-2236-2019-6-1-1-9.

АВТОРСКИЕ ПРАВА

© 2019 Сидоров и др. Эта статья публикуется в свободном доступе в соответствии с лицензией Creative Commons AttributionNonCommercial-ShareAlike 4.0 International Public License (CC BY-NC-SA), которая позволяет неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любых носителях при условии, что указываются автор и источник публикации, а материал не используется в коммерческих целях.

18. World Health Organization. Prevention of hospital-acquired infections. Available: <https://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/en/whocdscsreph200212.pdf?ua=1>
19. Государственная фармакопея Российской Федерации XIII издание. ОФС.1.2.4.0010.15. Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар.
20. Andrews JM, Testing BWPoS. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 8). *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(3), 454-89. doi: 10.1093/jac/dkp244.
21. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Клинические рекомендации. Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии; 2018, 11-18.
22. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. CLSI document M27-A. Clinical and Laboratory Standards Institute; 1997.
23. Alastruey-Izquierdo A, Melhem MS, Bonfietti LX, Rodriguez-Tudela JL. Susceptibility Test for Fungi: Clinical and Laboratorial Correlations in Medical Mycology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2015; 57(Suppl 19), 57-64. doi: 10.1590/S0036-46652015000700011.
24. Rakant A, Arzumanian VG, Popkov VA. In-vitro determination of antimycotic activity of the fluconazole generics on Russian pharmaceutical market. *Clin Exp Pharmacol* 2017; 7(6) (Suppl), 51. doi: 10.4172/2161-1459-C1-025.
25. Yarrow D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. Chapter 11 in C. P. Kurtzman, J. W. Fell (Eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study*, 4th ed., Elsevier, Amsterdam; 1998, pp. 77–101. doi: 10.1016/B978-044481312-1/50014-9.
26. Rando DG, Sato DN, Siqueira L, Malvezzi A, Leite CQ, do Amaral AT, et al. Potential tuberculostatic agents. Topliss application on benzoic acid [(5-nitrothiophen-2-yl)-methylene]-hydrazide series. *Bioorg Med Chem* 2002; 10(3), 557-60. PubMed PMID: 11814842.
27. Popolek L, Biernasiuk A. Synthesis and investigation of antimicrobial activities of nitrofurazone analogues containing hydrazide-hydrazone moiety. *Saudi Pharm J* 2017; 25(7), 1097-102. doi: 10.1016/j.jps.2017.05.006.
28. Zorzi RR, Jorge SD, Palace-Berl F, Pasqualoto KF, Bortolozzo Lde S, de Castro Siqueira AM, et al. Exploring 5-nitrofuran derivatives against nosocomial pathogens: synthesis, antimicrobial activity and chemometric analysis. *Bioorg Med Chem* 2014; 22(10), 2844-54. doi: 10.1016/j.bmc.2014.03.044.
29. Paula FR, Trossini GHG, Ferreira EI, Serrano SHP, Menezes CMS, and Tavares LC. Theoretical and Voltammetric Studies of 5-Nitro-heterocyclic Derivatives with Potential Trypanocidal Activities. *J Braz Chem Soc* 2010; 21(4), 740-9. doi: 10.1590/S0103-50532010000400022.
30. Tavares LC, Chiste JJ, Santos MG, Penna TC. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. II. *Boll Chim Farm* 1999; 138(8), 432-6. PubMed PMID: 10622109.
31. Alsaeedi HS, Aljaber NA, Ara I. Synthesis and investigation of antimicrobial activity of some nifuroxazide analogues. *Asian J Chem* 2015; 27(10), 3639-3646. doi: 10.14233/ajchem.2015.18896.