

УДК 547.78: 582.288

ДЕЙСТВИЕ ФЕНОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗИМИДАЗОЛА НА РОСТ И ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ *E. COLI*

© 2013 З.П. Белоусова,¹ Н.А. Кленова, И.А. Макеева²

Исследовано дозозависимое действие на рост и общую дегидрогеназную, каталазную и сукцинатдегидрогеназную активность *E. Coli* фенольных производных бензимидазола, содержащих метильную группу и гликозильный радикал (изученные концентрации — 50–200 мкг/мл). Все соединения оказывают дозозависимое бактериостатическое действие и вызывают напряжение метаболических процессов, что выражается в увеличении активных концентраций дегидрогеназ и каталазы. Наибольшим повреждающим воздействием обладает 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенил-2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -*D*-глюкопиранозид в концентрации 200 мкг/мл.

Ключевые слова: бензимидазол, фенольные производные, *E.coli*, рост и ферментативная активность.

Введение

Производные бензимидазола и имидазола вследствие их структурной близости к пуринам, некоторым витаминным соединениям и ингибиторам цитохромов P-450 проявляют высокую биологическую активность, давно нашедшую применение в фармацевтической практике. В частности, известны иммуностропное, противоопухолевое, противовоспалительное, противовирусное, фунгицидное, анальгетическое, гипотензивное и другие виды фармакологической активности [1; 2]. Практическая ценность производных бензимидазолов стимулирует синтез новых соединений, выявление взаимного влияния бензольного и имидазольного колец при наличии функциональных групп в разных положениях. Значительный интерес представляет также изучение действия гликозидов бензимидазолов.

Проведенные нами ранее исследования показали, что 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенол проявляет выраженные фунгиостатические свойства в концентрациях 150–250 мкг/мл, задерживая рост

¹Белоусова Зоя Петровна (zbelousova@mail.ru), кафедра органической, биоорганической и медицинской химии Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

²Кленова Наталья Анатольевна (klenova.ssu@yandex.ru), Макеева Ирина Александровна (biochemistry@rambler.ru), кафедра биологической химии Самарского государственного университета, 443011, Российская Федерация, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

плесневых грибов *Aspergillus niger* и *Cladosporium herbarum* в среднем на 50 %. При этом данное соединение не проявляло гемолитического действия, что свидетельствовало о его малой токсичности [3; 4].

Известно, что плесневые грибы и бактерии в природе эффективно конкурируют, синтезируя и выделяя антибиотики. Поэтому определенный интерес представляют исследования действия фунгиостатических соединений на рост и метаболические процессы бактерий.

Целью данной работы стало изучение дозозависимого влияния 2-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенола (I), 4-(1*H*-бензимидазол-1-илметил) фенола (II), 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенола (III), 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенил-2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -D-глюкопиранозид (IV) на рост и ферментативную активность *E. coli*.

Материалы и методики исследования

Синтезы 2-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенола (I), 4-(1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенола (II), 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенола (III), 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенил-2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -D-глюкопиранозид (IV) описаны в [4; 5].

Дозы воздействия соединений составили 50, 100, 150, 200 мкг/мл диметилсульфоксида (DMSO). Контролем служило воздействие растворителя (DMSO).

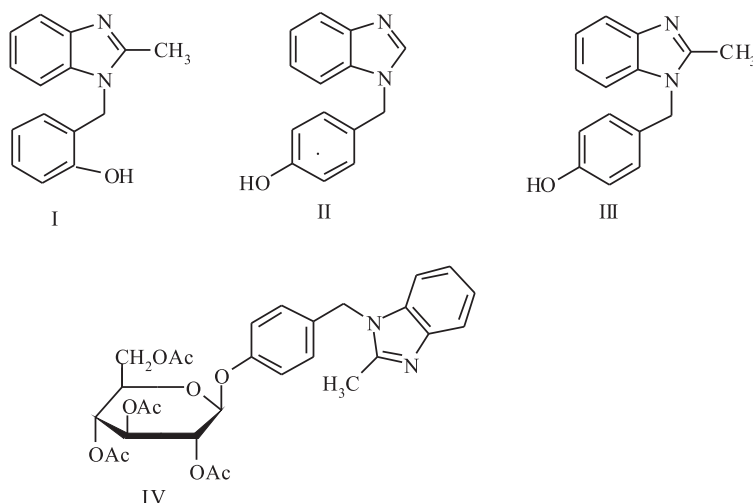


Рис. 1. Структурные формулы изученных производных бензимидазола (Ac — ацетильный радикал)

Определение характера роста *E. Coli*. Выращивание *E. coli* M-17 осуществляли на агаризованной среде LB в чашках Петри. Растворы соединений разной концентрации в количестве 100 мкл вносили в лунки $d=5$ мм, в контрольные пробы вносили по 100 мкл DMSO по 8 повторов для каждой концентрации и каждого соединения. После суточного роста при 37 °C измеряли зоны ограничения роста (мм).

Определение общей дегидрогеназной активности *E. coli*. Общую дегидрогеназную активность (ОДГ) определяли с помощью окислительно-восстановительного

индикатора — 2,3,5-трифенилтетразолиум хлорида (3 %-ного водного раствора), который, восстанавливаясь, окрашивает исследуемый раствор в розовый цвет [6].

В 3 мл суточного инокулята *E.coli* в среде LB добавляли 0,2 мл 2,3,5-трифенилтетразолиум хлорида, анализируемое вещество добавляли в зависимости от дозы воздействия, при 50 мкг/мл — 30 мкл, при 100 мкг/мл — 60 мкл, при 150 мкг/мл — 90 мкл, а при 200 мкг/мл — 120 мкл. В контрольные колбы добавляли сходное с опытом количество DMSO. Инкубировали 24 ч при 37 °С. Затем измеряли оптическую плотность при длине волны 492/630 нм на приборе ИФА START FAX 3200 (USA).

Активность ДГ = оптическая плотность × 1000 (у. е.)

Подготовка гомогената бактерий для определения активностей сукцинатдегидрогеназы и каталазы. 3 мл инокулята *E.coli* в среде LB гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера с добавлением 0,2 мл 0,2 %-ного тритона X-100 в течение 3-х минут. Оставляли для экстрагирования ферментов на 2 ч при 12 °С. Центрифугировали в режиме 650g, 10 мин при 0 °С для удаления фрагментов и неразрушенных клеток. В полученном супернатанте определяли активность ферментов. Для расчета удельной активности проводили определение содержания белка по методу Лоури.

Метод определения каталазной активности. В 2 мл 0,03 %-ного раствора перекиси водорода добавляли 0,1 мл гомогената бактерий, анализируемое вещество в опытные и растворитель в контрольные пробы в соответствии с дозой и разведением. Пробы оставляли на 10 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением 1 мл 4 %-ного молибдата аммония. В холостые пробы молибдат аммония добавляли сразу. Интенсивность окраски измеряли на спектрофотометре СФ-46 (Россия), длина волны 410 нм.

Активность рассчитывали по формуле:

$A \text{ мкат/мг белка в мл гомогената} = (E_{\text{хол.}} - E_{\text{оп.}}) \cdot 1000 / 22,2 \cdot 600 \times \times \text{белок (мг/мл)}$ [7].

Метод определения активности сукцинатдегидрогеназы. Инкубационная смесь состояла из 2,5 мл 100 мМ натрий-фосфатного буфера, рН 7,8; 0,2 мл 2 мМ феррицианида калия и 0,1 мл гомогената. Анализируемое вещество в опытные и растворитель в контрольные пробы добавили в соответствии с дозой и разведением. Реакцию запускали добавлением 0,2 мл 10 мМ раствора сукцината натрия. Регистрировали изменение оптической плотности в течение 2 минут (λ 420 нм, СФ-46, Россия).

Активность рассчитывали по формуле:

$A \text{ (мМ/мин на мг белка в мл гомогената)} = \Delta E \cdot 1000 \cdot 3,0 / 2 \cdot 10^{-3} \cdot 0,1 \times \times \text{белок (мг/мл)}$ [8].

Для статистической обработки результатов использовали критерий Стьюдента. Во всех случаях эмпирические выборки соответствовали нормальному распределению, а дисперсии групп сравнения отличались незначительно (для $p = 0,05$) [9]. Расчеты проводили с использованием бесплатного пакета программ SPSS 14.

Результаты и их обсуждение

У всех изученных соединений обнаружено бактериостатическое действие, так как регистрировались только зоны ограниченного роста, а не полного его отсутствия (в зонах присутствовали отдельные точечные колонии). Наибольший ингибирующий эффект у 2-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенола (I),

4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенола (III) и 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенил-2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -D-глюкопиранозида (IV) проявляется в дозе 200 мкг/мл. У 4-(1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенола (II) критической концентрацией оказывается 150 мкг/мл, увеличение дозы до 200 мкг/мл не усиливает ингибирующий эффект (рис. 2).

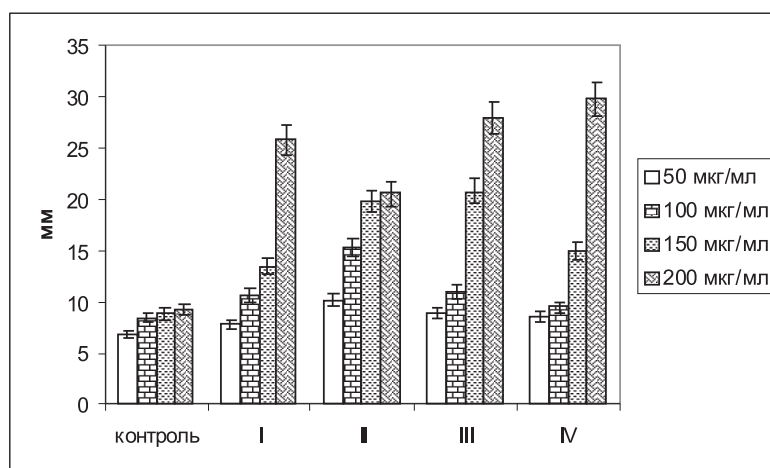


Рис. 2. Зоны ограничения роста *E. Coli* при выращивании на твердой среде с добавлением производных адамантана в лунки. Достоверность различий с контролем для всех доз от $P < 0,05$ до $P < 0,01$.

Максимальное увеличение зоны ограничения роста наблюдали при действии III и IV в дозе 200 мкг/мл — 207 и 222 % соответственно. В концентрации 150 мкг/мл больший бактериостатический эффект оказали производные II и III (рис. 2), отличающиеся друг от друга только наличием метильной группы (III). Четко выраженный дозозависимый эффект выявили у соединения I, имеющего метильную группу в бензимидазольном кольце, как и III, но оксигруппу в ортоположении фенольного фрагмента. Однако максимально изученная доза 2-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенола давала достоверно меньший бактериостатический эффект, чем 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенол и 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенил-2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -D-глюкопиранозид.

Воздействие всех соединений сопровождалось увеличением у *E. Coli* общей дегидрогеназной активности (ОДА), сукцинатдегидрогеназной и каталазной активности клеток. Это свидетельствует об ответном напряжении метаболических процессов, причем практически во всех случаях не прослеживается четкой зависимости эффекта активации от дозы соединения, хотя наибольший процент повышения выявляется при действии максимально используемой дозы — 200 мкг/мл, кроме ОДА при действии соединения III (см. таблицу).

Наибольший эффект увеличения активности при культивировании в жидкой среде так же, как и эффект подавления роста на твердой среде, характерен для 4-(2-метил-1*H*-бензимидазол-1-илметил)фенил-2,3,4,6-тетра-*O*-ацетил- β -D-глюкопиранозида (таблица). Это может быть связано с облегчением поступления соединения внутрь клеток за счет присутствия гликозидного радикала.

Наибольшие изменения характерны для сукцинатдегидрогеназной активности, фермента, чрезвычайно важного для окислительных процессов кишечной палоч-

Таблица

Ферментативная активность клеток *E. coli* в процентах от контроля при действии различных концентраций фенольных производных бензимидазола*

Концентрация	50 мкг/мл	100 мкг/мл	150 мкг/мл	200 мкг/мл
Общая дегидрогеназная активность, %				
I	40	9	9	62
II	64	12	12	144
III	59	41	9	15
IV	22	35	20	54
Сукцинатдегидрогеназная активность, %				
I	53	55	54	60
II	64	60	64	72
III	87	83	93	94
IV	104	102	105	160
Каталазная активность, %				
I	36	25	25	48
II	37	25	26	40
III	41	38	34	49
IV	45	29	50	82

*Примечание. Все отклонения от контроля достоверны с уровнями значимости от $P < 0,05$ до $P < 0,01$.

ки, использующей, кроме кислородного, фумаратное дыхание. Образующийся при этом сукцинат окисляется в цикле трикарбоновых кислот и стимулирует как кислородное дыхание, так и окислительное фосфорилирование. Полученные данные свидетельствуют о том, что данные производные не являются ингибиторами ферментов окислительного метаболизма *E. Coli*, а служат причинами развития окислительного стресса и гибели части клеток из-за чрезмерного напряжения метаболизма.

Литература

- [1] Навашин С.П. Антифунгальная химиотерапия. Успехи и проблемы // Антибиотики и химиотерапия, 1998. № 8. С. 3–6.
- [2] Нифонтов В.И., Бельская Н.П. Производные имидазола. Синтез и противоопухолевая активность имидазола и родственных веществ // Химико-фармацевтический журнал. 1986. Т. 20. № 3. С. 277–281.
- [3] Действие 4-(2-метил-1H-бензимидазол-1-илметил)фенола на показатели роста грибов видов *Aspergillus niger* и *Cladosporium herbarum* / Е.Ю. Атлашова [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2010. № 9. С. 33–36.
- [4] Белоусова З.П., Осянин В.А., Кленова Н.А. Гемолитическая активность 4-(1H-бензимидазол-1-илметил)- и 4-(2-метил-1H-бензимидазол-1-илметил)фенолов // Хим.-фарм.журнал. 2004. Т. 37. № 5. С. 38–41.
- [5] Осянин В.А., Пурьгин П.П., Белоусова З.П. Синтез и гликозилирование 4-(1H-азол-1-илметил)фенолов // Известия вузов. Сер.: Химия и химическая технология. 2003. Т. 46. Вып. 1. С. 138–141.

- [6] Романенко М.А. Экология микробиология пресных водоемов. Л.:Наука, 1974. 192 с.
- [7] Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк [и др.] // Лаб. дело. 1988. № 1. С. 16–19.
- [8] Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхарда. М.: Мир, 1984. Т. 2. С. 396–397.
- [9] Леонов В.П., Ижевский П.В. Об использовании прикладной статистики при подготовке диссертационных работ по медицинским и биологическим специальностям // Бюл. ВАК РФ. 1997. № 5. С. 56–61.

Поступила в редакцию 4/II/2013;
в окончательном варианте — 4/II/2013.

EFFECT OF PHENOLIC DERIVATIVES OF BENZIMIDAZOLE ON GROWTH AND ENZYME ACTIVITY OF *E. COLI*

© 2013 Z.P. Belousova,³ N.A. Klenova, I.A. Makeeva⁴

Dose-response study (concentration of 50–200 mkg/ml) effect on growth total dehydrogenase, catalase, sukcinatdehydrogenase activity of *E. COLI* phenolic benzimidazole derivatives containing a methyl group and the glycoside radical is researched. All compounds have dozo-respouse bacteriostatic effect and cause metabolic stress, resulting in higher concentrations of active dehydrogenase and catalase. Most damaging effect has 4(2-methyl-1H-benzimidazol-ylmethyl)phenyl-2,3,4,6-tetra-*O*-azethyl- β -D-glucopyranozyd in a concentration of 200 mkg/ml.

Key words: phenolic benzimidazole derivates, *E.coli*, growth and enzyme activity.

Paper received 4/II/2013.
Paper accepted 4/II/2013.

³Belousova Zoya Petrovna (zbelousova@mail.ru), the Dept. of Organic, Bioorganic and Medical Chemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russian Federation.

⁴Klenova Natalia Anatolyevna (klenova.ssu@yandex.ru), Makeeva Irina Alexandrovna (biochemistry@rambler.ru), the Dept. of Biological Chemistry, Samara State University, Samara, 443011. Russian Federation.