

УДК 619, 547.836 + 616.31

ОЦІНКА АНТИБАКТЕРІЙНОЇ АКТИВНОСТІ СПОЛУК-ГІБРИДІВ ТРИ- І БІЦИКЛІЧНИХ ГЕТЕРООСНОВ — ІНГІБІТОРІВ СИНТЕЗУ РНК

О. В. Васильченко¹, Д. П. Єгоров², О. С. Маньковська¹, І. Г. Трунцева¹,
С. М. Григор'єва³, В. Г. Костіна¹, Л. Г. Пальчиковська¹
l.palchykovska@ukr.net

¹Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України
вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

²Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця МОЗ України
вул. Проспект перемоги, 34, Київ, 03057, Україна

³ДУ Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського
НАМН України вул. Амосова, 4, Київ, 03038, Україна

Мета роботи полягала в оцінці антибактерійної активності гібридних сполук інгібіторів синтезу РНК та їхньої здатності зв'язуватися з ДНК. Антибактерійну активність сполук досліджено на клінічних штамах трьох бактерій — *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* і *Pseudomonas aeruginosa* та оцінено за ступенем гальмування росту тест-мікроорганізмів методом двократних розведень у рідкому культуральному середовищі. Здатність до зв'язування гібридних сполук з ДНК досліджували за методом міграції НК у агарозному гелі. Виявлено концентраційно- та структуро-залежну антимікробну дію бактерицидного характеру всіх використаних сполук щодо грампозитивних патогенних мікроорганізмів. Найефективнішою виявилася

сполука **6** [4-(1H-Бензоксазол-2-іл)-10-тіоксантенон], яка пригнічувала ріст обох бактерій із значеннями мінімальної бактерицидної концентрації (МБС) 7,6 мМ. Показано, що сполуки **1** [1-(1H-бенімідазол-2-іл)феназин], **2** [4-(1H-Бензімідазол-2-іл)-10H-акридин-9-он] та **4** [4-(1H-Бензімідазол-2-іл)-10-тіоксантенон] зв'язуються з ДНК.. Висунуто припущення, що саме ДНК-зв'язувальна здатність сполуки **2** може бути відповідальною за інгібування нею активності РНК-полімерази фагу T7.

Ключові слова: ГІБРИДНІ СПОЛУКИ, АНТИБАКТЕРІЙНА АКТИВНІСТЬ, ІНГІБІТОРИ СИНТЕЗУ РНК, ДНК-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНА ЗДАТНІСТЬ

EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HYBRID COMPOUNDS BETWEEN THREE- AND TWO-MEMBERED HETECYCLICS — INHIBITORS OF RNA SYNTHESIS

A. V. Vasylychenko¹, D. P. Egorov², O. S. Mankovska¹, I. G. Truntseva¹,
S. M. Grigoryeva³, V. G. Kostina¹, L. G. Palchykovska¹
l.palchykovska@ukr.net

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine
150 Zabolotnoho Str., Kyiv, 03680, Ukraine

²O. O. Bogomolets National Medical University Ministry of Health of Ukraine 34 p
rospekt Peremogy Str., Kyiv, 03057, Ukraine

³SI «L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases
of AMS Ukraine» 5 Amosova Str., Kyiv, 03038, Ukraine

The current work aims to evaluate the antibacterial activity of hybrid compounds the inhibitors of RNA synthesis and their DNA-binding ability. Antibacterial activity of compounds against the clinical strains of bacteria *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* was investigated by serial two-fold dilution method in a liquid medium. DNA binding ability of hybrid compounds was studied by the DNA migration through agarose gel assay. The significant concentration- and structural-dependent bactericidal action of hybrid compounds against Gram-positive pathogens was observed. The compound **6** [4-(1,3-benzoxazol-2-yl)-9H-thioxanthen-9-one], which inhibits both

bacteria with MBC values of 7.6 μM was determined as the most effective. It was shown, that compounds **1** [1-(1H-benzimidazol-2-yl)phenazine], **2** [4-(1H-benzimidazol-2-yl)acridin-9(10H)-one] and **4** [4-(1H-benzimidazol-2-yl)-9H-thioxanthen-9-one] are able to bind to DNA duplexes. It is suggested that the inhibition of phage T7 RNA polymerase by compound **2** can occur due to its DNA-binding ability.

Key words: HYBRID COMPOUNDS, ANTIBACTERIAL ACTIVITY, INHIBITORS OF RNA SYNTHESIS, DNA-BINDING ABILITY

ОЦЕНКА АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СОЕДИНЕНИЙ-ГИБРИДОВ ТРИ- И БИЦИКЛИЧЕСКИХ ГЕТЕРООСНОВАНИЙ — ИНГИБИТОРОВ СИНТЕЗА РНК

А. В. Васильченко¹, Д. П. Егоров², О. С. Маньковская¹, И. Г. Трунцева¹,
С. М. Григорьева³, В. Г. Костина¹, Л. Г. Пальчиковская¹
l.palchykovska@ukr.net

¹Институт молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук Украины ул. Акад. Заболотного, 150, Киев, 03680, Украина

²Национальный медицинский университет им. О. О. Богомольца МОЗ Украины ул. проспект Победы, 34, Киев, 03057, Украина

³ДУ Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л. В. Громашевского НАМН Украины ул. Амосова, 4, Киев, 03038, Украина

Цель данной работы заключалась в оценке антибактериальной активности гибридных соединений ингибиторов синтеза РНК и их способности связываться с ДНК. Антибактериальная активность соединений исследовалась на клинических штаммах трех бактерий — *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* и *Pseudomonas aeruginosa* и оценивалась по степени торможения роста тестовых микроорганизмов методом двукратных разведений в жидкой культуральной среде. Способность к связыванию гибридных соединений с ДНК исследовалась методом миграции НК в агарозном геле. Обнаружено концентрационно- и структуро-зависимое антимикробное действие бактерицидного характера всех исследованных соединений относительно грамположительных патогенных микроорганизмов. Самым эффективным оказалось соединение **6** [4-(1H-Бензоксазол-2-ил)-10-тиоксантенон], которое

подавляет рост обеих бактерий со значениями минимальной бактерицидной концентрации (МБС) 7,6 μM . Показано, что соединения **1** [1-(1H-бензимидазол-2-ил) феназина], **2** [4-(1H-Бензимидазол-2-ил)-10H-акридин-9-он] и **4** [4-(1H-Бензимидазол-2-ил)-10-тиоксантенон] связываются с ДНК. Выдвинуто предположение, что именно ДНК-связывающая способность соединения **2** может быть ответственной за ингибирование ею активности РНК-полимеразы фага Т7.

Ключевые слова: ГИБРИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ, ИНГИБИТОРЫ СИНТЕЗА РНК, ДНК-СВЯЗЫВАЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ

Резистентність патогенних мікроорганізмів до антибіотиків становить сьогодні велику проблему сучасної

медицини [1–4]. Представники родів *Staphylococcus*, *Enterococcus* і *Pseudomonas* є провідними збудниками внутрішньолікарняних та опортуністичних інфекцій. Представники родів *Staphylococcus* і *Enterococcus* — одні з найбільш поширених у мікробіотопах людини та тварин грам-позитивних мікроорганізмів. Бактерії роду *Staphylococcus*, зокрема *Staphylococcus aureus*, є збудниками багатьох захворювань: гнійних інфекцій (ангіни, тонзилітів), хвороб центральної нервової системи (менінгітів, абсцесу мозку) тощо [2]. Найбільш поширеним видом серед ентерококів є *Enterococcus faecalis*. Його вірулентні штами можуть викликати інфекції сечостатевого шляху, менінгіт, ендокардит та інші хвороби [3]. Мікроорганізми виду *Pseudomonas aeruginosa* є опортуністичними патогенами людини та деяких тварин і активізуються в разі ослаблення імунітету носія [4]. Для всіх зазначених мікробних патогенів характерна висока здатність формувати стійкі форми до антимікробних препаратів. Серед основних причин, що сприяють виникненню резистентності, є нерациональна антибіотикотерапія як людини, так і тварин, а також використання антибіотиків в якості стимуляторів росту у тваринництві. Проблема резистентності у тваринництві небезпечна через те, що дозволяє стійким штамам бактерій з генами резистентності передаватись через харчові ланцюги від сільськогосподарських тварин і при безпосередньому контакті від домашніх тварин до людей [1]. Таким чином, актуальним є пошук нових лікарських засобів, ефективних у боротьбі з цими патогенами.

Відомо, що гетероциклічні сполуки входять до складу протеїнів, нуклеїнових кислот, коензимів, а також беруть участь у багатьох хімічних процесах, що здійснюються в живих клітинах. Значна частина сучасних лікарських препаратів різного призначення як природного, так і синтетичного походження, представлена

моно- та поліядерними гетероциклічними сполуками [5, 6].

Серед синтезованих за участі авторів похідних феназину та акридону виявлено низку сполук із виразною антибактерійною та антивірусною активністю, які ефективно пригнічували синтез РНК і ДНК у модельних системах транскрипції та реплікації [7–8]. Тому було висловлено припущення, що мішенню для них є ензиматичні комплекси біосинтезу нуклеїнових кислот вірусів та бактерій.

У попередній роботі [9] описано синтез гібридних сполук акридону, тіоксантону, феназину з біциклічними азолами — бензімідазолом, бензотіазолом і бензоксазолом, серед яких виявлено ефективні інгібітори синтезу РНК. Мета роботи полягала в оцінці антибактерійної активності гібридних інгібіторів синтезу РНК та з'ясуванні їхньої здатності зв'язуватись з ДНК.

Матеріали і методи

Гібридні сполуки. **1** — 1-(1*H*-бензімідазол-2-ил)феназин, **2** — 4-(1*H*-бензімідазол-2-ил)акридин-9(10*H*)-он, **3** — 4-(1,3-бензтіазол-2-ил)акридин-9(10*H*)-он, **4** — 4-(1*H*-бензімідазол-2-ил)-9*H*-тіоксантен-9-он, **5** — 4-(1,3-бензтіазол-2-ил)-9*H*-тіоксантен-9-он, **6** — 4-(1,3-бензоксазол-2-ил)-9*H*-тіоксантен-9-он. Гібридні сполуки синтезовано за методом циклізації в поліфосфорній кислоті (ПФК) (150–160 °C), яка одночасно слугувала розчинником і каталізатором реакції [10]. Сполуку **1** синтезовано безпосередньою конденсацією феназин-1-карбонової кислоти з о-фенілендіаміном. Сполуки **2–6** отримували у дві стадії. Спершу в умовах реакції Ульмана синтезували вихідні карбоксиариланіліни та карбоксиарилтіофеноли біциклічних азолів, подальша внутрішньомолекулярна гетероциклізація яких у присутності ПФК приводила до утворення відповідних сполук [10, 11].

Мікробіологічні дослідження.

У роботі використано штами *Staphylococcus*

aureus, *Enterococcus faecalis* і *Pseudomonas aeruginosa*, виділені від пацієнтів.

Тест-культури бактерій для подальшої роботи отримували шляхом висіву на тверде поживне середовище та подальшого інкубування протягом 24 годин при 37 °С. Колонії мікроорганізмів суспендували у фізіологічному розчині до рівня каламутності, що відповідає 0,5 ОД за стандартом McFarland.

Антимікробну активність гібридних сполук вивчали методом двократних серійних розведень у рідкому поживному середовищі ГРМ бульйоні (ВФС 42-3091-98, Росія), який готували відповідно до рекомендацій виробника.

У підготовлені 72-лункові стерильні планшети (інститут приладобудування РАМ, Росія) стерильно вносили по 0,5 мл середовища (крім першої лунки, де внесли 1 мл), додавали тестові речовини (розчинник ДМСО) у відповідних концентраціях та по 55 мкл суспензії тест-мікроорганізму у кінцевій концентрації $1,5 \times 10^6$ КУО у 1 см³ в кожен лунку. Інкубували 18–24 години за температури $36,7 \pm 0,3$ °С. Як контроль використовували лунки з відповідним рідким середовищем і культурою мікроорганізму, але без тест-агенту. Для контролю токсичності в окремі лунки замість розчину тест-речовин додавали ДМСО. Результати враховували візуально за наявністю видимого росту бактеріальної культури та методом висіву на щільні середовища для вирощування ентерококів — ентерококагар.

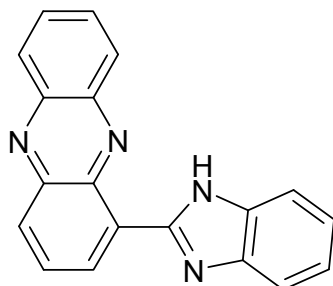
Мінімальну бактерицидну концентрацію (МБК) визначали як найменшу концентрацію антимікробного агенту, що забезпечувала повне

гальмування видимого росту тест-культури мікроорганізму [12].

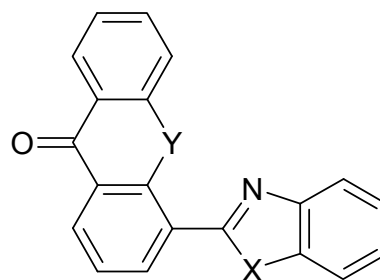
Дослідження зв'язування з ДНК. Здатність до зв'язування з ДНК досліджували за методикою, описаною у [8]. Для тестування використано плазмідну ДНК рTZ19R (Fermentas (Литва) довжиною 2862 пн. ДНК інкубували протягом 45 хв при кімнатній температурі з різною концентрацією речовин (200–500 мкМ) у ТБЕ-буфері (загальний об'єм 20 мкл). Детекцію результатів проводили за допомогою гель-електрофорезу в 1 % агарозі без додавання етидіум броміду (параметри 110 В, 75 мА). Гель фарбували розчином етидію броміду. ДНК візуалізували на транслюмінаторі в УФ-світлі і фотографували на апараті ChemiDoc™ XRS+System (Bio-Rad Laboratories, Inc, США).

Результати й обговорення

Ідея створення нової серії гібридних сполук полягала у поєднанні фармакофорних три- і біциклічних гетерооснов з метою збагатити їхні біологічні властивості. Нежорстка структура таких гібридних молекул обумовлює їхню конформаційну мінливість, що, вірогідно, сприятиме ефективнішій взаємодії з ензиматичною мішенню. Синтезовані гібридні сполуки, залучені до антибактерійного тестування, відрізнялися за природою гетероатомів у певних положеннях трициклічного та біциклічного фрагментів (рис. 1). Скринінг проводили методом двократних розведень у рідкому культуральному середовищі, результати якого наведено у таблиці.



Сполука 1



Сполуки 2–6

Рис. 1. Схематичне зображення структури гібридних сполук (2–6 — пояснення у таблиці)

Як видно з таблиці, грамнегативні бактерії *P. aeruginosa* виявилися нечутливими до всіх тест-агентів, на відміну від досліджуваних грампозитивних бактерій. Найчутливішою виявилася бактерія *E. faecalis*, при чому значення мінімальної бактерицидної концентрації (МВС) тест-сполук коливалися в близьких межах від 9 до 7,6 μM . Натомість,

активність речовин щодо *St. aureus* значно залежала від їхньої структури. Так, найменшу антибактерійну дію мала сполука **4**, а найбільш ефективною виявилася сполука **6** з МВС 7,6 μM . Варто зазначити, що сполука **6** однаково ефективно пригнічувала обидві грампозитивні бактерії.

Таблиця

Результати антимікробного та ензиматичного скринінгу гібридних сполук

№	Y	X	<i>P. aeruginosa</i> , МВС μM	<i>St. aureus</i> , МВС μM	<i>En. faecalis</i> МВС μM	T7 РНКП IC ₅₀ μM
1 Phen.			—	16,8	8,4	-
2 Acr.	NH	NH	—	36,8	9,0	8,9
3 Acr.	NH	S	—	16,6	8,2	5,5
4 Тіох.	S	NH	—	126,4	7,8	-
5 Тіох.	S	S	—	15,7	7,9	19,8
6 Тіох.	S	O	—	7,6	7,6	45,3

Примітка: Phen. — похідне феназину; Acr. — похідні акридону; Тіох. — похідні тіоксантону; IC₅₀ — концентрація інгібітора, необхідна для пригнічення ензиматичної активності на 50 %

Транскрипція є ключовим процесом функціонування та репродукції клітин і визначається як одна з важливих мішеней антимікробної терапії [9]. Тому для селекції інгібіторів синтезу РНК використовувалася проста у застосуванні модельна система транскрипції РНК-полімерази фага Т7 (Т7 РНКП) [8]. І як було з'ясовано у попередньому дослідженні [9], сполуки **2**, **3** і **5** виявились ефективними інгібіторами синтезу РНК у цій системі. Важливою

рисою досліджуваних сполук є планарна структура обох фрагментів їхніх молекул, що може обумовлювати здатність останніх зв'язуватися з молекулами ДНК.

Дослідження гібридних сполук за методикою, описаною у [8], передбачає, що сполуки, які взаємодіють з ДНК, запобігають взаємодії з нею відомого інтеркалятора етидію броміду, в результаті чого смужка ДНК на електрофоретичному гелі частково або повністю зникає.

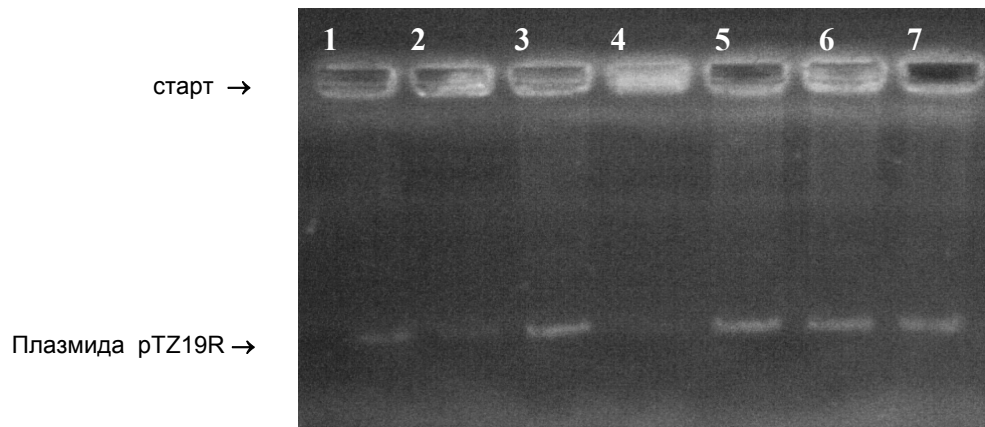


Рис. 2. Електрофореграма плазмиди rTZ19R, інкубованої за присутності гібридних сполук (доріжки 1–6) та – контроль — плазмиди rTZ19R без додавання сполук (доріжка 7). Типова електрофореграма із трьох незалежних експериментів

За результатом аналогічного дослідження, гібридні сполуки 1, 2 та 4 продемонстрували достовірну здатність зв'язуватися з ДНК (рис. 2), при чому найсильніше взаємодіяли з ДНК гібридні сполуки 2 і 4. Вірогідно, що сполука 2 пригнічує синтез РНК у модельній системі транскрипції T7 РНКП за рахунок її взаємодії з ДНК.

Висновки

Загалом всі використані сполуки проявили концентраційно- та структурозалежну антимікробну дію бактерицидного характеру щодо грампозитивних патогенних мікроорганізмів. Найефективнішою виявилася сполука 6 [4-(1h-Бензоксазол-2-ил)-10-тіоксантенон], яка блокувала ріст обох бактерій за значень мінімальної бактерицидної концентрації (МВС) 7,6 μM . Показано, що сполуки 1, 2 і 4 мають здатність зв'язуватися з ДНК.

Не виявлено прямої кореляції між активністю досліджуваних сполук у модельних ферментативній і бактеріальній системах (через індивідуальні особливості бактерійних транскрипційних комплексів поряд з іншими факторами). Відомо, що 3D-структури різних ДНК- та РНК-полімераз мають високий ступінь подібності, містять одні й ті самі структурні домени і консервативні мотиви [9]. Тому існують підстави вважати, що вірогідними молекулярними мішенями дії гібридних сполук у досліджуваних бактеріях можуть бути їхні РНК-синтезувальні комплекси, пригнічення функціонування яких деякими сполуками можна пояснити у тому числі і зв'язуванням з ДНК.

Перспективи подальших досліджень. Планується розширення переліку бактерій для тестування синтезованих гібридних сполук та більш детальне вивчення механізму їхньої дії.

1. Witte W. Medical Consequences of Antibiotic Use in Agriculture Science. *Science*, 1998, vol. 279, no 5353, pp. 996–997.

2. Chambers H. F. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases*, 2001, vol. 7, no. 2, pp.178–182.

3. Tendolkar P. M., Baghdayan A. S. and Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, vol. 60, no. 12, pp. 2622–2636.

4. Balcht, L. *Aldona, Smith, and P. Raymond*. *Pseudomonas Aeruginosa: Infections and Treatment. Informa Health Care*, 1994, pp. 83–84.

5. Demeunynck M., Charmantray F., Martelli A. Interest of acridine derivatives in the anticancer chemotherapy. *Current pharmaceutical design*, 2001, vol. 7, no. 17, pp. 1703–1724.

6. Goodell J. R, Madhok A. A., Hiasa H., Ferguson D. M. Synthesis and evaluation of acridine- and acridone-based anti-herpes agents with topoisomerase activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2006, vol. 14, no. 16, pp. 5467–5480.

7. Palchykovska L. H., Rybalko S. L., Rymar S. Iu., Starosyla D. B, Alexeeva I. V., Shved A. D. Vykorystannia modelnykh DNK-vmisnykh fermentatyvnykh system dlia poshuku inhibitoriv syntezy nukleinovykh kyslot virusiv ta bakterii [Using the model of DNA-containing enzyme systems to search for inhibitors of the synthesis of nucleic acids of viruses and bacteria]. *Laboratorna diahnozyka — Laboratory diagnosis*, 2010, vol. 3, no. 53, pp. 31–36 (in Ukrainian).

8. Stankiewicz-Drogon A., Palchykovska L. G., Kostina V. G., Alexeeva I. V., Shved A. D., Boguszevska-Chachulska A. M. New acridone-4-carboxylic acid derivatives as potential inhibitors of hepatitis C virus infection. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 2008, vol. 16, no. 19, pp. 8846–8852.

9. Kostina V. H., Palchykovska L. H., Platonov M. O., Vasylchenko O. V., Lysenko N. A., Alexeeva I. V. Novi hibrydni inhibitory RNK-polimerazy faha T7: syntezy, dokinh i skryninh in vitro [New hybrid inhibitors of the phage T7RNA polymerase: synthesis, docking and screening in vitro]. *Ukrainskyi biokhimichnyi zhurnal — Ukrainian Biochemical Journal*, 2012, vol. 24, no. 5, pp. 38–47 (in Ukrainian).

10. Hein D. W. Alheim R. J., Leavitt J. J. The use of polyphosphoric acid in the synthesis of 2-aryl- and 2-alkylsubstituted benzimidazoles, benzoxazoles and benzothiazoles. *Journal American Chemical Society*, 1957, vol. 79, no. 2, pp. 427–429.

11. Rope M., Isensee R. W., Joseph L. Derivatives of 2-phenylbenzimidazole. *Journal American Chemical Society*, 1952, vol. 74, no. 4, pp. 1095–1096.

12. Nakaz MOZ Ukrainy № 167 vid 05.04.2007 «Pro zatverdzhennia metodychnykh vkazivok shchodo vyznachennia chutlyvosti mikroorhanizmiv do antybakterialnykh preparativ»

[Order of MOH of Ukraine № 167 of 05.04.2007 «On the approval of guidelines to determine the sensitivity of microorganisms to antibiotics»]. Kyiv, Ministry of Health of Ukraine, 2007. 63 p. (in Ukrainian).