

АНТИБАКТЕРИАЛНА АКТИВНОСТ НА 4-ИЗОПРОПИЛ-ФЕНИЛ-МЕТИЛИДЕН-4-[1-(3,5,5,8,8-ПЕНТАМЕТИЛ-6,7-ДИХИДРОНАФТАЛЕН-2-ИЛ) ЕТЕНИЛ] БЕНЗОХИДРАЗИД

Надя Агова¹, Светлана Георгиева¹, Ивелин Илиев¹, Емилия Георгиева²,
Нели Ерменлиева³

¹Катедра „Фармацевтична химия“, Факултет по фармация,
Медицински университет – Варна

²УС „Медицински лаборант“, Медицински Колеж – Варна

³Катедра „Микробиология и вирусология“, Факултет по медицина,
Медицински университет – Варна

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF 4-ISOPROPYL-PHENYL-METHYLIDENE-4- [1- (3,5,5,8,8-PENTAMETHYL-6,7-DIHYDRONAPHTHAL-2-YL) ETHENYL] BENZOHYDRAZYDE

Nadya Agova¹, Svetlana Georgieva¹, Ivelin Iliev¹, Emilia Georgieva², Neli Ermenlieva³

¹Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy,
Medical University of Varna

²TRS Medical Laboratory Assistant, Medical College, Medical University of Varna

³Department of Microbiology and Virology, Faculty of Medicine,
Medical University of Varna

РЕЗЮМЕ

Нарастването на антибиотичната резистентност на микроорганизмите поради множество фактори насърчава непрекъснатото търсенето на нови съединения. Проучванията относно активността на хидразоните ги определят като обещаващи и перспективни съединения за по-нататъшни микробиологични изследвания. Целта на настоящото изследване е да се определи антибактериалната активност на новосинтезиран 4-изопропил-фенил-метилен-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтален-2-ил) етенил] бензохидразид, аналог на антинеопластичния препарат бексаротен. Анализът е извършен спрямо клинични изолати на *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Ключови думи: антибактериална активност, бексаротен, хидразид, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

The increase in antibiotic resistance of microorganisms encourages the constant search for new compounds. Studies on the activity of hydrazones identify them as promising compounds for further microbiological research. The aim of the present study is to determine the antibacterial activity of newly synthesized 4-isopropyl-phenyl-methylidene-4- [1- (3,5,5,8,8-pentamethyl-6,7-dihydronaphthalen-2-yl) ethenyl] benzohydrazide, an analog of the antineoplastic preparation bexarotene. The assay was performed against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

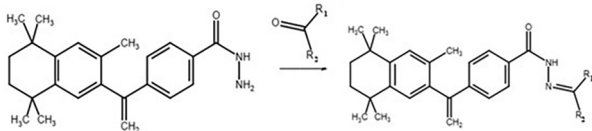
Keywords: antibacterial activity, bexarotene, hydrazide, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

ВЪВЕДЕНИЕ

Хидразоните представляват кондензационни продукти на хидразидите с различни по структура алдехиди и кетони. Поради това могат да се разглеждат като съединения свързани с кетон и алдехид, в който кислородният атом е заменен с $-NNH_2$ група. Тези азометини ($-NHN = CH-$) представляват важен клас съединения за разработване на нови лекарства (1,2).

За да бъде получен хидразон на бексаротен и 4-изопропил бензалдехид, протича процес, който се основава на взаимодействието на карбонилни съединения с хидразини. При този синтез е използван хидразинхидрат (5,6).

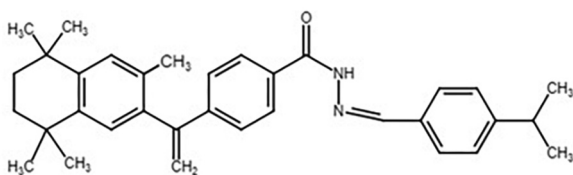
За синтез на целевия продукт хидразидът на бексаротен взаимодейства с алдехид, в случая с 4-изопропилбензалдехид. Принципа на процеса е представена на фиг. 1.



Фиг. 1. Обща схема за синтез на хидразони на бексаротен

В резултат на протеклия процес е получен хидразон на бексаротен и 4-изопропилбензалдехид, чиято структурна формула е представена на Фиг. 2.

4-изопропил-фенил-метилен-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтаден-2-ил) етенил] бензохидразид (V_B)

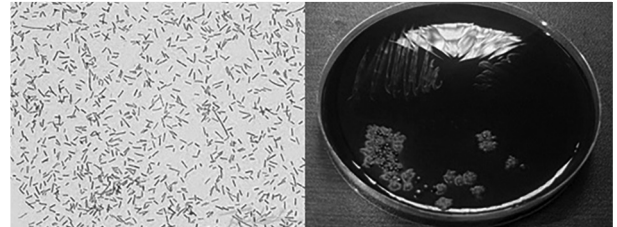


Фиг. 2. Структурна формула на хидразон на бексаротен и 4-изопропилбензалдехид.

За определяне на антибактериалната активност на новосинтезирания хидразон са използвани два щамове бактерии: *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* – клинични изолати.

Към семейство *Enterobacteriaceae*, род *Escherichia* се отнася видът *Escherichia coli*. Грам-отрицателни пръчици, които се разполагат единично или на двойки. Повечето представители са подвижни, защото притежават ресни. Някои щамове *E. coli* формират капсули, спори

не се образуват. Върху твърди хранителни среди образуват гладки, кръгли, понякога мукозни колонии. За култивирането им се използват диференциращи среди на МакКонки, Левин или агар на Ендо. В различните среди бактериалните колонии изглеждат по различен начин. На фиг. 3 е представена микроскопска снимка (оцветяване по метода на Грам) и посевка на *E. coli* в хранителна среда на Левин (4,8).

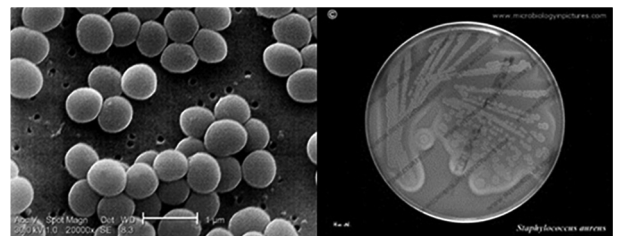


Фиг. 3. Микроскопска снимка и посевка на хранителна среда на Левин с култивирани колонии на *E. coli*

Staphylococcus aureus е представител на род *Staphylococcus*, грам-положителен, коковиден микроорганизъм. Някои щамове са способни да произвеждат стафилоксантин – златист каротеноиден пигмент, от тук произхожда името му – *aureus* (от латински – златен).

Клетъчните стени на грам-положителни бактерии се различават структурно от клетъчните стени на грам-отрицателни бактерии. Основният компонент на клетъчните стени на бактериите е пептидогликанът. Пептидогликанът е макромолекула, която е изградена от захари и аминокиселини. Той осигурява защита за бактерии и определя тяхната форма (7,9).

При наблюдение под микроскоп на култура от тях се наблюдават гроздовидно подредени коки. Някои щамове дават златистожълто оцветени колонии (продуцират каротеноидни пигменти) с бета хемолиза на кръвен агар. Те са представени на фиг. 4.



Фиг. 4. Електронно-микроскопска снимка и колония в кръвен агар на *S. aureus*

E. coli и *S. aureus* са съответно G- и G+ представители и често се използват при оценяване на

антимикробната активност на новосинтезирани съединения (10,3).

МЕТОДИ

Микробиологичният тест е проведен по четири различни методики:

1. Дифузионен метод с ямки в агар – cup plate technique.

За провеждане на методиката е използвана среда Мюлер - Хинтън агар. Тествани са следните микробиологични щамове – *E. coli* и *S. aureus* след плътна посевка са направени ямки с корк борър с диаметър 8 мм. Във всяка ямка са поставени по 40 µl от изследвания разтвор. Така приготвените проби се култивират в термостат аеробно в продължение на 24 часа при температура от 37°C.

2. Дискowo-дифузионен метод с напоени

Табл. 1. Заложени проби и техните концентрации, използвани по време на микробиологичното изследване

Съединение	Концентрация на съединението в метанол g/ml	Разреждане
V _B	0,0025 g в 50 cm ³ CH ₃ OH	V _B 5
V _B	0,0050 g в 50 cm ³ CH ₃ OH	V _B 10
Vex	0,0025 g в 50 cm ³ CH ₃ OH	Vex5
Vex	0,0050 g в 50 cm ³ CH ₃ OH	Vex10

стерилни дискове.

При втория метод също е използвана среда Мюлер - Хинтън агар.

Първоначално е направена плътна посевка с тампон на изследваните щамове – *E. coli* и *S. aureus*. Върху посевката са поставени напоени фабрично натоварени стерилни дискове (антибиотични) с по 20µl от изследвания разтвор. Извършено е аеробно култивиране при температура 37°C в продължение на 24 часа в термостат.

3. Минимална потискаща концентрация (МПК).

Минимална потискаща концентрация се дефинира като последната епруветка от редицата, при която няма макроскопски видима мътнина.

За определяне на МПК се използва хранителна среда месопептонен бульон (обикновен бульон).

В серия от 6 епруветки с по 1 ml хранителна среда е направено разреждане на изследвания разтвор от 1 до 1:16 (5 µg до 0,15 µg/ml).

Изследваните бактериални щамове са *E. coli* и *S. aureus* – по 0,1 ml във всяка епруветка стандартизирана бактериална култура – 0,5 MF (с денситометър).

4. Минимална бактерицидна концентрация (МБК)

Минимална бактерицидна концентрация е последното разреждане, при което бактериалният растеж е задържан. От епруветките, които демонстрират бистър разтвор, са направени пресявки – 1 йозе върху твърди хранителни среди, както следва:

- Левин за *Escherichia coli*
- Обикновен агар за *Staphylococcus aureus*.

Култивирането е осъществено аеробно при 37°C в продължение на 24 часа в термостат.

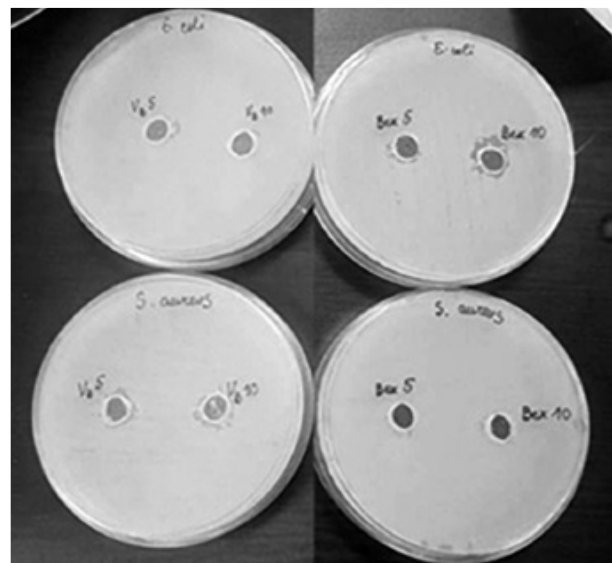
По време на опита са пресети епруветки от МПК от разреждания 1; ½; ¼ (*E. coli*) върху хранителна среда Левин, както и епруветки от МПК от разреждания 1; ½; ¼ (*S. aureus*) върху хранителна среда обикновен агар.

Заложените проби и техните концентрации са представени на табл. 1.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1 методика:

Дифузионен метод с ямки в агар – cup plate technique.



Фиг. 5. Дифузионен метод с ямки в агар – cup plate technique при проби на бексаротен (Vex) и 4-изопропил-фенил-метилен-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтален-2-ил)] етенил бензохидразид (V_B)

Направена е плътна посевка от стандартизирана бактериална култура с денситометър до стойности 0,5 MF.

При проведения анализ на антибактериална активност не се наблюдава чувствителност при повечето от пробите, с изключение на много малка – около 1 mm над диаметъра на ямката има при $V_B 10$ (*S. aureus*) и $Bex 10$ (*E. coli*). получените данни са представени на фиг. 5.

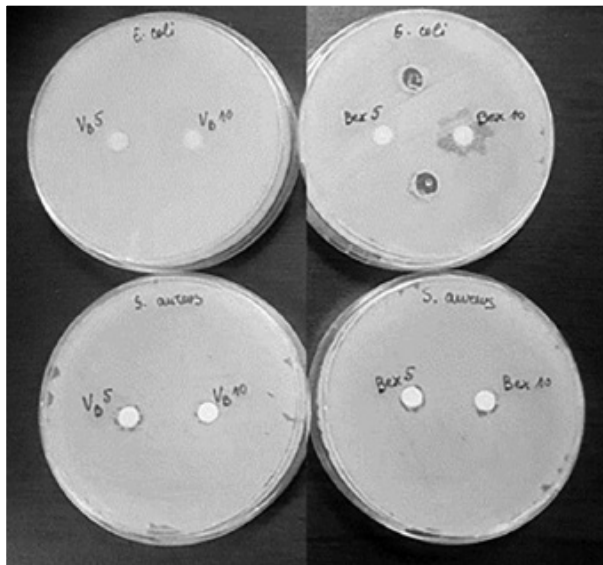
II методика:

Дисково-дифузионен метод с напоени стерилни дискове.

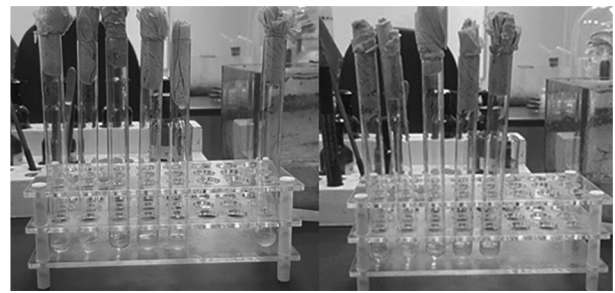
При провеждане на втория метод се установява, че няма силно изразена чувствителност на двата щам, като се отбелязва много малка зона на задържане <1 mm. Единствено при $Bex 10$ на *E. coli* – има потенциал. Наблюдава се зона на инхибиране от 5 mm. Посочените резултати са представени на фиг. 6.

III методика:

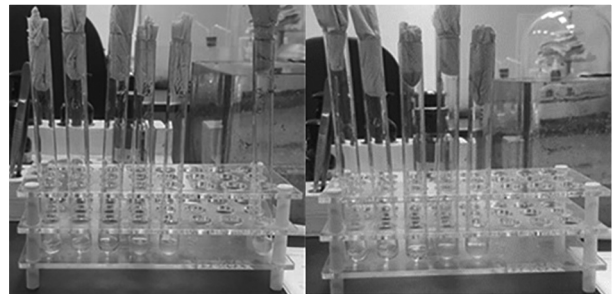
Минимална потискаща концентрация.



Фиг. 6. Дисково-дифузионен метод с напоени стерилни дискове на бексаротен (*Bex*) и 4-изопропил-фенил-метилен-4-[1-(3,5,5,8,8-пентаметил-6,7-дихидронафтален-2-ил) етенил] бензохидразид (V_B)



Фиг. 7. Титри на V_B и *Bex* в *E. coli*



Фиг. 8. Титри на V_B и *Bex* в *S. aureus*

При третата методика се цели да се установят минималните потискащи концентрации на изследваните вещества. Резултатите от направените опити са представени в табл. 2 и фиг. 7 и 8. Те отразяват диагностичните титри и показват нагледно проведения опит.

Пресети са епруветки от МПК от разреждания 1; 1/2; 1/4 (*S. aureus*) върху хранителна среда обикновен агар.

В резултат на направения опит се наблюдава МБК при титър 1/2 при V_B и *Bex* (т.е. 2,5 µg/ml). При разреждане 1/4 има наличие на бактериален растеж на агаровата среда.

Минималните бактерицидни концентрации на изследваните проби при двата щам са представени в табл. 2.

IV методика:

Минимална бактерицидна концентрация.

Пресети са епруветки от МПК от разреждания до 1/2 за V_B и до 1/4 за *Bex* (*E. coli*) върху хранителна среда Левин.

Табл. 2. Минимални бактерицидни концентрации на изследваните проби

Изследван щам/ съединение	Титър и минимална потискаща концентрация				
	1	1/2	1/4	1/8	1/16
<i>E. coli</i>	1	1/2	1/4	1/8	1/16
V_B	-	-	+	+	+
<i>Bex</i>	-	-	-	+	+
<i>S. aureus</i>	1	1/2	1/4	1/8	1/16
V_B	-	-	-	+	+
<i>Bex</i>	-	-	-	+	+

Резултатите показват, че МБК на VВ спрямо *E. coli* е $\frac{1}{2}$, на Вех - отново $\frac{1}{2}$ (т.е. 2,5 $\mu\text{g/ml}$). При разреждане $\frac{1}{4}$ при Вех има наличие на бактериален растеж в твърда хранителна среда (табл. 3).

Табл. 3. Минимална бактерицидна концентрация

Продукт	V _B	Вех
<i>E. coli</i>	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
<i>S. aureus</i>	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$

ИЗВОДИ

При оценка на антибактериалната активност е установено, че двата щама демонстрират по-висока чувствителност при методиките, включващи течни хранителни среди – определяне на МПК и МБК. При методите с дифузия в агарова среда V_B и Вех не демонстрират висок антимикробен потенциал, с изключение на Вех спрямо изолата на *Escherichia coli*.

Методиките за определяне на минимална потискаща и бактерицидна концентрация в течна хранителна среда показват, че всички изследвани разтвори имат антимикробен потенциал.

ЛИТЕРАТУРА

1. B.N. Sivasankar, S. Gavindaragam - Synthesis, Characterization and Thermal Reactivity of Mixed Metal Hydrazidocarboxylate Hydrazinates - Synth. React. Inorg. Met.: Org. Chem., 25 (1995), pp. 127-131 (6)
2. Garima Verma, Akranth Marella, Mohammad Shaquiquzzaman, Mymoona Akhtar, Mohammad Rahmat Ali, Mohammad Mumtaz Alam - A review exploring biological activities of hydrazones - J Pharm Bioallied Sci 2014 Apr;6(2):69-80.DOI: 10.4103/0975-7406.129170 (3)
3. Ishaku Leo Elisha, Francien S. Botha, Lyndy Joy McGaw, Jacobus Nicolaas Eloff - The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts - BMC Complementary and Alternative Medicine (2017) 17:133 DOI 10.1186/s12906-017-1645-z (5)
4. James B. Kaper, James P. Nataro, Harry L. T. Mobley - Pathogenic *Escherichia coli* - Nature Reviews Microbiology volume 2, pages123–140 (2004) (7)
5. Jana Pisk, Ivica Đilović, Tomica Hrenar, Danijela Cvijanović, Gordana Pavlović and Višnja Vrdoljak - Effective methods for the synthesis of hydrazones, quinazolines, and Schiff bases: reaction monitoring using a chemometric approach - RSC Adv., , 10, 38566–38577(2020) DOI: 10.1039/D0RA06845D (1)
6. Juliana de Oliveira Carneiro Brum, Tanos Celmar Costa França, Steven R. LaPlante, José Daniel Figueroa Villar - Synthesis and Biological Activity of Hydrazones and Derivatives: A Review - Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, Vol. 20 ,5 (2020) DOI : 10.2174/1389557519666191014142448 (2)
7. Merlin S Bergdoll - Staphylococcus aureus - Journal of Association of Official Analytical Chemists, Vol.74, 4, p.706–710 (1991) (9)
8. Nerino Allocati, Michele Masulli, Mikhail F. Alexeyev, Carmine Di Ilio - *Escherichia coli* in Europe: An Overview - Int. J. Environ. Res. Public Health, 10(12), 6235-6254; (2013) (8)
9. Ruud H.Deurenberg, Ellen E.Stobberingh - The evolution of *Staphylococcus aureus* - Infection, Genetics and Evolution Vol. 8, 6, Pages 747-763(2008) (10)
10. Thaís Osório, Franco Monache, Louise Chiaradia, Alessandra Mascarello et al. - Antibacterial activity of chalcones, hydrazones and oxadiazoles against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - Bioorg. Med. Chem. Lett. 22 225–230227 (2012) (4)

Адрес за кореспонденция:

Надя Агова
 Катедра „Фармацевтична химия“
 бул. „Цар Освободител“ 84
 Варна, 9000
 e-mail: Nadya.Agova@tu-varna.bg