

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

СИНТЕЗ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАМЕТОКСАЗОЛ-ПЕКТИНА

DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2019.1.67.345

Бекназарова Нурия Сейтбаевна*младший научный сотрудник лаборатории химия полисахаридов***Махмудов Сардор Джалилович***базовый докторант лаборатории химия полисахаридов***Ахмедов Олий Рашиданович***младший научный сотрудник (PhD) лаборатории химия полисахаридов***Абрекова Наджия Наримановна***младший научный сотрудник лаборатории химия полисахаридов***Сагдуллаев Баходир Тахирович***доктор технических наук,**ведущий научный сотрудник лаборатории химия полисахаридов**Институт биоорганической химии, Р.Узбекистан, г.Ташкент*

АННОТАЦИЯ

Впервые синтезированы водорастворимые производные сульфаметоксазола путем химической модификации препарата диальдегид производными пектина с различной степенью окисления. Структура и состав полученных производных исследованы методами ИК-, УФ-спектроскопии и элементным анализом по содержанию азота. Представлены результаты антимикробной активности сульфаметоксазол-пектина (с различным содержанием препарата) в отношении патогенных полученных.

ABSTRACT

For the first time, water-soluble sulfamethoxazole derivatives were synthesized by chemical modification of the preparation dialdehyde with pectin derivatives with various oxidation states. The structure and composition of the obtained derivatives were studied by IR-, UV-spectroscopy and elemental analysis of nitrogen content. The results of the antimicrobial activity of sulfamethoxazole pectin (with different drug contents) in relation to the pathogenic ones are presented.

Ключевые слова: сульфаметоксазол, пектин, химическая модификация, биодоступность, антимикробное действие

Key words: sulfamethoxazole, pectin, chemical modification, bioavailability, antimicrobial action.

Введение. Одной из важных задач современной фармакологии является повышение эффективности терапевтического действия широко применяемых лекарственных препаратов. В этом плане антимикробные средства являются одной из наиболее важных и самой обширной группой биологически активных веществ, имеющих практическое значение и требующих постоянного улучшения физиологических свойств [1]. Например, сульфаметоксазол относящийся к группе сульфаниламидов, широко используется в медицине поскольку подавляют рост грамположительных и грамотрицательных бактерий, некоторых простейших (возбудители малярии, токсоплазмоза), хламидий (при трахоме, паратрахоме) [2]. На сегодняшний день существуют ряд комбинированных препаратов, содержащие сульфаметоксазол (Бисептол, Апо-сульфатрим, Бактекод, Бакторедукт и др.). К сожалению, широко применяемые на практике комбинированные препараты на основе сульфаметоксазола, несмотря на то, что обладают эффективным антибактериальным действием, проявляют ряд недостатков (головная боль, головокружение, тошнота, рвота, снижение аппетита и т.д.). Эти недостатки обусловлены в первую очередь тем, что основное действующее вещество (сульфаметоксазол) практически нерастворимо в воде и характеризуется низкой

биодоступностью в организме. В результате для достижения необходимого терапевтического действия, требуется повышать суточную дозу препарата, что в свою очередь провоцирует проявление перечисленных выше побочных эффектов.

Перспективным подходом для устранения недостатков сульфаметоксазола, является повышение его биодоступности путем сочетания с водорастворимыми полимерами. Известно, что химическое присоединение низкомолекулярных веществ к полимерам является одним из широко применяемых методов, позволяющий изменять одновременно физико-химические и фармакологические свойства различных лекарственных препаратов [3]. Для этой цели в последние годы широко используют крахмал, хитозан, декстран, а также пектин и его производные [4-7]. В первую очередь следует отметить, что интерес к природным полимерам связан с их доступностью, биосовместимостью, не токсичностью, биоразлагаемостью и отсутствием аллергических реакций, т.е. они в наибольшей степени отвечают требованиям, предъявляемым к полимерам, применяемым в медицине и фармацевтике при создании биологически активных полимеров. Помимо перечисленного набора уникальных свойств основным преимуществом полисахаридов является

вариабельность молекулярных параметров и химической структуры в зависимости от поставленных фармакологических задач.

Исходя из вышеизложенного целью настоящей работы являлось получение водорастворимых производных сульфаметоксазола путем химической иммобилизации антимикробного средства в структуру производных пектина.

Методы и материалы. Периодатное окисление пектина проводили по следующему методу: 2 г цитрусового пектина (молекулярная масса 162 кДа, содержание метоксильных групп 7,5%) залили 100 мл дистиллированной воды и оставили растворяться, после полного растворения полисахарида, в раствор добавляли 150 мл ацетатного буфера с pH 5,0, затем 0,25-1,0 н раствора NaIO_4 при молярном соотношении пектин: NaIO_4 =1:1. Процесс окисления продолжался 3 ч при температуре 20-25°C в гомогенной среде. По окончании реакции периодатного окисления модифицированный пектин осаждали ацетоном, образовавшийся осадок промывали 70%-ным этиловым спиртом до отрицательной реакции на ионы IO_4^- и IO_3^- (контроль по реакции с раствором азотнокислого серебра) и сушили в темноте под вакуумом над P_2O_5 . Выход продуктов от массы исходного полисахарида составлял 93,2-95,4%. Определение количества альдегидных групп проводили оксимным методом [8].

Химическая модификация сульфаметоксазола с диальдегид производными пектина (ДАП). Реакцию проводили следующим образом: в двугорлую колбу емкостью 500 мл, снабженной механической мешалкой и термометром, помещали 0,01 моль модифицированного пектина с различной степенью окисления, затем добавляли 100 мл буфера (pH 8,0-8,5), после растворения производных ДАП при постоянном перемешивании добавляли 2,5 моль нуклеофильного реагента (сульфаметоксазола).

Реакция протекала при комнатной температуре и в течение 2 ч. После завершения реакции, продукты осаждали ацетоном. Образовавшиеся осадки отфильтровывали и экстрагировали на аппарате Сокслета сначала смесью ацетон/вода, затем 75%-ным этиловым спиртом и сушили под вакуумом над P_2O_5 при комнатной температуре. Степень замещения образцов вычисляли по содержанию азота.

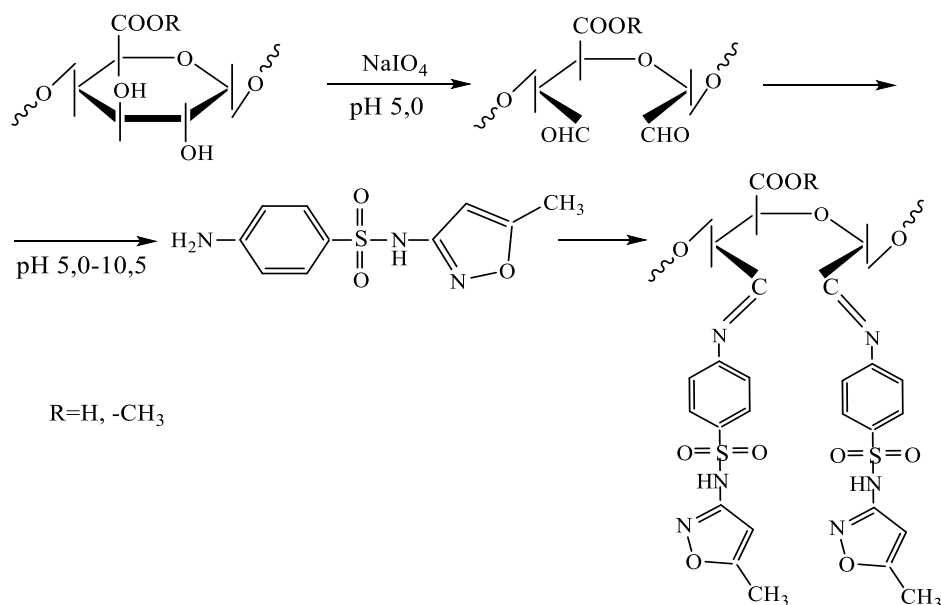
ИК-спектроскопические исследования синтезированных образцов, записаны на Фурье ИК-спектрометре Vector-22 в области длин волн 400-4000 cm^{-1} в таблетках KBr (3 мг образца/300 мг KBr). Количество азота в образцах определяли на элементном анализаторе марки Eura EA (Italy).

Спектрофотометрические исследования синтезированных препаратов проводили на спектрофотометре «UV 1280» (Shimadzu, Japan), в диапазоне длин волн 200-400 нм.

Антимикробную активность синтезированных препаратов в условиях *in vitro* изучали методом диффузии в агар. Для исследования антибактериальной активности были взяты (24 часовые) культуры штаммов следующих патогенных микроорганизмов: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*. Антибактериальную активность препаратов оценивали по зоне задержки роста бактерий: «-» - зона задержки роста отсутствует. Диаметры зон задержки роста меньше 10 мм - отсутствие антибактериальной активности; 10-15 мм - слабая активность; 15-20 мм - умеренно выраженная активность; свыше 20 мм - выраженная активность [9].

Результаты и обсуждение

Протекание реакций периодатного окисления пектина и последующее нуклеофильное замещение производных ДАП молекулами сульфаметоксазола можно представить по следующей схеме:



В таблице 1 показаны зависимость степени замещения и содержание препарата в конечных продуктах от степени окисления ДАП.

Таблица 1

**ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ОКИСЛЕНИЯ ПЕКТИНА НА СОСТАВ И РАСТВОРИМОСТЬ
КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ РЕАКЦИИ (Т=2 Ч; Т°=20-25 °С; РН 8,5-9,0; МОЛЯРНОЕ
СООТНОШЕНИЕ ДАП:СУЛЬФАМЕТОКСАЗОЛ=1:2,5)**

| № | Степень окисления пектина, моль%* | Содержание N, % | Степень замещения, моль% | Содержание препарата, % | Растворимость |
|---|-----------------------------------|-----------------|--------------------------|-------------------------|---------------|
| 1 | 13,2 | 0,85 | 6,0 | 10,2 | Растворим |
| 2 | 20,0 | 1,48 | 11,2 | 18,0 | Растворим |
| 3 | 26,5 | 1,80 | 14,1 | 21,5 | Растворим |
| 4 | 30,0 | 1,95 | 15,4 | 23,0 | Растворим |
| 5 | 38,2 | 2,50 | 20,8 | 25,4 | Растворим |

*Степень окисления-количество окисленных звеньев на каждые 100 звеньев полисахарида

Из табл.1 видно, что с увеличением количества альдегидных групп в макромолекулярной цепи окисленного полисахарида возрастает степень замещения и содержание сульфаметоксазола в конечных продуктах. Следует добавить, что после модификации сульфаметоксазола с производными пектина, лекарственное вещество переходит в водорастворимую форму вне зависимости от количественного содержания его в составе полимера.

В ИК-спектре пектина обнаружены полосы поглощения в области 3338 см^{-1} (-OH), 2942 см^{-1} ($\nu \text{ CH}$), 1749 см^{-1} (C=O), 1438 см^{-1} (-CH₃), 1069 см^{-1} (C-OH).

В отличие от ИК-спектра исходного полисахарида у сульфаметоксазол-пектина наблюдались характерные полосы поглощения в областях 1180 см^{-1} (валентное колебание S=O), 1315 см^{-1} (SO₂NH), 3190 см^{-1} (-NH-) и 1639 см^{-1} доказывающие о наличии азометиновой связи (-C=N-) (рис.1.).

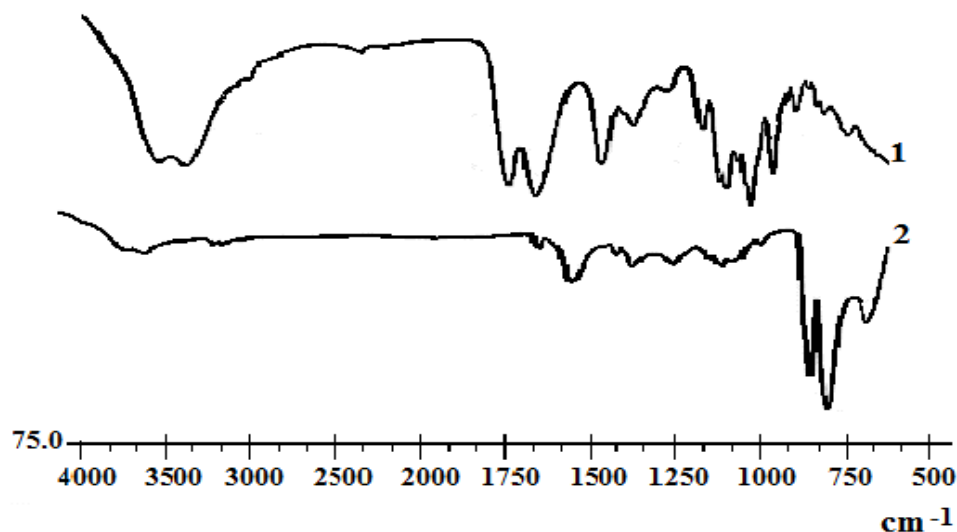


Рис.1. ИК-спектры пектина (1) и сульфаметоксазол-пектина (2)

В УФ-спектрах щелочных растворов сульфаметоксазола и его полимерной формы наблюдаются одинаковые интенсивные поглощения в области 255 нм (рис.2). Это

свидетельствует о наличии низкомолекулярного препарата в структуре пектина и дает возможность определять состав конечного продукта методом УФ-спектроскопии.

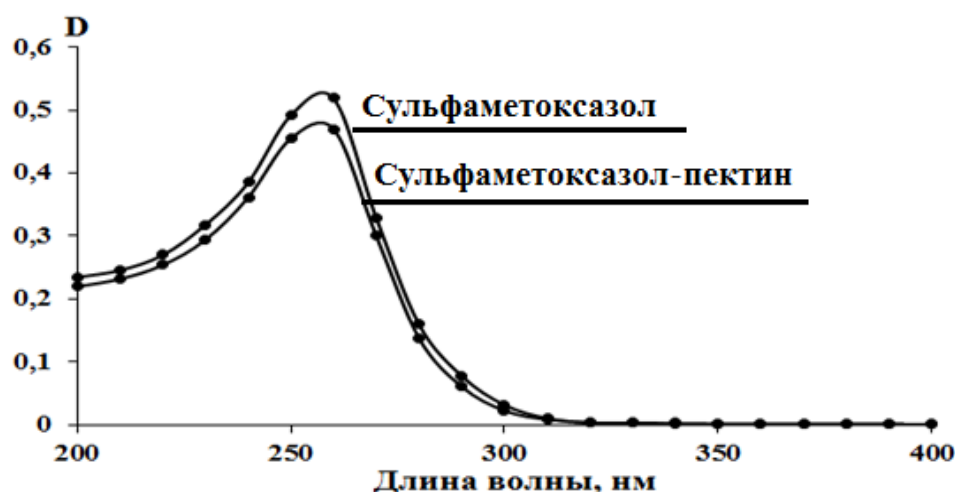


Рис.2. УФ-спектры в 0,01 н растворе NaOH; сульфаметоксазола ($c=5,0$ мкг/мл); сульфаметоксазол-пектина (10,0 мкг/мл)

Результаты, представленные в таблице 2, свидетельствуют, что уровень и спектр антимикробного действия синтезированных производных зависит от количества препарата в составе полисахарида. Так, образец содержащий наибольшая количество сульфаметоксазола (25,4%) обладает эффективным антимикробным действием в отношении *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*. Соответственно, с уменьшением количества антимикробного

препарата в составе полисахарида уровень биологической активности образцов начинает понижаться. Следует отметить, что при концентрации 25 мкг/мл образцы, в которых содержание антимикробного средства составляет 23,0 и 25,4% по активности превосходит сульфаметоксазол, что можно пояснить повышением растворимости препарата при химическом связывании его с полимерной матрицей.

Таблица 2

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ К СИНТЕЗИРОВАННЫМ ПРОИЗВОДНЫМ СУЛЬФАМЕТОКСАЗОЛ-ПЕКТИНА ПРИ КОНЦЕНТРАЦИИ 25 МКГ/МЛ

| Микроорганизмы | Образцы сульфаметоксазол-пектина | | | | | АП* |
|-------------------------------|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 12±0,6 | 20±0,4 | 20±0,5 | 25±0,4 | 28±0,7 | 21±0,5 |
| <i>Escherichia coli</i> | 18±0,5 | 20±1,0 | 25±0,8 | 25±0,6 | 31±0,6 | 26±0,8 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | 15±0,4 | 23±0,5 | 30±0,7 | 30±0,5 | 25±0,4 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 10±0,6 | 18±0,7 | 20±0,8 | 30±1,0 | 35±0,3 | 30±0,5 |
| <i>Klebsiella pneumonia</i> | 15±1,0 | 21±0,6 | 25±1,0 | 32±0,4 | 37±0,5 | 34±0,5 |

АП* - антимикробный препарат сульфаметоксазол

Выводы. Таким образом, результаты проведенных химических и микробиологических исследований доказывают возможность получения эффективных водорастворимых полимерных производных сульфаметоксазола обладающих широким спектром антимикробного действия.

Список литературы:

1. Roberts M.C. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. Periodontology 2000. - 2002. - V.28 (1). - P. 280-297.
2. Шамаева С. Х., Миронов А. Ю., Потапов А. Ф. Микрофлора ожоговых ран и ее чувствительность к антибиотикам у детей с ожоговой болезнью / Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2011, №2. С. 90-94.

3. Платэ Н.А., Васильев А.Е. Физиологически активные полимеры. -М. «Химия». 1986. С.131-142.

4. Akhmedov O. R., Shomurotov Sh. A., Rakhmanova G. G., Turaev A. S. Synthesis and study of biological activity of sulfamic polysaccharide derivatives // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2017. V.43. № 7. P. 716-721.

5. Kusriani E., Arbiyanti R., Sofyan N. Modification of chitosan by using samarium for potential use in drug delivery system // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2014. V.120. P. 77-83.

6. Sherif M.A. Keshka S., Ramadana A.M. Al-Sehemia A.G., S.Yousefd, S. Bondock. Peculiar behavior of starch 2,3-dialdehyde towards sulfanilamide and sulfathiazole // Carbohydrate Polymers. 2016. V.152. P. 624-631.

7.Lu E., Franzblau S., Onyukel H., Popescu C. Preparation of aminoglycoside-loaded chitosan nanoparticles using dextran sulphate as a counterion // J. of Microencapsulatio. -2009. -V. 26(4). -P. 346-354.

8. Гумникова В.И. Синтез диальдегиддекстрана и диальдегидкарбоксиметилцеллюлозы и их

химические превращения / Дисс. на хим. науки. Москва. 2014. -С. 137.

9.МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания.

QUANTUM CHEMICAL STUDY OF THE REDUCTIVE ACTIVATION OF QUINONES BY ENZYME NQO1

DOI: [10.31618/ESU.2413-9335.2019.1.67.346](https://doi.org/10.31618/ESU.2413-9335.2019.1.67.346)

Sokolov Alexandr Andreevich

PhD, Science researcher,

P.G. Demidov Yaroslavl State University

Begunov Roman Sergeevich

PhD, Science researcher,

P.G. Demidov Yaroslavl State University

Sakulina Valeria Olegovna

postgraduate,

P.G. Demidov Yaroslavl State University

ABSTRACT

A quantum chemical modeling of the interaction of the NQO1 enzyme with a several quinones was carried out. The calculation of the geometric and energy parameters of the studied substrates was done. The potential energy surface of reduction of heterocyclic quinones by the enzyme was drawn. Relationships between structure of substrates and their binding strength with NQO1 were pointed out.

АННОТАЦИЯ

Проведено квантово-химическое моделирование процесса взаимодействия фермента NQO1 с рядом хинонов. Осуществлен расчет геометрических и энергетических параметров изучаемых субстратов. Проведено построение поверхности потенциальной энергии процесса восстановления гетероциклических хинонов ферментом. Установлены закономерности взаимосвязи между строением субстратов и силой их связывания с молекулой NQO1.

Keywords: Quantum chemical calculations, semi-empirical methods, PM7, heterocyclic quinones.

Ключевые слова: Квантово-химические расчеты, полуэмпирические методы, PM7, гетероциклические хиноны.

Background.

Among the many potential therapeutic targets for cancer treatment, the NQO1 NAD(P)H enzyme: quinone oxidoreductase is an enzyme that is overexpressed in a number of tumors, including lung, colon, breast, liver cancer, 2-50 times more than in surrounding normal tissues [1-4]. NQO1 can specifically catalyze the two-electron reduction of various quinones directly to hydroquinones. Therefore, prodrugs containing a quinone fragment that are activated by NQO1 must exhibit specific anti-tumor activity.

The aim of this work was to study the process of enzymatic reduction of several heterocyclic quinones using semi-empirical quantum-chemical calculation methods.

Methods.

The construction of structures, the initial configuration of the simulated systems and the

subsequent quantum-chemical modeling were carried out according to the following scheme:

The construction of simulated systems and the creation of source files containing z-matrices with the coordinates of the structure for calculation were performed using the CambridgeSoft ChemOffice 2010 software package.

Quantum chemical calculations were performed using the MOPAC 2012 software package (Molecular Orbital PACKage), using the semi-empirical PM7 method. Visualization of the calculation results was performed using the JMol 12.0.3 program.

Results.

The structures of quinones - substrates for the human enzyme NQO1 are presented in Figure 1.

In the process of quinone reduction, coenzyme flavin adenine dinucleotide (FAD), which is part of NQO1, is directly involved.