



СИНТЕЗ, АНТИМИКРОБНЫЕ И ТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ 1,3-БИС(АЛКИЛ)-6-МЕТИЛУРАЦИЛА, СОДЕРЖАЩИХ 1,2,3- И 1,2,4-ТРИАЗОЛИЕВЫЕ ФРАГМЕНТЫ¹

© 2017 г. А. Д. Волошина[#], В. Э. Семенов, А. С. Стробыкина, Н. В. Кулик, Е. С. Крылова, В. В. Зобов, В. С. Резник

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского научного центра РАН
Россия, 420088, Казань, ул. Акад. Арбузова, 8

Поступила в редакцию 10.06.2016 г.

Принята к печати 19.07.2016 г.

Изучена антимикробная активность и цитотоксичность новых производных 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила, содержащих 1,2,3- и 1,2,4-триазолиевые фрагменты в алкильных цепочках. Исследованные соединения протестированы на антимикробную активность по отношению к ряду грамположительных и грамотрицательных бактерий и некоторых культур грибов. Цитотоксическое действие оценивали по отношению к клеткам млекопитающих. Установлено, что основным структурным фактором, влияющим на антимикробную активность соединений, является природа алкильных радикалов при триазольных фрагментах.

Ключевые слова: триазолы, урацилы, антимикробная активность, цитотоксичность, гемолитическая активность.

DOI: 10.7868/S0132342317020208

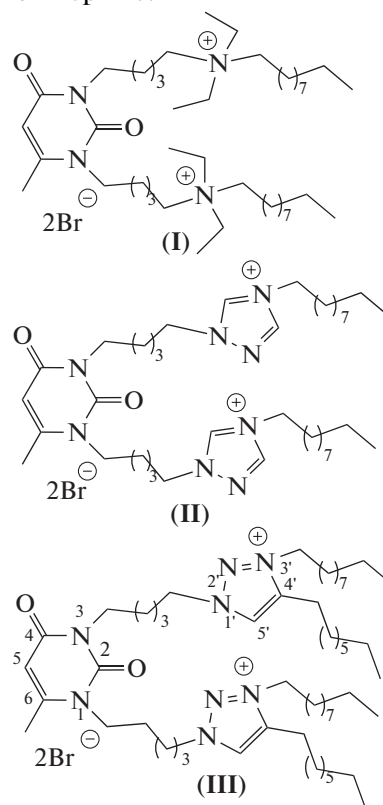
ВВЕДЕНИЕ

В связи с быстрым приобретением лекарственной резистентности патогенными микроорганизмами, поиск антимикробных малотоксичных лекарственных средств, характеризующихся принципиально новыми механизмами действия, имеет первостепенную важность.

Ранее было показано, что производные 1,3-бис(алкил)-6(5)-замещенного урацила, содержащие ониевые группировки в полиметиленовых цепочках, и, в частности, соединение (I), проявляют широкий спектр антимикробной активности, низкую гемолитическую активность и умеренную токсичность на млекопитающих [1–5].

Производные 1,2,3- и 1,2,4-триазолов применяются как биологически активные вещества различного действия. Они обладают антибактериальными, противогрибковыми, противоопухолевыми и противовоспалительными свойствами [6–8]. В настоящей работе впервые были протестированы на антимикробную активность и цитотоксичность производные 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила, содержащие в алкильных

цепочках 1,2,4-триазолиевые (II) и 1,2,3-триазолиевые (III) фрагменты. Соединение (II) было получено нами ранее [9], а соединение (III) синтезировано впервые.



¹ Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на конференции “Химическая биология-2016”; г. Новосибирск, 24–29 июля 2016 г.

Сокращения: МИК – минимальная ингибирующая концентрация; МБК – минимальная бактерицидная концентрация; МФК – минимальная фунгицидная концентрация.

[#] Автор для связи (тел.: +7 (917) 262-71-90; эл. почта: microbi@iopc.ru).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез производных 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила. Синтез соединения (I) описан нами ранее: его получали кватернизацией атомов N в алкильных цепочках 1,3-бис(5-аминопентил)-6-метилурацила (IV) бромистым *n*-децилом [1, 2] (схема 1).

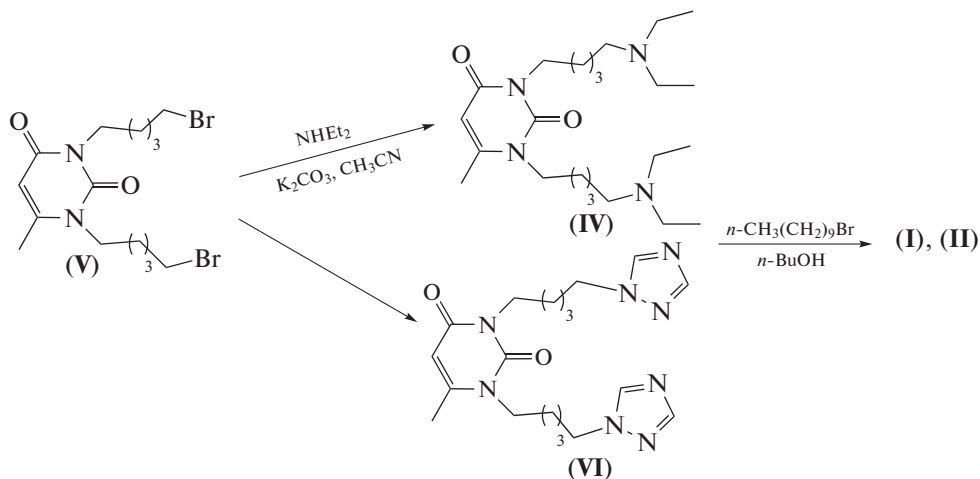


Схема 1. Синтез соединений (IV) и (I) [1, 2], (VI) и (II) [10].

Соединение (III) синтезировали, алкилируя бромистым *n*-децилом 1,3-бис[5-(4-октил-1,2,3-триазол-1-ил)пентил]-6-метилурацил (VII). Места алкилирования 1,2,3-триазоловых колец в соединении (VII), а именно атомы N3' установлены с использованием 1D- и 2D-экспериментов ЯМР (^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ HSQC,

HMBC, ROESY и NOESY). Синтез соединения (VII), в свою очередь, осуществляли, как описано в работе [10], замещением в дибромиде (V) атомов брома на азидо-группы и введением полученного таким образом 1,3-бис(5-азидопентил)-6-метилурацила (VIII) в реакцию 1,3-циклоприсоединения с 1-децином [10] (схема 2).

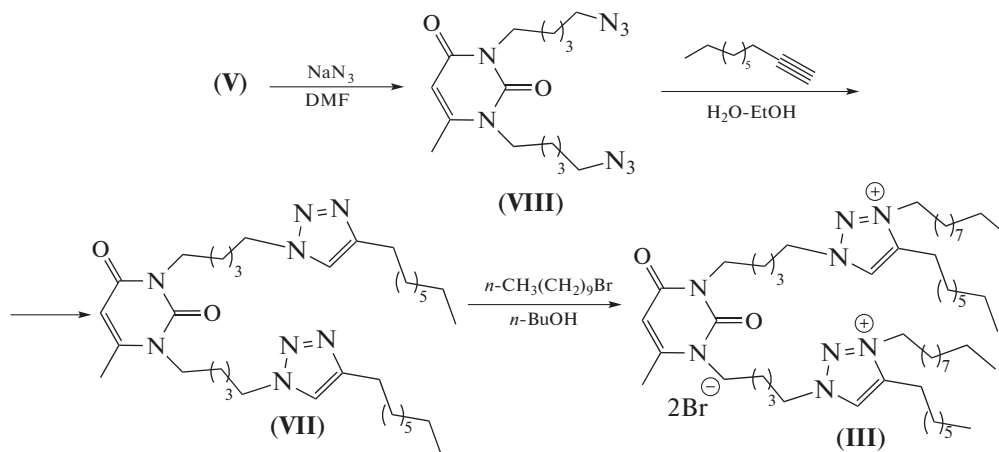


Схема 2. Синтез соединений (VIII), (VII) [10], (III).

Антимикробная активность производных 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила. Синтезированные соединения были протестированы по отношению к ряду грамположительных (*Staphylococcus aureus* 209-P,

Bacillus cereus 8035) и грамотрицательных (*Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Escherichia coli* F-50) бактерий, а также грибов (*Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum* 1773, *Aspergillus niger* ВКМФ-1119, *Can-*

didalbicans 885–653). Результаты представлены в таблицах 1 и 2 в терминах минимальных ингибирующих концентраций (МИК) — концентраций, останавливающих рост бактерий и грибов, и минимальных бактерицидных и фунгицидных концентраций (МБК и МФК соответственно) — минимальных концентраций, вызывающих гибель клеток.

Соединения (I)–(III) имеют некоторые общие структурные особенности: наличие пяти метиленовых групп в соединительных мостиках и *n*-децильный радикал в составе ониевой группы (соединение (I)) и в составе триазоловых колец (соединения (II), (III)). Вводя в молекулу производного 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила триазолиевые фрагменты, содержащие *n*-децильный радикал, основываясь на литературных данных и результатах собственных исследований [1–7], мы рассчитывали получить соединения с высокой противогрибковой и антибактериальной активностью.

Представленные в табл. 1 данные демонстрируют, что производное 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила (II), содержащее в алкильных цепочках 1,2,4-триазолиевые фрагменты, как и описанное ранее ониевое производное 6-метилурацила (I) проявляет бактериостатическую активность в отношении грамположительных бактерий (*S. aureus* 209-P и *B. cereus* 8035) на уровне антибиотика Норфлоксацина из ряда фторхинолонов, а в отношении грамотрицательных бактерий (*P. aeruginosa* 9027, *E. coli* F-50) соединение (II) показало более высокую активность по сравнению с соединением (I).

Фунгистатическая активность соединения (II) в отношении *T. mentagrophytes* var. *gypseum* 1773 и *C. albicans* 885–653 значительно превосходит фунгистатическую активность как соединения (I), так и препарата сравнения Кетоконазола. Производное 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила (III), содержащее 1,2,3-триазолиевые фрагменты, в сравнении с соединениями (I), (II) проявило более низкую активность в отношении бактерий, тем не менее сопоставимую с МИК препарата сравнения Хлорамфеникола. Однако, МИК соединения (III) в отношении *T. mentagrophytes* var. *gypseum* 1773 и *C. albicans* 885–653 в пять раз меньше соответствующих МИК ониевого производного 6-метилурацила (I), но превышают величины МИК в отношении этих грибов для соединения (II) и препарата сравнения Кетоконазола. Высокая фунгистатическая активность соединений (II), (III) связана, по видимому, со специфическим влиянием триазолиевых фрагментов, вводимых в пентаметиленовые цепочки.

Таким образом, кватернизация алифатических атомов азота и кольцевых атомов азота триазоловых циклов в алкильных цепочках при 6-метилурациловом фрагменте имеет решающее зна-

чение для проявления антимикробных свойств. Так, соединения (IV), (VI), (VII), в результате алкилирования которых бромистым *n*-децилом получены обсуждаемые соединения (I)–(III), практически неактивны, только соединение (VII) демонстрирует некоторую активность в отношении грамположительных бактерий (табл. 1). Введение *n*-децильного радикала резко усиливает их антимикробную активность. Кроме того, введение в пентаметиленовые цепочки при атомах N⁶-метилурацилового цикла 1,2,4-триазолиевых фрагментов, несущих *n*-децильный радикал (соединение (II)), приводит к значительному усилению противогрибковой активности в сравнении с ониевым производным 6-метилурацила (I), в то время как введение в алкильные цепочки 1,2,3-триазолиевых фрагментов, несущих помимо *n*-децильного радикала октильный заместитель (соединение (III)), значительно ослабляет антибактериальные свойства.

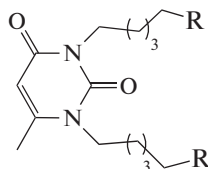
В табл. 2 представлены значения МБК и МФК исследуемых соединений. Видно, что в отличие от соединения (I), соединения (II), (III) проявляют бактерицидную активность в отношении *S. aureus* 209-P и фунгицидную в отношении *T. mentagrophytes* var. *gypseum* 1773 и *C. albicans* 885–653.

Важной характеристикой при разработке новых лекарственных средств является их цитотоксическое действие по отношению к клеткам млекопитающих. Производные 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила, содержащие 1,2,3- и 1,2,4-триазолиевые фрагменты, были протестированы на цитотоксичность на эритроцитах крови человека (гемолитическая активность) [11] и культуре клеток WI-38 (легкое эмбриона человека).

На рис. 1 представлены данные по оценке степени гемолиза эритроцитов человека, вызываемого исследуемыми соединениями, а также описанным ранее ониевым производным 6-метилурацила (I). Гемолиз эритроцитов в присутствии соединения (II) в диапазоне минимальных ингибирующих концентраций (0.8–8.0 мкг мл⁻¹) не превышает 2%, в то время как соединение (III) обладает достаточно высокой гемолитической активностью. В самой низкой концентрации (6.3 мкг мл⁻¹), вызывающей задержку роста тестерных штаммов грибов, степень гемолиза составила 56%. По сравнению с соединением (I), соединения (II), (III) оказались более токсичными в отношении эритроцитов крови человека.

На рис. 2. представлены данные по оценке цитотоксического действия производных 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила (II), (III) на культуру клеток WI-38. Оценку цитотоксичности производили путем подсчета жизнеспособных клеток, при культивировании их с исследованными соединениями в концентрациях, соответствующих МИК, определенным по отношению к тест-штаммам бак-

Таблица 1. Бактериостатическая и фунгистатическая активности производных 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила, содержащих в алкильных цепочках ониевые группировки, 1,2,4- и 1,2,3-триазоловые и триазолиевые фрагменты, выраженные через минимальные ингибирующие концентрации (МИК)



Соединение, R	МИК/мкг мл ⁻¹ (мкМ)						
	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>An</i>	<i>Tm</i>	<i>Ca</i>
(I),	1.6 ± 0.1 (1.9 ± 0.1)	2.5 ± 0.2 (2.9 ± 0.2)	12.5 ± 1.2 (14.7 ± 1.4)	—	62.5 ± 5.3 (73.7 ± 6.2)	31.3 ± 2.9 (36.9 ± 3.4)	31.3 ± 2.7 (36.3 ± 3.1)
(II),	2.0 ± 0.2 (2.4 ± 0.2)	4.0 ± 0.4 (4.8 ± 0.7)	8.0 ± 0.7 (9.5 ± 0.8)	125 ± 11 (148 ± 13)	125 ± 12 (148 ± 14)	3.1 ± 0.3 (3.6 ± 0.3)	0.80 ± 0.07 (0.90 ± 0.08)
(III),	15.6 ± 1.5 (14.7 ± 1.4)	62.5 ± 5.5 (58.7 ± 5.2)	62.5 ± 5.8 (58.7 ± 5.4)	500 ± 45 (470 ± 42)	250 ± 22 (235 ± 21)	6.3 ± 0.6 (5.9 ± 0.5)	6.3 ± 0.5 (5.9 ± 0.5)
(IV), NEt ₂	—	—	—	—	—	—	—
(VI),	—	—	—	—	—	—	—
(VII),	31.3 ± 2.8 (50.1 ± 4.5)	62.5 ± 5.9 (100 ± 9.5)	—	—	—	—	—
Норфлоксацин	2.4 ± 0.2 (7.5 ± 0.6)	8.0 ± 0.7 (25.0 ± 2.2)	1.5 ± 0.1 (4.7 ± 0.3)	3.0 ± 0.3 (9.4 ± 0.9)	—	—	—
Хлорамфеникол	(62.5 ± 5.8) (193 ± 18)	62.5 ± 5.6 (193 ± 18)	125 ± 12 (386 ± 37)	—	—	—	—
Кетоконазол	—	—	—	—	4.0 ± 0.4 (7.6 ± 0.7)	4.0 ± 0.3 (7.6 ± 0.5)	4.0 ± 0.3 (7.6 ± 0.5)

Примечание. *Sa* – *Staphylococcus aureus*, *Bc* – *Bacillus cereus*, *Ec* – *Escherichia coli*, *Pa* – *Pseudomonas aeruginosa*, *An* – *Aspergillus niger*, *Tm* – *Trichophyton mentagrophytes*, *Ca* – *Candida albicans*; – МИК > 500 мкг мл⁻¹.

терий и грибов (табл. 1). Для соединения (II) эти концентрации составили 0.8; 2; 4; и 8 мкг мл⁻¹, а для соединения (III) – 6.3 и 15.6 мкг мл⁻¹.

Анализ полученных результатов показал, что наименьшую токсичность в отношении клеток эмбриона легкого человека показало соединение (II). Жизнеспособность клеток, рассчитанная в процентах от контроля, составила 77% при МИК – 0.8 мкг мл⁻¹ для гриба *C. albicans* и 46% при МИК – 2.0 мкг мл⁻¹ для бактерий *S. aureus*. Со-

единение (III) оказалось более токсичным в отношении клеточной культуры WI-38. В действующих концентрациях 15.6 и 6.3 мкг мл⁻¹ выживаемость клеток составила 5 и 15% соответственно.

Ранее нами было показано, что ониевые производные 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила угнетают активность дегидрогеназ глюкозы *S. aureus* 209-Р и *C. albicans* [1, 4]. Мы провели оценку воздействия производных 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила, содержащие в алкильных цепочках 1,2,4-

Таблица 2. Бактерицидная и фунгицидная активности производных соединений (I)–(III), выраженные через минимальные бактерицидные и фунгицидные концентрации (МБК и МФК)

Соединение	МБК (МФК) мкг мл ⁻¹ (мкМ)*						
	<i>Sa</i>	<i>Bc</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>An</i>	<i>Tm</i>	<i>Ca</i>
(I)	500 ± 44 (590 ± 52)	–	–	–	–	–	–
(II)	50.0 ± 4.4 (59.0 ± 5.2)	–	–	–	–	31.3 ± 2.8 (37.2 ± 3.3)	50.0 ± 4.5 (59.5 ± 5.4)
(III)	50.0 ± 4.8 (47.0 ± 4.5)	–	–	–	–	125 ± 11 (117 ± 10)	50.0 ± 4.3 (47.0 ± 4.0)

Примечание – см. табл. 1. * Для *Bc*, *Ec*, *Pa*, *An* значения МБК (МФК) > 500 мкг мл⁻¹.

и 1,2,3-триазолиевые фрагменты, на активность этих ферментов. Полученные результаты показали что, как и соединение (I), исследованные соединения оказывают значительное воздействие на активность дегидрогеназ *S. aureus* 209-Р и *C. albicans*. Соединение (II) угнетает этот фермент в большей степени в сравнении с соединениями (I), (III). Так, в концентрации 5 мкг мл⁻¹ процент угнетения соединением (II) дегидрогеназы *S. aureus* составил 58%, а дегидрогеназы *C. albicans* – 65%, тогда как соединением (I) – 61 и 48% соответственно, и соединением (III) – 55 и 38% соответственно.

На основе полученных данных можно предположить, что механизм действия исследованных соединений связан с ингибированием ферментных систем дыхательной цепи микроорганизмов на ранних стадиях взаимодействия с клеточными мишенями, что приводит к нарушению нормального течения синтеза жизненно необходимых соединений в клетке микроорганизма.

Таким образом, синтезированные нами производные 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила, содержащих 1,2,3- и 1,2,4-триазолиевые фрагменты, обладают значительной бактериостатической активностью. В частности, по отношению к бактериям *S. aureus* наименьшее значение минимальной бактериостатической концентрации соединения (II) составляет 2.0 мкг мл⁻¹, а по отношению к грибам *C. albicans* наименьшее значение минимальной фунгистатической концентрации составляет 0.8 мкг мл⁻¹. Выявлен специфический вклад в антимикробное действие 1,2,3- и 1,2,4-триазолиевых фрагментов: введение в пентаметиленовые цепочки при атомах N⁶-метилурацилового цикла 1,2,4-триазолиевых фрагментов, несущих *n*-децильный радикал (соединение (II)), приводит к значительному усилению противогрибковой активности в сравнении с ониевым производным 6-метилурацила (I), в то время как введение в алкильные цепочки 1,2,3-триазолиевых фрагментов, несущих помимо *n*-децильного радикала октильный заместитель (соединение (III)), приводит к

значительному ослаблению антибактериальных свойств и повышению цитотоксичности. В диапазоне концентраций, останавливающих рост бактерий и грибов, соединение (II) не проявляет высоких цитотоксических свойств по отношению к эритроцитам крови человека и культуре клеток WI-38.

Механизм антимикробного действия производных 1,3-бис(алкил)-6-метилурацила, содержащих 1,2,3- и 1,2,4-триазолиевые фрагменты, по-видимому, связан с ингибированием ферментных систем дыхательной цепи и энергообмена микроорганизмов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1D- и 2D-эксперименты ЯМР (¹H, ¹³C) соединения (III) проводили на Фурье-спектрометре AVANCE-500 (Bruker) с рабочей частотой 500.13 МГц (¹H) и 125.77 МГц (¹³C) в CDCl₃ при температуре 30°C, внутренний стандарт тетраметилсилан. ИК-спектр соединения (III) записан в тонком слое на Фурье-спектрометре Vector 22 (Bruker) при стандартных условиях в диапазоне 4000–400 см⁻¹ при разрешении 4 см⁻¹. Масс-спектр матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF) получен на масс-спектрометре UltraFlex III фирмы Bruker. Элементный анализ проводили на С,Н,N-анализаторе EuroVector.

1,3-Бис[5-(3-*n*-децил-4-октил-1,2,3-триазолий-1-ил)пентил]-6-метилурацилди-бромид (III). К суспензии 0.50 г (0.8 ммоль) 1,3-бис[5-(4-октил-1,2,3-триазол-1-ил)пентил]-6-метилурацила (VII), полученного по описанной методике [10], в *n*-BuOH добавляли 0.8 г (4 ммоль) бромистого *n*-децила. Реакционную массу перемешивали при 100–110°C в течение 20 ч. Ход реакции контролировали методом ТСХ. По охлаждению реакционной смеси растворитель упаривали в вакууме, в остаток добавляли диэтиловый эфир и декантировали его. Процедуру повторяли три раза. Остаток сушили в вакууме водоструйного насоса. Выход соединения

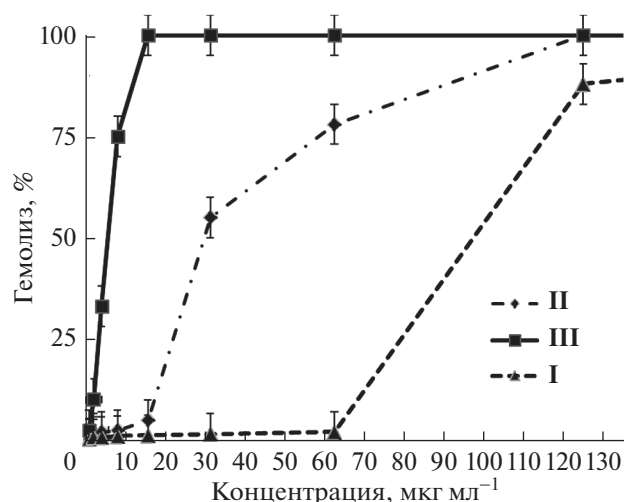


Рис. 1. Гемолитическая активность производных соединений (I)–(III).

(III) 0.73 г (86%), масло. ИК-спектр, ν_{\max} , cm^{-1} : 2926, 2856, 1698, 1658, 1620, 1577, 1465, 1432, 1403, 1362, 1209, 1118, 1058, 815, 770, 724, 627, 547. ^1H -ЯМР: 9.77 (уш.с, 2H, 2H⁵), 5.53 (с, 1H, H5), 4.91–4.84 (м, 4H, 2 N³CH₂), 4.51–4.43 (м, 4H, 2N¹CH₂), 3.98–3.87 (м, 4H, N¹CH₂, N³CH₂), 2.89–2.80 (м, 4H, 2C⁴CH₂), 2.30 (с, 3H, C⁶CH₃), 2.04–1.95 (м, 8H, 4CH₂), 1.83–1.72 (м, 8H, 4CH₂), 1.46–1.28 (м, 52H, 26CH₂), 0.94–0.85 (м, 12H, 4CH₃). ^{13}C -ЯМР {¹H}, δ , м.д.: 162.0, 152.5, 143.8, 130.0, 129.8, 101.7, 52.1, 51.7, 42.2, 37.5, 31.5, 29.0, 28.8, 27.5, 26.4, 25.9, 23.7, 22.3, 21.8, 20.6, 13.8, 13.5. Масс-спектр MALDI-TOF, m/z : 907.0 [M-2Br]⁺, 765.4 [M-2Br-C₁₀H₂₁]⁺; вычислено для C₅₅H₁₀₂N₈O₂Br₂ 906.8, 765.6. Найдено, %: C, 61.82; H, 9.59; N, 10.63; Br, 15.12. C₅₅H₁₀₂N₈O₂Br₂. Вычислено, %: C, 61.90; H, 9.63; N, 10.50; Br, 14.97.

Бактериостатическую активность исследуемых соединений определяли методом двукратных серийных разведений [12] в жидкой питательной среде по отношению к штаммам *Pseudomonas aeruginosa* 9027, *Escherichia coli* F-50, *Staphylococcus aureus* 209-P, *Bacillus cereus* 8035. Бактериальная нагрузка составляла 3.0×10^5 микробных тел мл^{-1} . Учет результатов проводили через каждые 24 ч в течение 5 суток. Посевы инкубировали при температуре 37°C. Эксперимент повторяли 2 раза. Фунгистатическую активность водных растворов соединений по отношению к грибам *Trichophyton mentagrophytes* var. *gypseum* 1773, *Aspergillus niger* ВКМФ-1119 и *Candida albicans* 885-653 определяли методом серийных разведений [13] на жидкой среде Сабуро. Время экспозиции в термостате при 25°C с соответствующим соединением составляло 14 сут. Разведения соединений готовили непосредственно в питательных средах с добавлением для лучшей растворимости 5% DMSO, не

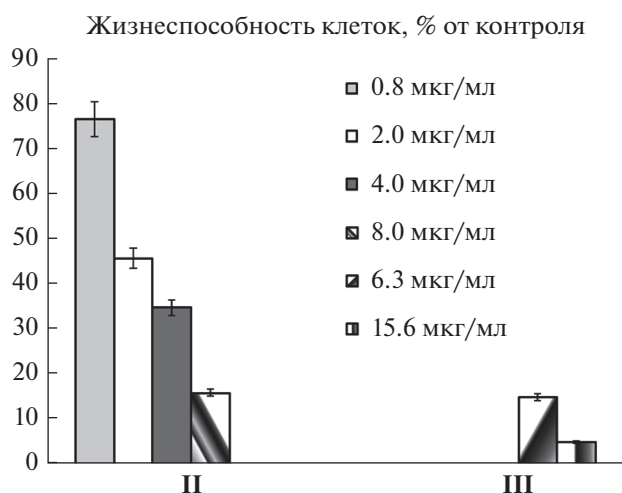


Рис. 2. Оценка цитотоксического действия соединений (II), (III) в отношении культуры клеток WI-38.

вызывающего в данной концентрации угнетение тестерных штаммов. За минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) принимали минимальную концентрацию вещества, задерживающую рост соответствующего тест-микроорганизма. Регистрировали наличие роста бактерий или грибов либо отсутствие его за счет бактериостатического или фунгистатического действия соединения. Бактерицидную и фунгицидную активности определяли описанным ранее методом [5].

Гемолитическое действие соединений оценивали методом, основанным на сравнении оптической плотности раствора исследуемого вещества с кровью с оптической плотностью крови при 100%-ном гемолизе. В качестве объекта исследований использовали 10%-ную взвесь эритроцитов человека: эритроцитарную массу с гепарином три раза отмывали физиологическим раствором (0.9%-ный NaCl) при центрифугировании в течение 10 мин при 800 об. мин^{-1} и ресуспендировали в физиологическом растворе до концентрации 10%. Концентрации исследуемых соединений, соответствующих МИК, определенным по отношению к тест-штаммам бактерий и грибов, готовили в физиологическом растворе (с добавлением 5% DMSO) и 4.5 мл соответствующего разведения исследуемого соединения добавляли к 0.5 мл 10%-ной взвеси эритроцитов. Пробы инкубировали 1 ч при 37°C, а затем центрифугировали 10 мин при 2000 об. мин^{-1} . Высвобождение гемоглобина контролировали путем измерения оптической плотности надосадочной жидкости на цифровом фотоэлектродетекторе AP-101 (Arel, Япония) при λ 540 нм. Параллельно готовили контрольные пробы: гемолиз (пустой) – 0.5 мл 10%-ной взвеси эритроцитов суспендировали в 4.5 мл физиологического раствора; 100%-ный

Таблица 3. Угнетение активности дегидрогеназы глюкозы (ДГ) *S. aureus* 209-Р и *C. albicans* 885-653 *in vitro* соединениями (I)–(III).

Соединение	Концентрация мкг мл ⁻¹	Угнетение активности ДГ, %	
		<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
(I)	500 ± 46	100 ± 9	100 ± 8
	50.0 ± 4.4	68 ± 6	100 ± 9
	5.0 ± 0.5	61 ± 5	48 ± 4
	0.50 ± 0.04	56 ± 5	0
(II)	500 ± 45	100 ± 9	100 ± 9
	50 ± 4.5	72 ± 6	78 ± 7
	5.0 ± 0.4	58 ± 6	65 ± 6
	0.50 ± 0.05	0	0
(III)	500 ± 49	100 ± 8	77 ± 7
	50.0 ± 4.7	68 ± 6	45 ± 4
	5.0 ± 0.4	55 ± 5	38 ± 3
	0.50 ± 0.05	0	0

гемолиз – 0.5 мл 10%-ной взвеси эритроцитов суспендировали в 4.5 мл дистиллированной воды.

Оценку цитотоксичности соединений в МИК, вызывающих задержку роста тестерных штаммов бактерий и грибов, производили путем подсчета жизнеспособных клеток культуры WI-38, по сравнению с контролем при помощи многофункциональной системы Cytell Cell Imaging (GE Healthcare Life Science, Швеция), используя приложение Quick Count BioApp, которое позволяет точно подсчитать количество клеток и оценить их жизнеспособность на основании интенсивности флуоресценции с использованием одноразового гемоцитомера. Для экспериментов использовали культуру клеток WI-38 VA 13 subline 2RA (легкое эмбриона человека) из Коллекции Института цитологии РАН. Для культивирования клеток использовали стандартную питательную среду “Игла” производства Московского института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова фирмы “ПанЭко” с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% заменимых аминокислот (NEAA). Клетки WI-38 рассеивали на 24-луночную панель фирмы “Eppendorf” в концентрации 200 тыс. кл/мл в каждую лунку в объеме 500 мкл среды и культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C. Через 24 ч после посадки клеток в лунки, вносили по 500 мкл изучаемого препарата в заданных разведениях. Разведения соединений готовили непосредственно в питательной среде с добавлением для лучшей растворимости 5% DMSO, не вызывающего в данной концентрации угнетения культуры клеток WI-38. Эксперименты выполняли с тремя повторами. Контролем служили

интактные клетки, культивируемые параллельно с опытными.

Дегидрогеназную активность *S. aureus* 209-Р и *C. albicans* 885-653 определяли в анаэробных условиях по времени обесцвечивания метиленовой сини методом Тунберга [14, 15].

Анализ цитометрических результатов проводили с помощью многофункциональной системы Cytell Cell Imaging, используя приложение Quick Count BioApp. Построение графиков выполняли в программе SigmaPlot, MS Excel. Табличные и графические данные содержат средние значения и стандартную ошибку.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Семенов В.Э., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Стробыкина А.С., Гиниятуллин Р.Х., Сайфина Л.Ф., Николаев А.Е., Крылова Е.С., Зобов В.В., Резник В.С. // Изв. АН. Сер. Хим. 2015. № 12. С. 2885–2896.
2. Semenov V.E., Voloshina A.D., Toroptzova E.M., Kulik N.V., Zobov V.V., Giniyatullin R.Kh., Mikhailov A.S., Nikolaev A.E., Akamsin V.D., Reznik V.S. // Eur. J. Med. Chem. 2006. V. 41. P. 1093–1101.
3. Семенов В.Э., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Уралева С.Ю., Гиниятуллин Р.Х., Михайлов А.С., Акамсин В.Д., Ефремов Ю.Я., Резник В.С. // Хим.-фарм. ж. 2009. Т. 43. С. 21–26.

4. Николаев А.Е., Семенов В.Э., Волошина А.Д., Кулик Н.В., Резник В.С. // Хим.-фарм. ж. 2010. Т. 44. С. 21–24.
5. Semenov V.E., Mikhailov A.S., Voloshina A.D., Kulik N.V., Nikitashina A.D., Zobov V.V., Kharlamov S.V., Latypov S.K., Reznik V.S. // Eur. J. Med. Chem. 2011. V. 46. P. 4715–4724.
6. Газиева Г.А., Кравченко А.Н. // Успехи химии. 2012. Т. 81. № 6. С. 494–523.
7. Heeres J., Hendrickx R., Van Cutsem J. // J. Med. Chem. 1983. V. 26. № 4. P. 611–613.
8. Brodie A. // Trends Endocrin. Met. 2002. V. 13. № 2. P. 61–65.
9. Gabdrakhmanov D.R., Samarkina D.A., Semenov V.E., Krylova E.S., Reznik V.S., Zakharova L.Ya. // J. Mol. Liquids. 2016. V. 218. P. 255–259.
10. Семенов В.Э., Николаев А.Е., Крылова Е.С., Шарфутдинова Д.Р., Резник В.С. // Ж. Орг. Х. 2012. Т. 48. С. 582–587.
11. Ilker F.M., Nusslein K., Tew G.N., Coughlin E.B. // J. Am. Chem. Soc. 2004. V. 126. 15870–15875.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 6th ed., Approved Standard, M7-A5* // NCCLS, Wayne, USA, 2000.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium forming Filamentous Fungi, Proposed Standard, M38-P* // NCCLS, Wayne, USA, 1998.
14. Kumar R., Banerjee A.K. // Cell. Mol. Life Sci. 1979. V. 35. P. 160.
15. Rajvaidya N., Markandey D. K. // Microbiology / S.B. Nangia APH Publ. Corp., New Delhi, 2006.

Synthesis, Antimicrobial and Toxic Properties of Novel 1,3-Bis(Alkyl)-6-Methyluracil Derivatives with 1,2,3- and 1,2,4-Triazolium Moieties

A. D. Voloshina[#], V. E. Semenov, A. S. Strobykina, N. V. Kulik, E. S. Krylova,
V. V. Zobov, and V. S. Reznik

[#]Phone: +7 (917) 262-71-90, e-mail: microbi@iopc.ru

*Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry Kazan Scientific Centre Russian Academy of Sciences,
ul. akad. Arbuzova 8, Kazan, Tatarstan, 420088 Russia*

Antimicrobial activity and cytotoxicity of novel derivatives of 1,3-bis(alkyl)-6-methyluracil with 1,2,3- and 1,2,4-triazolium moieties in alkyl chains were studied. These compounds were tested for antimicrobial activity against several gram-positive and gram-negative bacteria and some fungi cultures. The cytotoxic activity was assessed towards mammalian cells. It is found that the antimicrobial activity of the compounds is determined by the alkyl substituents at the triazole rings.

Keywords: triazoles, uracils, antimicrobial activity, cytotoxicity, hemolytic activity