



Рис. 2. Результати досліджень у вигляді залежності $\lg \left[\frac{1}{1-\beta} - \frac{C_{1k} - C_{1П}}{\beta(C_o - C_{1k})} \right] = f(t)$

Як видно з рис. 2, така лінійна залежність дійсно існує, що дає можливість визначити коефіцієнт дифузії.

УДК 54.655.6

**А. Ель Ідріссі, В.Г. Червцова, В.П. Новіков,
О.З. Комаровська-Порохнявець, Т.П. Назарук**
Національний університет „Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, формації та біотехнології

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ 2-В-АЛАНІН-3-ХЛОРО-1,4-НАФТОХІНОНУ

© Ель Ідріссі А., Червецова В.Г., Новіков В.П.,
Комаровська-Порохнявець О.З., Назарук Т. П., 2002

Проведено синтез β-аланін похідного 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінону та його натрієву сіль. Синтезовану речовину перевіряли на антимікробну активність з культурами тестових мікроорганізмів.

Synthesed β- alanine derivative of naphthoquinone and its sodium's salt. We investigated antimicrobial activity in experiment on strains of test bacterium.

Одним із шляхів подолання лікарської стійкості патогенних бактерій, зокрема стафілококів, є застосування нових хіміотерапевтичних агентів [1]. Відомо, що хінонове кільце входить до складу багатьох антибіотиків (брунеоміцин, адриаміцин та ін.). Також відомо, що більшість амінокислотних похідних 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінону проявляють широкий спектр біологічної дії. Важливим класом носіїв, що забезпечують селективність дії різних лікарських препаратів є амінокислоти, які використовуються мікроорганізмами в процесах біосинтезу [2].

В роботі як носій хінонового кільця використовувалась амінокислота β-аланін, яка завдяки своїй жиророзчинності здатна вбудовуватись у цитоплазматичну мембрану бактерій і у зв'язку з тим, можливо, проявляти цитостатичний ефект. Нами був синтезований 2-β-аланін-3-хлоро-1,4-нафтохінон і для покращання водорозчинності переведений в натрієву сіль.

Метою даної роботи була первинна оцінка антимікробної дії синтезованого амінокислотного похідного нафтохінону на різних видах мікроорганізмів.

Матеріали і методи

До суміші 2,27 г (0,01 моля) 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінону в 100 мл етилового спирту при 70⁰С додавали розчин еквімолярної кількості амінокислоти β-аланіну в спиртовому лузі (1,68 г КОН, 5 мл Н₂О, 25 мл С₂Н₅ОН). Реакційну суміш витримували на киплячій водяній бані 1,5 – 3 год, фільтрували і до фільтрату додавали 100 мл дистильованої води. Реакційна маса знову фільтрувалась, і фільтрат охолоджувався до 0⁰С. Після охолодження розчин обережно підкислювали концентрованою соляною кислотою до рН 5. Осад, що утворився, відфільтровували, промивали водою, розчиняли в етиловому спирті і додавали розчин гідроксиду натрію в етанолі до рН 9. Осад, що утворився, відфільтровували.

Визначення чутливості бактерій до досліджуваної речовини *in vitro* проводили методом серійних розведень та методом дифузії в агар [4]. Як середовище використовували м'ясопептонний бульйон (МПБ) або м'ясо-пептонний агар (МПА, 2 % агара). Для виготовлення інокулюму біомасу тестових мікроорганізмів суспендували у 5 мл стерильної водопровідної води до концентрації клітин 10⁹ клітин/мл.

У досліді з дисками бактеріальну суспензію в кількості 0,1 мл рівномірно розподіляли по поверхні МПА в чашках Петрі шпателем. Чашки підсушували при кімнатній температурі протягом 20 – 30 хв, після чого накладали диски з нанесеною на них досліджуваною речовиною (20 мкл робочого розчину на диск). Чашки витримували при температурі 10 – 15⁰С для дифузії речовини в середовище, а потім поміщали в термостат при 37⁰С. Як контроль використовували стандартний диск з оксациліном (10 мкг антибіотика на диск). Через 18 – 20 год проводили вимірювання зон пригнічення росту навколо дисків.

Для одержання кількісних даних про вплив 2- β -аланін-3-хлоро-1,4-нафтохінону на тестові культури застосовували метод серійних розведень на рідкому живильному середовищі (МПБ). Мікробне навантаження становило $5 \cdot 10^6$ клітин в 1 мл середовища. Робочий розчин, як і в досліді з дисками, мав концентрацію 2 мг/мл (2000 ОД). Тривалість інкубації бактерій – 24 год при 37⁰С. Як тестові культури в усіх дослідях використовували грам позитивні бактерії *Staphylococcus aureus* Б-17-St і *Escherichia coli*, отримані з колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології Львівського національного університету імені Івана Франка.

Бактеріостатичну концентрацію 2- β -аланін-3-хлоро-1,4-нафтохінону визначали як середнє арифметичне з показників концентрацій речовини в двох суміжних пробірках: з прозорим середовищем і з мутним.

Для визначення бактерицидної концентрації з пробірок, де був відсутній видимий ріст, здійснювали пересіви на МПА.

Результати та їх обговорення

Враховуючи, що дискодифузійний метод вивчення антибіотикочутливості є найпростішим методом і широко використовується для первинного скрінінгу тест-чутливих мікроорганізмів до антибіотиків, ми вирішили перш за все перевірити, чи викликає 2- β -аланін-3-хлоро-1,4-нафтохінон затримку росту у тестових культур. Результати вимірювання зон пригнічення росту культур *St.aureus* і *E.coli* подані в табл. 1.

Таблиця 1

Значення діаметрів зон затримки росту мікроорганізмів на МПА

Культура	Діаметр зон, мм	
	Оксацилін	2- β -аланін-3-хлоро-1,4-нафтохінон
<i>St.aureus</i>	24	33
<i>E.coli</i>	0	0

Згідно із стандартними граничними значеннями діаметрів зон затримки росту бактерії [5] *St.aureus* можна вважати високочутливими до досліджуваних концентрацій 2- β -аланін-3-хлоро-1,4-нафтохінону навіть порівняно з антибіотиком оксациліном, який проявляє вибірково дію на грам-позитивні бактерії. Відсутність зон затримки росту бактерій *E.coli* свідчить про те, що досліджувана речовина у даних концентраціях не проявляє антимікробної дії відносно грам-негативних бактерій.

Застосування методу серійних розведень для вивчення антибактеріальних властивостей 2- β -аланін-3-хлоро-1,4-нафтохінону підтвердило попередні результати щодо вибіркової дії досліджуваної речовини на грам-позитивні бактерії, а також дало змогу отримати кількісні дані чутливості тестових мікроорганізмів.

Таблиця 2

Залежність росту мікроорганізмів від концентрації 2- β -аланін-3-хлоро-1,4-нафтохінону

	Проба											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Концентрація речовини,												

мкг/мл	10 ³	500	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	0,85	0
Результати:												
St.aureus	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
E.coli	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Примітка: „-“ – росту немає; „+“ – ріст є

З результатів, поданих у табл. 2 видно, що мінімальна бактеріостатична (МБСК) та мінімальна бактерицидна (МБЦК) концентрації 2-β-аланін-3-хлоро-1,4-нафтохінону для St.aureus становлять, відповідно, 23,4 мкг/мл та 31,2 мкг/мл, в той час як бактерії E.coli чутливі до значно вищих концентрацій цієї речовини (375 мкг/мл та 500 мкг/мл, відповідно).

За результатами досліджень, проведених раніше [6], еталонна речовина 2,3-дихлоро-1,4-нафтохінон інгібує ріст і розвиток бактерій St.aureus в концентрації 25 мкг/мл, а бактерій E.coli – в концентрації 400 мкг/мл. З цих даних можна зробити висновок, що досліджувана нами речовина 2-β-аланін-3-хлоро-1,4-нафтохінон має аналогічну або навіть вищу антимікробну активність порівняно з еталоном.

Отже, проведені мікробіологічні дослідження свідчать, що 2-β-аланін-3-хлоро-1,4-нафтохінон має явно виражену бактеріостатичну та бактерицидну дію на грампозитивні бактерії і проявляє значно меншу антимікробну активність відносно грамнегативних бактерій. Можна припустити, що чутливість бактерій до синтезованого нами 2-β-аланін-3-хлоро-1,4-нафтохінону визначається особливістю будови поверхневих структур бактеріальних клітин.

1. Томников А.Ю., Шуб Г.М. *Химиотерапевтическая эффективность нового производного 5-алкил-3Н-фуранонон при экспериментальной стафилококковой инфекции// Антибиотики и химиотерапия.* – 1990. – Т. 35. – Вып.2. – С. 22 – 23. 2. *Химиотерапия злокачественных опухолей / Под ред. академика АН СССР Н.Н. Блохина.* – М.: Медицина. 1977. 3. Лабинская А.С. *Микробиология с техникой микробиологических исследований.* – М.: Медицина, 1972. – 480 с. 4. Посохова К.А., Климнюк С. І. *Мікробіологічні та фармакологічні основи раціонального застосування антибіотиків.* – Тернопіль: Укрмедкнига, 1998. – 132 с. 5. Новіков В.П. *Синтез, будова і властивості 4-(дифеніл-метилен)-1(4Н)-нафталінону і його галагенопохідних: Канд. дис.* – Львів, 1984.

УДК 547.655.6

**А. Ель Ідріссі, І.О. Бринь, Н.Г. Марінцова,
Л.Р. Журахівська, О.В. Федорова, В.П. Новіков**
Національний університет «Львівська політехніка»,
кафедра технології біологічно активних сполук, формації та біотехнології