



## АНТИРАДИКАЛЬНАЯ И АНТИМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ТИОСЕМИКАРБАЗИДНЫХ И 1,2,4-ТРИАЗОЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГИДРОКСИБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ

© 2020 г. Ж. Б. Сатпаева\*, \*\*, #, З. Т. Шульгау\*\*\*, С. Б. Ахметова\*\*\*\*,  
О. А. Нуркенов\*\*, С. Д. Фазылов\*, \*\*, М. Ж. Буркеев\*

\**Карагандинский государственный университет им. Е.А. Букетова,  
Казахстан, 100028, Караганда, ул. Университетская, 28*

\*\**Институт органического синтеза и углекислотной РК, Казахстан, 100008, Караганда, ул. Алиханова, 1*

\*\*\**РГП на ПХВ “Национальный центр биотехнологии” КН МОН РК,  
Казахстан, 010000, Нур-Султан, Коргалжынское шоссе, 13/5*

\*\*\*\**Карагандинская государственная медакадемия, Казахстан, 100000, Караганда, ул. Гоголя, 40*

Поступила в редакцию 10.02.2020 г.

После доработки 20.02.2020 г.

Принята к публикации 22.02.2020 г.

В статье приведены результаты оценки антимикробной и антиоксидантной активности синтезированных биологически активных веществ в сравнении со стандартным антиоксидантом – аскорбиновой кислотой. Антиоксидантную активность изучали по способности взаимодействовать с радикалом – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ, DPPH<sup>•</sup>). Установлено, что в условиях данной тест-системы выраженную антирадикальную активность проявили образцы 2-(2-гидроксибензоил)-N-фенилгидразинкарботиоамид (1) IC<sub>50</sub>(DPPH) = 15.5 μM, для 2-(4-гидроксибензоил)-N-фенилгидразинкарботиоамид (2) IC<sub>50</sub>(DPPH) оказалось равной 31.7 μM. Результаты оценки антимикробной активности в отношении грамположительных и грамотрицательных тест-штаммов показали слабую антибактериальную активность.

*Ключевые слова:* антиоксидант, антирадикальная активность, антимикробная активность, штамм, свободный радикал, тиосемикарбазид, 1,2,4-триазол, ДФПГ

DOI: 10.31857/S0132342320040235

### ВВЕДЕНИЕ

Производные салициловой кислоты (салицилаты) вошли в клиническую практику с конца XIX века и повсеместно применяются до настоящего времени. Такие производные салициловой кислоты как ацетилсалициловая кислота (аспирин), салицилат натрия, салициланилид, салициламид (САМ), метилсалицилат используются в медицине в качестве анальгетиков (болеутоляющее), антипиретиков (жаропонижающее) и антиагрегантов (антитромботическое), антиоксидантов, антипролиферативных и цитотоксических агентов [1–3], они также показали противоопухолевую активность [4–6]. По последним данным производные салициловой кислоты можно рассматривать как биорегуляторы, которые синтезируются самим организмом и выполняют защитные функции. И это позволяет переосмыслить роль салициловой кислоты в патофизиологии человека и животных.

В соседних положениях бензойного кольца у молекулы салициловой кислоты находится группа OH, как у фенола, и группа COOH – как у бензойной кислоты, которые имеют большие возможности для химической трансформации ее молекулы. Салициловая кислота является природным фенольным гормоном, которая играет важную роль в защите растений от разного рода грибов и патогенных микроорганизмов. Из анализа литературных данных [7, 8] по различным производным салициловой кислоты можно отметить следующую особенность взаимосвязи “структура–биологическая активность” в молекулах ее производных:

а) Все замещения по кислотным группам (участки I и II) обеспечивали сохранение жаропонижающих, анальгезирующих, противовоспалительных свойств и появлению новых видов активности (R' = OCH<sub>3</sub>, OC<sub>3</sub>H<sub>7-i</sub>, NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, COOR) и др. [9–11].

б) Замещения по фенольному кольцу молекулы салициловой кислоты (участок III) – появле-

# Автор для связи: (эл. почта: e-mail: satpaeva\_zh@mail.ru).

Таблица 1. Химические формулы изучаемых биологически активных веществ

№ пп	Названия веществ	Структурная формула
1	2-(2-Гидроксибензоил)- <i>N</i> -фенилгидразинкарботиоамид (1)	
2	2-(4-Гидроксибензоил)- <i>N</i> -фенилгидразинкарботиоамид (2)	
3	3-(2-Гидроксифенил)-4-фенил-1 <i>H</i> -1,2,4-триазол-5(4 <i>H</i> )-тион (3)	
4	3-(4-Гидроксифенил)-4-фенил-1 <i>H</i> -1,2,4-триазол-5(4 <i>H</i> )-тион (4)	

нию противотуберкулезных, фунгицидных, противогрибковых, антидепрессантных и др. свойств. При этом во многих препаратах также сохраняется обезболивающее, жаропонижающее свойства исходного субстрата [12–14].

В Новосибирском институте органической химии (НИОХ) им. Н.Н. Ворожцова СО РАН на базе структур осалмида и парацетамола направленным синтезом была получена группа замещенных амидов салициловой кислоты, имеющих в *орто*-положении экранирующие *трет*-бутильные заместители и изучены их антиоксидантные свойства [15]. Антиоксидантные свойства изученных веществ авторы объясняют протеканием двух механизмов: взаимодействием с пероксильными радикалами и разрушением гипероксидов с образованием молекулярных продуктов.

Целенаправленный поиск эффективных новых терапевтических агентов на основе салициловой кислоты, отличающихся повышенной биологической активностью в сочетании с низкой токсичностью и менее выраженным побочным действием, по-прежнему является актуальной задачей. Перспективным направлением создания новых биоактивных производных салициловой кислоты является синтез “гибридных молекул”, сочетающих в своей структуре несколько функциональных групп, независимо или синергически действующих на процесс окисления субстратов в липидной или водной фазе.

Целью настоящей работы является исследование антимикробной и антирадикальной ак-

тивности тиосемикарбазидных и триазоловых производных *орто*- и *пара*-гидроксибензойных кислот (1–4) на модели 2,2-дифенил-1-пикрилгидраза (ДФПГ), расширение арсенала антиоксидантных средств синтетического происхождения на основе салициловой кислоты, его аналога.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Объекты исследования приведены в табл. 1.

Ранее нами были синтезированы производные салициловой кислоты и его аналога (1–4), имеющего в *пара*-положении гидроксильную группу [16, 17], которые содержат в своей структуре тиоамидную группу, остаток фенильного кольца, а также 1,2,4-триазольные группы. Оценка антирадикальных свойств соединений (1–4) с целью выявления среди них активных антиоксидантов была проведена впервые.

Из табл. 2 мы видим, что из представленных соединений (1–4) только 2-(2-гидроксибензоил)-*N*-фенилгидразинкарботиоамид (1) и 2-(4-гидроксибензоил)-*N*-фенилгидразинкарботиоамид (2) снижают оптическую плотность исходного раствора ДФПГ-радикала более чем на 50%, а значит являются перспективными для дальнейших исследований.

Во второй серии эксперимента изучали способность соединений 1 и 2 взаимодействовать с ДФПГ-радикалом в различных концентрациях (от 2.5 до 50  $\mu\text{M}$ ) (табл. 3).

**Таблица 2.** Значения оптической плотности раствора 100  $\mu\text{M}$  ДФПГ-радикала после 10-минутной инкубации с испытуемым веществом в финальной концентрации 50  $\mu\text{M}$ 

№	Названия соединения	Оптическая плотность, отн. ед.
1	2-(2-Гидроксибензоил)- <i>N</i> -фенилгидразинкарботиоамид (1)	0.049
2	2-(4-Гидроксибензоил)- <i>N</i> -фенилгидразинкарботиоамид (2)	0.297
3	3-(2-Гидроксифенил)-4-фенил-1 <i>H</i> -1,2,4-триазол-5(4 <i>H</i> )-тион (3)	0.82
4	3-(4-Гидроксифенил)-4-фенил-1 <i>H</i> -1,2,4-триазол-5(4 <i>H</i> )-тион(4)	0.882
	Контроль (раствор ДФПГ без испытуемого образца)	1.038

**Таблица 3.** Значения оптической плотности раствора 100  $\mu\text{M}$  ДФПГ-радикала после 10-минутной инкубации с веществами 1 и 2 в финальных концентрациях в реакционной смеси 50, 25, 20, 15, 10, 5 и 2.5  $\mu\text{M}$ 

№	Финальная концентрация веществ 1 и 2 в реакционной смеси, $\mu\text{M}$	Оптическая плотность, отн. ед. для 1	Оптическая плотность, отн. ед. для 2
1	50	0.048	0.315
2	25	0.294	0.575
3	20	0.413	0.644
4	15	0.562	0.708
5	10	0.698	0.758
6	5	0.848	0.817
7	2.5	0.929	0.858
	Контроль (раствор ДФПГ без испытуемого образца)	1.038	1.038

Зависимость оптической плотности раствора ДФПГ-радикала от концентрации соединений 1 и 2 представлена на рис. 1.

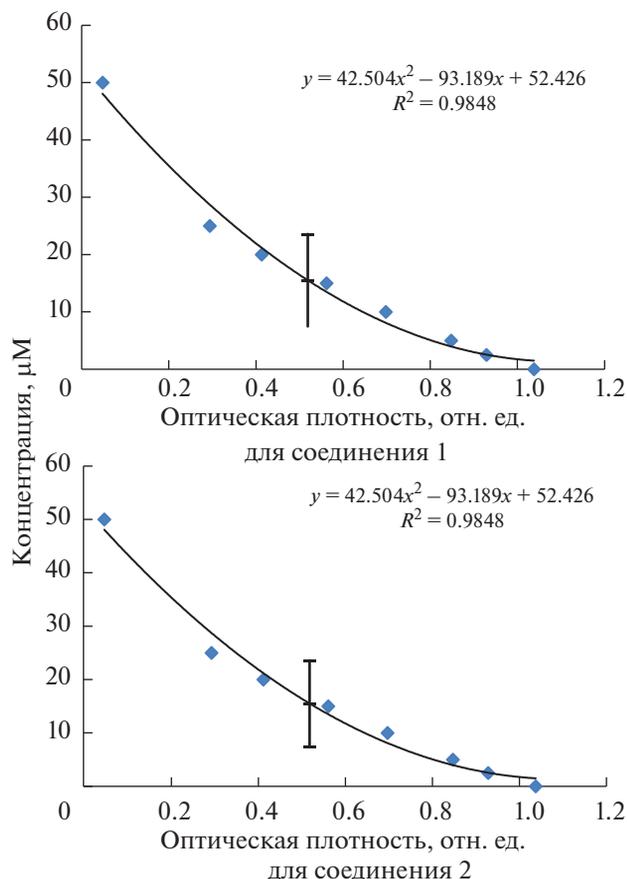
С помощью построенных калибровочных кривых (рис. 1) определили концентрации 2-(2-гидроксибензоил)-*N*-фенилгидразинкарботиоамида (1) и 2-(4-гидроксибензоил)-*N*-фенилгидразинкарботиоамида (2), способные на 50% снизить оптическую плотность 100  $\mu\text{M}$  раствора ДФПГ-радикала. Для соединения (1)  $IC_{50}(\text{ДРРН})$  равна 15.5  $\mu\text{M}$ , а для соединения (2)  $IC_{50}(\text{ДРРН})$  оказалась равной 31.7  $\mu\text{M}$ .

В качестве стандартного вещества с антиоксидантным действием использовали аскорбиновую кислоту, для которой мы изучили способность в различных концентрациях (от 2.5 до 50  $\mu\text{M}$ ) взаимодействовать с ДФПГ-радикалом (табл. 4). В обзоре E. Niki [18, 19] аскорбиновая кислота отнесена к водорастворимым антирадикальным соединениям и показана ее возможность взаимодействия со свободными радикалами жирнокислотных компонентов липидов.

С помощью построенной калибровочной кривой (рис. 2) определили концентрацию аскорбиновой кислоты, способную на 50% снизить оптическую

**Таблица 4.** Значения оптической плотности раствора 100  $\mu\text{M}$  ДФПГ-радикала после 10-минутной инкубации с аскорбиновой кислотой в финальных концентрациях в реакционной смеси 50, 25, 20, 15, 10, 5 и 2.5  $\mu\text{M}$ 

№	Финальная концентрация аскорбиновой кислоты в реакционной смеси, $\mu\text{M}$	Оптическая плотность, отн. ед.
1	50	0.029
2	25	0.418
3	20	0.51
4	15	0.635
5	10	0.694
6	5	0.791
7	2.5	0.865
	Контроль (раствор ДФПГ без испытуемого образца)	1.028

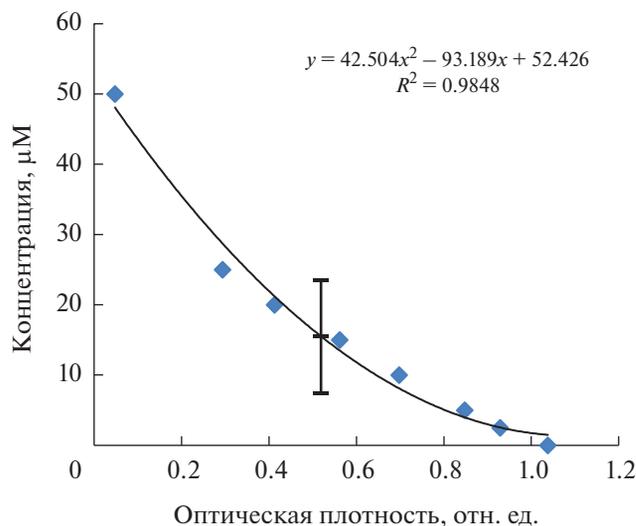


**Рис. 1.** Зависимость оптической плотности раствора ДФПГ-радикала от концентрации 2-(2-гидроксibenzoил)-*N*-фенил-гидразинкарботиоамид (1) и 2-(4-гидроксibenzoил)-*N*-фенил-гидразинкарботиоамид (2).

скую плотность 100 µM раствора ДФПГ-радикала. Для аскорбиновой кислоты  $IC_{50}(DPPH)$  оказалась равной 19.9 µM.

Оценка антирадикального действия образцов (1–4) в отношении ДФПГ-радикала показала, что в условиях данной тест-системы, наиболее выраженную антирадикальную активность проявили образцы 1 и 2, для которых была определена концентрация, способная на 50% снижать оптическую плотность 100 µM раствора ДФПГ-радикала. Для 2-(2-гидроксibenzoил)-*N*-фенилгидразинкарботиоамид (1)  $IC_{50}(DPPH)$  оказалась равной 15.5 µM, для 2-(4-гидроксibenzoил)-*N*-фенилгидразинкарботиоамид (2)  $IC_{50}(DPPH)$  оказалось равной 31.7 µM.

По полученным нами данным  $IC_{50}(DPPH)$  (µM) для референтного образца, в данном случае для аскорбиновой кислоты – 19.9 µM. Активность образца 2-(2-гидроксibenzoил)-*N*-фенилгидразинкарботиоамид (1)  $IC_{50}(DPPH) = 15.5$  µM, не уступает референтному образцу аскорбиновой кислоте.



**Рис. 2.** Зависимость оптической плотности раствора ДФПГ-радикала от концентрации аскорбиновой кислоты.

По литературным данным [20]  $IC_{50}(DPPH)$  (µM) для известных антиоксидантов, таких как, глутатион – 49, гидрохинон – 27, тролокс – 28, α-токоферол – 28, кверцетин – 8. Таким образом, антирадикальная активность образцов 1 и 2 сопоставима с активностью известных антиоксидантов.

Продолжая исследования по обнаружению среди синтезированных производных веществ с выраженной биологической активностью, были проведены первичные скрининговые испытания соединений (1–4) на антимикробную активность в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), грамотрицательных (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) и к дрожжевому грибку *Candida albicans* штаммов методом диффузии в агар. Препарат сравнения – гентамицин для бактерий и нистатин для дрожжевого грибка *C. albicans*.

Антимикробную активность соединений (1–4) оценивали по диаметру зон задержки роста тест-штаммов (мм). Диаметр зон задержки роста меньше 10 мм и сплошной рост в чашке оценивали как отсутствие антибактериальной активности, 10–15 мм – слабая активность, 15–20 мм – умеренно выраженная активность, свыше 20 мм – выраженная. Каждый образец испытывался в трех параллельных опытах [21].

Результаты исследования антимикробной активности образцов приведены в табл. 5.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе был использован ДФПГ фирмы “Sigma Aldrich”. Для оценки антирадикальной активности исследуемых образцов (1–4) в тесте с

Таблица 5. Антимикробная активность образцов (1–4)

Соединение	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
1	18 ± 1	16 ± 1	14 ± 1	12 ± 1	13 ± 1
2	12 ± 1	11 ± 1	10 ± 1	–	12 ± 1
3	13 ± 1	13 ± 1	12 ± 1	–	11 ± 1
4	12 ± 1	14 ± 1	12 ± 1	–	11 ± 1
Гентамицин	26 ± 1	24 ± 1	23 ± 1	24 ± 1	–
Нистатин	–	–	–	–	22 ± 1

ДФПГ-радикалом использовали метанольный раствор ДФПГ (100 мМ). Для отбора веществ с выраженной антирадикальной активностью смешивали 2 мл 100 мМ метанольного раствора ДФПГ с 20 мкл исследуемого объекта, растворенного в метаноле в концентрации 5 мМ. Таким образом, финальная концентрация испытуемого вещества в реакционной смеси составила 50 мМ. Через 10 минут после добавления раствора испытуемого соединения к раствору ДФПГ-радикала измеряли снижение оптической плотности при 515 нм. Для веществ, способных снижать оптическую плотность более чем на 50%, проводили тест на взаимодействие с ДФПГ-радикалом в финальных концентрациях исследуемых веществ 50, 25, 20, 15, 10, 5 и 2.5 мМ. После чего определяли концентрацию испытуемого вещества, способную на 50% снижать оптическую плотность – IC<sub>50</sub>(DPPH).

Изучение антимикробной активности вышеуказанных образцов проводилось по отношению к штаммам грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, к грамотрицательным штаммам *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и к дрожжевому грибку *Candida albicans* методом диффузии в агар (лунок). Препараты сравнения – гентамицин для бактерий и нистатин для дрожжевого грибка *C. albicans*.

Культуры выращивали на жидкой среде pH 7.3 ± 0.2 при температуре от 30 до 35°C в течение 18–20 часов. Культуры разводили 1 : 1000 в стерильном 0.9% растворе натрия хлорида изотоническом, вносили по 1 мл в чашки с соответствующими элективными, питательными средами для изучаемых тест-штаммов и засеивали по методу “сплошного газона”. После подсушивания на поверхности агара формировали лунки размером 6.0 мм, в которые вносили раствор исследуемого образца, гентамицина, нистатина. В контроле использовали этиловый спирт в эквивалентных количествах. Посевы инкубировали при 37°C, учет растущих культур проводили через 24 часа.

## ВЫВОДЫ

1. На основании результатов исследования антирадикальных свойств синтезированных веществ установлено, что антирадикальная активность образцов 1 и 2 сопоставима с активностью известных антиоксидантов. Они обладают выраженным антирадикальным действием.

2. В результате проведенного биоскрининга на антимикробную активность установлено, что все исследованные вещества проявляют слабую антибактериальную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных тест-штаммов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит исследований с использованием людей или животных в качестве объектов исследования.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rainsford, K.D. Aspirine and Related Drugs. London, UK: CRC Press, 2004.
2. Sahoo J. Paidesetty S.K. // Eyp. J. Bas. Appl. Sci. 2015. V. 2. P. 268–280. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2015.07.006>
3. Djurendić E., Dojčinović Vujašković S., Sakač M. et al. // Arkivoc. 2011. V. 2. P. 83–102. <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.207>
4. Thun M.J., Jacobs E.J., Patrono C. // Nat. Rev. Clin. Oncol. 2012. V. 9. P. 259–267.
5. Pathirana R., West P., Hedderley D., Eason J. // Protoplasma. 2017. V. 254. P. 1–13.
6. Spitz G.A., Furtado C.M., Sola-Penna M., Zancan P. // Biochem. Pharmacol. 2009. V. 77. P. 46–53.
7. Ioana M.C., Iena C.U., Alfa Xenia Lupea et al. // Rev. Chim. 2008. V. 59. № 2. P. 247–250.
8. Martin Krátký, Jarmila Vinšová // Molecules. 2012. V. 17. P. 9426–9442. <https://doi.org/10.3390/molecules17089426>

9. Alicja Wodnicka, Elżbieta Huzar, Maria Krawczyk, Halina Kwiecień // Polish J. of Chem. Tech. V. 19. 1. P. 143–148.  
<https://doi.org/10.1515/pjct-2017-0019>
10. Runde Xiong, Dong Xu, Xiangpin Deng et al. // Royal Soc. of Chem. Medchemcomm. 2019.  
<https://doi.org/10.1039/c8md00484f>
11. Evgenija Djurendić, Sanja Dojčinović Vujašković, Marija Sakač et al. // Arkivoc. 2011. V. 2. P. 83–102.  
<https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0012.207>
12. Fadeyi O.O., Obafemi C.A., Adewunmi C.O., Iwalewa E.O. // African J. of Biotech. 2004. V. 3. P. 426–431.  
<https://doi.org/10.11892.8817>
13. Herman Gerhon, Raulo Parmegiani // Pfister Chemical Works, Ridgefield, New Jersey, 1962.
14. Andressa Brito Lira, Camila de Albuquerque Montenegro, Kardilandia Mendes de Oliveira et al. // Hindawi. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018. P. 14. ID 6179427.  
<https://doi.org/10.1155/2018/6179427>
15. Перевозкина М.Г. // Инновации в науке: сб. ст. по матер. XXXVII междунар. науч.-практ. конф. № 9(34). Новосибирск: СибАК, 2014.
16. Nurkenov O.A., Fazylov S.D., Satpaeva Zh.B. et al. // Russ. J. of Gen. Chem. 2014. V. 84. P. 1857–1859.  
<https://doi.org/10.1134/S1070363214090369>
17. Nurkenov O.A., Fazylov S.D., Satpaeva Zh.B. et al. // Russ. J. of Gen. Chem. 2015. V. 85. P. 57–60.  
<https://doi.org/10.1134/S1070363215010107>
18. Niki E. // J. Chem. and Phys. Lipids. 1987. V. 44. P. 227–253.
19. Niki E., Takahashi M., Komiko E. // Chem. Letters. 1986. P. 1573–1576.
20. Plattner S. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2014. V. 406. P. 213–224.
21. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия // Справочник, М.: Медицина, 1982. 496 с.

## Anti-Radical and Antimicrobial Activity of Thiosemicarbaside and 1,2,4-Triazole Derivatives of Hydroxybenzoic Acid

Zh. B. Satpaeva<sup>\*, \*\*, #</sup>, Z. T. Shulgau<sup>\*\*\*</sup>, S. B. Akhmetova<sup>\*\*\*\*</sup>,  
O. A. Nurkenov<sup>\*\*</sup>, S. D. Fazylov<sup>\*, \*\*</sup>, and M. Zh. Burkeev<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>E-mail: satpaeva\_zh@mail.ru

<sup>\*</sup>Buketov State University, ul. Universitetskaya 28, Karaganda, 100028 Kazakhstan

<sup>\*\*</sup>Institute of Organic Synthesis and Coal Chemistry of the Republic of Kazakhstan,  
ul. Alikhanova 1, Karaganda, 100008 Kazakhstan

<sup>\*\*\*</sup>RSE “National Center for Biotechnology” of the Ministry of Education and Science of the Republic,  
Korgalzhynskoye shosse 13/5, Nur-Sultan, 010000 Kazakhstan

<sup>\*\*\*\*</sup>Karaganda State Medical University, ul. Gogolya 40, Karaganda, 100000 Kazakhstan

The article presents the results of the evaluation of the antimicrobial and antioxidant activity of synthesized biologically active substances in comparison with the standard antioxidant – ascorbic acid. Antioxidant activity was studied by the ability to interact with the radical – 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>). It was established that under the conditions of this test system, 2-(2-hydroxybenzoyl)-N-phenylhydrazinecarbothioamide (1) IC<sub>50</sub>(DPPH) = 15.5 μM showed pronounced anti-radical activity, for 2-(4-hydroxybenzoyl)N-phenylhydrazinecarbothioamide (2) IC<sub>50</sub>(DPPH) was found to be 31.7 μM. The results of the evaluation of antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative test strains showed weak antibacterial activity.

**Keywords:** antioxidant, antiradical activity, antimicrobial activity, strain, free radical, thiosemicarbazide, 1,2,4-triazole, DPPH