

## ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ФТОРЗАМЕЩЕННЫХ ПИРРОЛОХИНОЛИНОВ

Степаненко И.С., Коткин А.И., Ямашкин С.А.

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный педагогический институт  
им. М.Е. Евсевьева», Саранск, e-mail: 19aleksey90@mail.ru

Установлено, что фторзамещенные пирролохинолины, как и фторзамещенные хинолоны обладают антимикробной активностью. Проведено изучение противомикробной активности, полученного и описанного нами 6-гидрокси-2,3-диметил-6-трифторметил-6,7,8,9-тетрагидро-1Н-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-она, синтезированного из 7-амино-2,3-диметил-индола и 3,3,3-трифторацетоксусного эфира. Для определения антимикробной активности исследуемого соединения использовали два метода: метод серийных разведений в бульоне и диско-диффузионный метод. Сравнительный анализ результатов показал, что 6-гидрокси-2,3-диметил-6-трифторметил-6,7,8,9-тетрагидро-1Н-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-он проявляет противомикробный эффект относительно тест-штаммов микроорганизмов, сопоставимый с препаратом сравнения диоксидином и обладает широким спектром противомикробной активности как относительно тест-штаммов, так и штаммов микроорганизмов, выделенных из клинического материала. Исследуемый препарат показал к ряду тест-штаммов микроорганизмов среднюю антимикробную активность при низкой токсичности. В связи с этим научные изыскания в области биологической активности пирролохинолинов являются перспективными.

**Ключевые слова:** 6-гидрокси-2,3-диметил-6-трифторметил-6,7,8,9-тетрагидро-1Н-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-он, антимикробная активность, метод серийных разведений, диско-диффузионный метод

## THE STUDY OF ANTIMICROBIC ACTIVITY OF FLUORINE SUBSTITUTED PYRROLOCHINOLINES

Stepanenko I.S., Kotkin A.I., Yamashkin S.A.

Mordovian M.E. Yevseviev State Pedagogical Institute, Saransk, e-mail: 19aleksey90@mail.ru

Found, that fluoro substituted pyrroloquinolines as fluoro substituted quinolones have anti-microbic activity. The study has been carried out for anti-microbic activity, synthesized and described by the authors 6-hydroxy-2,3-dimethyl-6-trifluorinemethyl-6,7,8,9-tetrahydro-1H-pyrrolo[3,2-*h*]chinoline-8-on, synthesized from 7-amino-2,3-dimethylindole and 3,3,3-trifluoroacetoacetate ester. The method of series dissolutions in the broth and disco-diffusion method have been used in order to determine the anti-microbic activity of the composition studied. A comparative analysis of the results obtained shows that this composition results in the anti-microbic effect with respect to microorganism test-stems which is comparable to the dioxidine preparation and which possesses a wide spectrum of anti-microbic activity with respect to the test-stems and the microorganism stems extracted from the clinical material. The test medication showed a number of microorganism test-stems high anti-microbic activity with low toxicity. In this connection, researches in the field of biological activity of pyrroloquinoline are promising.

**Keywords:** 6-hydroxy-2,3-dimethyl-6-trifluorinemethyl-6,7,8,9-tetrahydro-1H-pyrrolo[3,2-*h*]chinoline-8-on, anti-microbic activity, method of series dissolutions, disco-diffusion method

Нами продолжают исследования в области химии аминокислот и пирролохинолинов. Интерес к последним имеет как фундаментальный, так и прикладной характер. Фундаментальность выражается в разработке удобных эффективных методов регионально направленного синтеза пирролохинолинов с тем или иным сочленением колец, с теми или иными заместителями, выявлении возможности использования тех или иных аминокислот для формирования конденсированного гетероцикла, сочетающего индольный и хинолиновый фрагменты. Прикладной характер выражается в изучении биологической активности пирролохинолинов, в поиске на их основе лекарственных препаратов. Настоящее исследование имеет прикладную направленность.

**Цель исследования** – изучить противомикробную активность и спектр антимикробного действия, полученного и описанного нами [1] 6-гидрокси-2,3-диметил-6-трифторметил-6,7,8,9-тетрагидро-1Н-пирроло[3,2-*h*]хинолин-8-она.

### Материалы и методы исследования

Исследование проводилось на базе бактериологической лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Республики Мордовия «Республиканская инфекционная клинической больницы» (ГБУЗ РМ РИКБ).

Исследуемое соединение использовали в виде раствора (в качестве растворителя использовали «Димексид» (концентрат для приготовления растворов для наружного применения, производство ОАО «Марбиофарм»). В качестве препарата сравнения использован диоксидин (производство «Биосинтез», раствор для местного применения, эндотрахеального и внутривенного введения, 10 мг/мл).

Для определения антимикробной активности исследуемого соединения использовали два метода: метод серийных разведений в бульоне (макротетом «пробирочным») и диско-диффузионный метод (ДДМ).

Метод серийных разведений основан на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего микробиологическую активность исследуемого соединения – величины минимальной подавляющей концентрации (МПК). Для определения МПК заданные концентрации исследуемого вещества вносили в Мюллер-Хинтон бульон (МХБ) (HiMediaLaboratoriesPvt.Limited) (для стрептококков

с содержанием крови), а затем засеивали культурой исследуемого микроорганизма и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста. Исходная опытная концентрация исследуемого соединения составила 1000 мкг/мл. Конечная концентрация микроорганизма в каждой пробирке составляла примерно  $5 \cdot 10^5$  КОЕ/мл. Все пробирки, кроме пробирки «отрицательный» контроль, инкубировали в обычной атмосфере при температуре 37°C в течение 16–20 или 20–24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма). Пробирку «отрицательный» контроль помещали в холодильник при 4°C, где хранили до учета результатов. Для определения наличия роста микроорганизма пробирки с посевами просматривали в проходящем свете. Рост культуры в присутствии исследуемого соединения сравнивали с референтной пробиркой («отрицательный» контроль), содержащей исходный инокулом и хранившейся в холодильнике. МПК определяли по наименьшей концентрации исследуемого соединения, которая подавляет видимый рост микроорганизма. МБК определяли путем высева из пробирок на плотные питательные среды с последующей инкубацией посевов в обычной атмосфере при температуре 37°C в течение 16–20 или 20–24 ч (в зависимости от вида тестируемого микроорганизма).

В качестве тест-микроорганизмов для метода серийных разведений использовали рекомендуемые в Российской Федерации [2] и Институтом клинических и лабораторных стандартов США [3] 4 музейных штамма микроорганизмов: *Pseudomonasaeruginosa* 27853 ATCC, *Escherichiacoli* 25922 ATCC, *Staphylococcus aureus* 29213 ATCC, *Streptococcuspyogenes* 1238 ATCC.

В ДДМ в качестве носителя исследуемого вещества использовали бумажные диски (стандартизированные диски НД-ПМП-1 из картона технического фильтровального ГОСТ 6722-75 (ФГУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Л. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека)). Непосредственно перед применением диски пропитывали исследуемым соединением и диоксином. В качестве контроля использовали диски, пропитанные дистиллированной водой. Для определения чувствительности ДДМ использовали стандартный инокулом, соответствующий по плотности 0,5 по стандарту Мак-Фарланда и содержащий примерно  $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл. Для инокуляции приготовленных чашек с агаром использовали стерильные ватные тампоны промышленного производства (палочка-тампон (пластик-хлопок) CITOSWAB стерильный в индивидуальной упаковке). Тампон погружали в стандартную суспензию микроорганизма, затем избыток инокулома удаляли, отжав тампон о стенки пробирки. Инокуляцию проводили штриховыми движениями в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°. Зоны подавления роста, исследуемого штамма микроорганизма, образовавшиеся в результате диффузии исследуемого вещества из носителя в Мюллер-Хинтон агар (МХА) (Hi Media Laboratories Pvt. Limited), определяли с помощью линейки-лекало (Hi Media Laboratories Pvt. Limited). Степень активности к исследуемым соединениям определялась в крестах по следующей схеме [2]: «+++» высокая активность – диаметр зоны задержки роста более 25 мм; «++» активное – диаметр зоны задержки роста 16–25 мм; «+» малоактивное – диаметр зоны задержки роста 10–15 мм; «+/-, 0» –

неактивное – диаметр зоны задержки роста менее 10 мм и полное отсутствие. Содержание препаратов в диске составило от 60 мкг до 250 мкг.

В ходе исследования была изучена чувствительность 10 музейных тест-штаммов микроорганизмов: *Salmonellaenteritidis* 5765 ATCC, *Shigellasonnei*S-форма 20, *Pseudomonasaeruginosa* 453, *Escherichiacoli* M17 штамм, *Staphylococcus aureus* 906, *Enterococcusfaecalis* 2919 ATCC, *Citrobacterfreundii* 101/57, *Proteusvulgaris* 222, *Klebsiellapneumoniae* 9172, *Bacilluscereus* 96.

Музейные штаммы, используемые в работе, получены из коллекции музея живых культур ФГУН ГИСК им. Л.А. Тарасевича.

В качестве опытных исследованы 422 штамма микроорганизмов, изолированных из материала, взятого от больных ГБУЗ РМ РИКБ с неспецифическими и специфическими заболеваниями органов дыхания и мочевыводящих путей, кишечника. Источником выделения патогенов служила моча, мокрота, слизь из зева, носа и носоглотки, фекалии, секционный материал.

### Результаты исследования и их обсуждение

Для препарата сравнения диоксида МПК относительно штаммов *Staphylococcus*spp. составляет 125,0–1000,0 мкг/мл, *Escherichiacoli* 8,0–250,0 мкг/мл, *Pseudomonasspp.* 125,0–1000,0 мкг/мл, *Streptococcus*spp. 64,0–1000,0 мкг/мл [4].

Проведенные исследования показали, что минимальные подавляющие концентрации исследуемого соединения относительно музейных штаммов микроорганизмов составили в отношении *S. aureus* 29213 – 59,0 мкг/мл, *E. coli* 25922 – 108,0 мкг/мл, *P.aeruginosa* 27853 – 184,0 мкг/мл, *S.pyogenes* 1238 – 117,0 мкг/мл.

Сравнительный анализ результатов показал, что 6-гидрокси-2-диметил-6-трифторметил-6,7,8,9-тетрагидро-1Н-пирроло[3,2-h]хинолина-8-он проявляет противомикробный эффект относительно тест-штаммов микроорганизмов, сопоставимый с препаратом сравнения диоксином.

Изучение спектра противомикробной активности исследуемого соединения с помощью ДДМ в отношении тест-штаммов микроорганизмов (табл. 1) показало, что 6-гидрокси-2-диметил-6-трифторметил-6,7,8,9-тетрагидро-1Н-пирроло [3,2-h]хинолина-8-он проявил активность относительно грамотрицательных микроорганизмов (*S. enteritidis*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*). Из грамположительных микроорганизмов чувствительны к исследуемому соединению оказались *S. aureus* и *B. cereus*. Малоактивны к исследуемому соединению оказались *S. sonnei*, *E. faecalis*, *C. freundii*.

В качестве опытных исследованы микроорганизмы, представители 5 семейств (*Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudomonadaceae*) и 15 родов (табл. 2).

Таблица 1

Исследование противомикробной активности исследуемых соединений относительно тест-штаммов микроорганизмов диско-диффузионным методом.

Степень активности	Тест-штамм	Контроль	Исследуемое соединение	Диоксидин
	<i>Staphylococcus aureus</i> 906	0	++*	++*
	<i>Enterococcus faecalis</i> 2919 ATCC	0	+	+
	<i>Escherichia coli</i> M17 штамм	0	++*	+
	<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	0	++*	++*
	<i>Shigellasonnei</i> S-форма 20	0	+	++*
	<i>Citrobacterfreundii</i> 101/57	0	+	+++*
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 9172	0	++*	+++*
	<i>Proteus vulgaris</i> 222	0	++*	+++*
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	0	++*	++*
	<i>Bacillus cereus</i> 96	0	++*	+++*

Примечание: \* – отличие от контроля статистически достоверно при  $P < 0,05$  [5, 6]; «+++» высокая активность – диаметр зоны задержки роста более 25 мм; «++» активное – диаметр зоны задержки роста 16–25 мм; «+» малоактивное – диаметр зоны задержки роста 10–15 мм; «+/-, 0» – неактивное – диаметр зоны задержки роста менее 10 мм и полное отсутствие.

Таблица 2

Характеристика исследуемых клинических штаммов микроорганизмов

№ п/п	Штамм микроорганизма	Количество изученных штаммов	Изолированы из материала исследования
1	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus warneri</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	14 17 7 9 7	Слизь из зева, носа, носоглотки, моча, фекалии, раневое отделяемое, секционный материал
2	<i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus sanguinis</i> <i>Streptococcus mutans</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	10 8 11 7 10 9 8 10 8 7	Слизь из зева, носа, носоглотки, мокрота, моча, фекалии, секционный материал
3	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Salmonella enteritidis</i> <i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigellasonnei</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter gergoviae</i> <i>Enterobacter amnigenes</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Hafnia alvei</i>	29 15 12 14 6 8 9 8 7 7 6 15 18 9 12 6 8	Слизь из зева, носа, носоглотки, моча, раневое отделяемое, фекалии, секционный материал
4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	8	Фекалии, секционный материал
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29	Слизь из зева, носа, носоглотки, моча, фекалии, секционный материал

Чувствительность опытных штаммов к исследуемому соединению была различной (табл. 3).

**Таблица 3**

Исследование противомикробной активности исследуемых соединений относительно клинических штаммов микроорганизмов диско-диффузионным методом

Степень активности	Тест-штаммы	Контроль	Исследуемое соединение
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	+ / ++
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	++
	<i>Staphylococcus warneri</i>	0	+
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	++
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	0	++
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	0	++
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0	+
	<i>Streptococcus salivarius</i>	0	+ / ++
	<i>Streptococcus uberis</i>	0	+ / ++
	<i>Streptococcus mitis</i>	0	+ / ++
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	+
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	0	+ / ++
	<i>Streptococcus mutans</i>	0	+
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	+
	<i>Enterococcus faecium</i>	0	+
	<i>Escherichia coli</i>	0	++
	<i>Salmonella enteritidis</i>	0	++
	<i>Salmonella typhimurium</i>	0	++
	<i>Shigella sonnei</i>	0	++
	<i>Citrobacter freundii</i>	0	+ / ++
	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	+ / ++
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	+ / ++
	<i>Enterobacter gergoviae</i>	0	++
	<i>Enterobacter amnigenes</i>	0	++
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	0	++
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	+ / ++
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	+
	<i>Proteus vulgaris</i>	0	+
	<i>Proteus mirabilis</i>	0	+
	<i>Morganella morganii</i>	0	++
	<i>Pantoea agglomerans</i>	0	++
	<i>Hafnia alvei</i>	0	+
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	++
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	+ / ++

**Примечание:** «+++» высокая активность – диаметр зоны задержки роста более 25 мм; «++» активное – диаметр зоны задержки роста 16–25 мм; «+» малоактивное – диаметр зоны задержки роста 10–15 мм; «+/-, 0» – неактивное – диаметр зоны задержки роста менее 10 мм и полное отсутствие.

Чувствительность к исследуемому соединению наблюдалась у клинических штаммов грамположительных микроорганизмов *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. uberis*, *S. mitis* и грамотрицательных микроорганизмов *E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. sonnei*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. amnigenes*, *E. hormaechei*, *K. pneumoniae*, *M. morganii*, *P. agglomerans*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*. Остальные исследуемые микроорганизмы (*S. warneri*, *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *S. agalactiae*, *E. faecalis*, *E. faecium*,

*K. oxytoca*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *H. alvei* оказались малочувствительны к исследуемому соединению.

Таким образом, 6-гидрокси-2,3-диметил-6-трифторметил-6,7,8,9-тетрагидро-1H-пирроло [3,2-h]хинолина-8-он проявил широкий спектр противомикробной активности как в отношении грамположительных, так и в отношении грамотрицательных микроорганизмов и представляет интерес для дальнейшего исследования.

#### Список литературы

1. Ланг Т.А. Как описывать статистику в медицине / Т.А. Ланг, М. Сесик; пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. – М.: Практическая медицина, 2011. – 480 с.
2. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890–04) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – Т. 6. – № 4. – С. 306–359.
3. Падейская Е.Н. Антибактериальный препарат диоксидин: особенности биологического действия и значение в терапии различных форм гнойной инфекции // Инфекции и антимикробная терапия. – 2001. – Т.3 – № 5. – С.1 05–155.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. В.П. Фисенко, Б.В. Арзамасцева, Э.А. Бабаян и соавт. – М.: «Ремедиум», 2000. – 398 с.
5. Ямашкин С. А. Нитроиндолы, аминокиндоны, пирролохинолины // Избранные методы синтеза и модификации гетероциклов: химия синтетических индольных систем. – 2010. – Т. 3. – С. 472–498.
6. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, CLSI Vol. 29, № 3, Jan. 2009.

#### References

1. Lang T.A. Kak opisivat' statistiku v medicine / T.A. Lang, M. Sesik; per. s angl.pod red. V.P. Leonova. M.: Prakticheskajamedicina, 2011. 480 p.
2. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam (Metodicheskie ukazaniya MUK 4.2.1890–04) // Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnajah imioterapija. 2004. Tom 6. no. 4. pp. 306–359.
3. Padejskaja E.N. Antibakterial'nyj preparat dioksidin: osobennosti biologicheskogo dejstvija iznachenie v terapii razlichnyh form gnojnoj infekcii // Infekcii i antimikrobnaja terapija. 2001. T. 3 no. 5. pp. 105–155.
4. Rukovodstvopoj eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmako-logicheskikh veshhestv / Pod red. V.P. Fisenko, B.V. Arzamasceva, Je.A. Babajanisoavt. Moskva: «Remedium», 2000. 398 p.
5. Jamashkin S. A. Nitroindoly, aminoindoly, pirrolohinoliny // Izbrannye metody sintezaimodifikacii geterociklov: himija sinteticheskikh indol'nyh sistem. 2010. T. 3. pp. 472–498.
6. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, CLSI Vol. 29, no. 3, Jan. 2009.

#### Рецензенты:

Чаиркин И.Н., д.м.н., профессор, зав. кафедрой анатомии, ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», г. Саранск;

Кадималиев Д.А., д.б.н., профессор кафедры биотехнологии, ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», г. Саранск.

Работа поступила в редакцию 09.07.2013.