

ка составляла 200 мВ, а для суспензии и надосадочной жидкости— 370 мВ, при этом  $E_h$  осадка клеток бактерий на 200 мВ более отрицателен. На основании полученных данных мы приходим к выводу, что изменения ОВП происходят на мембранах бактериальных клеток и уже как вторичный процесс отражаются на редокс-состоянии суспензии клеток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Глазголев А. Н. Тезисы ФЕМО, 172, Пушкино, 1983.
2. Октябрьский О. Н., Писенчиков Р. А. Микробиология, 51, 515, 1982.
3. Октябрьский О. Н., Смирнова Т. В., Зеленин Е. Н. Биофизика, 22, 831, 1984.
4. Работнова И. Л. Роль физико-химических условий (рН и  $gH_2$ ) в жизнедеятельности микроорганизмов. М., 1957.
5. Eisenstadt E. J. Bacteriol., 112, 261, 1972.
6. Goldenberg H. Biochimica et Biophysica Acta, 694, 203, 1983.
7. Kaback H. R. Methods in Enzymol., 22, 99, 1971.
8. Regen D. M., Schraw W. P., Tapley H. J. and Juttan S. F. Biochimica et Biophysica Acta, 641, 62, 1981.
9. Robillard G. T., Konings W. N. Biochemistry, 20, 1025, 1981.
10. Robillard G. T., Konings W. N. Eur. J. Biochem., 121, 597, 1982.
11. Robillard G. T., Konings W. N. Plasmalemma and Tonoplast Funct. Plant. Cell. Proc. Int. Workshop. Strasbourg, Sept. 8-11, 1981, 313, 1982.

Поступило 19.11.1988 г.

Биол. ж. Армения, т. 41, № 5, 1988

УДК 615.281.547+47.5.466.22

## АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ГИДРОХЛОРИДА ЭТИЛОВОГО ЭФИРА N- $\beta$ - (p-ХЛОРБЕНЗОИЛ) ЭТИЛГЛИЦИЛГЛИЦИНА

Ю. З. ТЕР-ЗАХАРЯН, Р. В. АГАБАБЯН, А. Г. АГАБАБЯН,  
Г. А. ГЕВОРКЯН, О. Л. МНДЖОЯН

Институт тонкой органической химии им. А. Л. Мнджояна  
АН АрмССР, Ереван

Показано, что новый  $\beta$ -аминокетон—гидрохлорид этилового эфира N- $\beta$ - (p-хлорбензоил)этилглицилглицина *in vitro* характеризуется широким спектром антибактериального действия, особенно в отношении грамположительных и некоторых грамотрицательных культур. Соединение сохраняет антибактериальную активность и в опытах *in vivo*.

Բետա-ամինոկետոնի՝ N- $\beta$ -(պ-քլորբենզոիլ) էթիլգլիցիլգլիցինի էթիլ էսթերի հիդրոքլորիդը *in vitro* ունի հակաբակտերիալ ազդեցություն լայն սպեկտր, հատկապես դրամ-դրամիկ և որոշ դրամ-բացասական կոերոտրաների նկատմամբ: Միաժամանակ հակաբակտերիալ ակտիվությունը պահպանվում է նաև *in vivo* փորձերում:

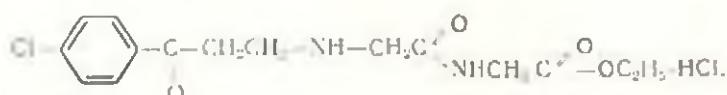
Beta-aminoketone, the hydrochloride of the ethyl ester of N- $\beta$ -(p-chlorobenzoyl) ethylglycylglycine, *in vitro* characterized by a broad spectrum

Сокращения: ТСХ—тонкослойная хроматография, МИК—минимальная подавляющая рост концентрация, МПД—максимально переносимая доза.

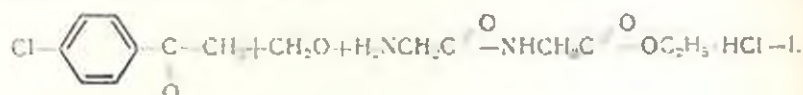
an antibacterial effect, especially against gram-positive and some gram-negative cultures. The compound maintains its antibacterial activity in *in vivo* experiments as well.

Гидрохлорид этилового эфира *N*-β-(*p*-хлорбензоил)этил/глицилглицина—антибактериальная активность—диоксидин.

В ряду β-аминокетонов, как известно, найдены соединения с выраженной антибактериальной активностью [4, 7, 8]. Ранее нами было показано, что среди аминокислотных производных β-аминокетонов есть малотоксичные соединения, обладающие антибактериальным действием [1]. В продолжение работ в этом направлении был впервые синтезирован β-аминокетон—производное эфира глицилглицина I и изучены его антибактериальные свойства.



**Материал и методика.** Гидрохлорид этилового эфира *N*-β-(*p*-хлорбензоил)этил/глицилглицина (I) получен аналогично аминокислотным производным β-аминокетонов [1] реакцией Манниха из *p*-хлорацетифенона, параформальдегида и гидрохлорида этилового эфира глицилглицина (II):



Строение соединения I подтверждено данными ИК-спектроскопии, чистота—элементным анализом и ТСХ. Гидрохлорид этилового эфира глицилглицина (II) получен по описанной методике [3]. ТСХ проведена на пластинках с закрепленным слоем силикагель—гипс, элюент—*n*-бутанол—этанол—уксусная кислота—вода, 8:2:1:3. ИК-спектры сняты на спектрометре UR-20 (ГДР).

Антибактериальная активность впервые синтезированного соединения—гидрохлорида этилового эфира *N*-β-(*p*-хлорбензоил)этил/глицилглицина (I)—изучена в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов в опытах *in vitro* и *in vivo*.

Антимикробное действие соединения I *in vitro* определяли общепринятым методом серийных разведений на мясепентонном бульоне (рН 7,2—7,4) в отношении разных видов бактерий, приведенных в табл. 1. Посевная доза культуры— $1 \cdot 10^6$  клеток на 1 мл среды. Контролем служили пробирки со средой без соединения. Результаты опытов учитывали после инкубации бактерий в течение 18—20 ч при 37°. Определяли МПК соединения, выраженные в мкг на 1 мл. В качестве контрольного препарата был взят диоксидин [5]—растворимый антибактериальный препарат широкого спектра действия, применяемый для лечения тяжелых форм гнойно-воспалительных процессов, вызванных грамотрицательной флорой или стафилококком. Соединение I и диоксидин испытывали в параллельных опытах.

Острую токсичность определяли при однократном подкожном введении белым мышам. Определяли также МПД.

Изучение антибактериального действия соединения I в опытах *in vivo* проводили на модели стафилококковой и дизентерийной инфекций, вызванной внутрибрюшинным введением культуры [6]. Использовали заражающие дозы, вызывающие 100%-ную гибель нелеченых (контрольных) животных. Соединение I вводили в дозе 1000 мг/кг однократно, подкожно. Активность оценивали по суммарной продолжительности жизни мышей на протяжении всего срока наблюдений, выраженной в мышечных и в процентах по отношению к максимально возможной продолжительности жизни в данной группе животных при наблюдении в течение 10 суток [6]. Достоверность различий в продолжительности жизни леченых животных по сравнению с контрольными установ-

живали по альтернативной форме учета реакции с вычислением критерия  $\chi^2$  [2]. Ис-  
пользовано 110 белых беспородных мышей обоего пола массой 17—19 г.

**Результаты и обсуждение.** Изучение соединения I показало, что оно, как и диоксидин, характеризуется широким спектром антибактериального действия, уровень которого зависит от вида бактерий (табл. 1). Более чувствительны к нему грамположительные бактерии, из грамотри-

Таблица 1. Спектр антибактериального действия гидрохлорида этилглицилаланина N-[8-(p-хлорбензоил)этил]глицилаланина

| Микроорганизм                           | МПК, мкг/мл            |     |
|-----------------------------------------|------------------------|-----|
|                                         | Соединение I Диоксидин |     |
| <i>St. aureus</i> 209р, чувствительный  | 31                     | 60  |
| <i>St. aureus</i> пенициллиноустойчивый | 17                     | 60  |
| <i>St. albus</i>                        | 31                     | 120 |
| <i>Str. faecalis</i>                    | 4                      | 30  |
| <i>Micrococcus</i> H.                   | 17                     | 60  |
| <i>Sarcina lutea</i>                    | 17                     | 60  |
| <i>B. megaterium</i>                    | 35                     | 30  |
| <i>B. mesentericus</i>                  | 35                     | 60  |
| <i>E. coli</i>                          | 620                    | 15  |
| <i>Sh. dysenteriae</i> Flexneri         | 70                     | 3,5 |
| <i>S. typhi abdominalis</i>             | 310                    | 3,5 |
| <i>Ps. aeruginosa</i>                   | 35                     | 60  |
| <i>Proteus vulgaris</i>                 | 310                    | 3   |
| <i>P. rettgeri</i>                      | 150                    | 150 |
| <i>P. mirabilis</i>                     | 310                    | 15  |
| <i>Enterobact. aerogenes</i>            | 35                     | 15  |
| <i>Str. faecalis alcaligenes</i>        | 35                     | 60  |

рицательных — *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacterium aerogenes*, *Streptococcus faecalis alcaligenes*. МПК которых находится в пределах до 30 мкг/мл. Для подавления роста других грамотрицательных микробов необходимы более высокие концентрации. Соединение I в отношении стафилококков и стрептококка несколько (до 3,5 раз) активнее диоксидина, уступая ему или находясь на одном уровне в отношении других тест-микробов.

Поскольку изучаемое соединение оказалось наиболее активным в отношении грамположительных кокков, его действие было испытано на различных штаммах стафилококка и фекального стрептококка. Использовали чувствительные и клинические антибиотикостойчивые штаммы стафилококков. Как видно из табл. 2, соединение I подавляет рост стафилококков в концентрации 4—70 мкг/мл, стрептококка—4—17 мкг/мл. Диоксидин подавляет рост этих культур в концентрации 30—250 мкг/мл и 30—60 мкг/мл соответственно. Высокочувствительные стафилококки, МПК которых составляет 4—8 мкг/мл, выявлены как среди чувствительных (шт. 91), так и антибиотикостойчивых (шт. 4074, 5468) стафилококков. Рост других штаммов, независимо от их устойчивости, соединение I подавляет в концентрации 35—75 мкг/мл. По-видимому, противостафилококковая активность не зависит от антибиотикостойчивости, что ценно, так как на сегодняшний день поиск подобных препаратов актуален. Соединение I к тому же активно в отношении *E. aero-*

Таблица 2. Противококковая активность гидрохлорида этилового эфира N-[β-(п-хлорбензоил)этил-глицил-глицина]

| Соединение  | Минимальная подавляющая рост концентрация, мкг/мл |     |    |     |     |              |     |      |     |      |                      |                                   |           |      |      |         |           |
|-------------|---------------------------------------------------|-----|----|-----|-----|--------------|-----|------|-----|------|----------------------|-----------------------------------|-----------|------|------|---------|-----------|
|             | <i>Staph. aureus</i>                              |     |    |     |     |              |     |      |     |      | <i>Str. faecalis</i> |                                   |           |      |      |         |           |
|             | чувствительные                                    |     |    |     |     | устойчивые к |     |      |     |      |                      |                                   |           |      |      |         |           |
|             |                                                   |     |    |     |     | пенициллину  |     |      |     |      | метицил-<br>лину     | метициллину<br>и оксацил-<br>лину | цефоприду |      |      |         |           |
|             | 4-0                                               | 91  | 99 | 121 | 21п | 1            | 39  | 47-0 | 68п | 129р | 64                   | 5                                 | 4074      | 5469 | 1413 | Вп 0-79 | ATCC 8043 |
| I           | 35                                                | 8   | 35 | 35  | 35  | 35           | 35  | 35   | 35  | 70   | 70                   | 35                                | 1         | 4    | 17   | 4       | 17        |
| Диклоксидин | 120                                               | 120 | 60 | 60  | 120 | 120          | 120 | 250  | 250 | 250  | 120                  | 70                                | 30        | 30   | 60   | 30      | 30        |

*genes*, *Str. faecalis*, *alcaligenes*, *Ps. aeruginosa*, *Bac. megaterium*, *Bac. mesentericus*, вызывающих трудно поддающиеся лечению инфекции.

Итак, опыты *in vitro* показали, что новый аминокетон—производное глицилглицина—характеризуется широким антибактериальным спектром действия, обладая выраженной активностью в отношении грамположительных и некоторых грамотрицательных тест-культур.

Определение острой токсичности показало, что МПД изучаемого соединения составляет 2000 мг/кг.

Результаты изучения лечебного действия соединения I приведены в табл. 3, откуда видно, что оно проявляет противостафилококковую ак-

Таблица 3. Химиотерапевтическое действие соединения I при генерализованной стафилококковой и дизентерийной инфекции

| Микроорганизм               | Соединение |          | Число жи-<br>вотных | Ранжи-<br>ро | Суммарная продолжитель-<br>ность жизни животных |    |        |
|-----------------------------|------------|----------|---------------------|--------------|-------------------------------------------------|----|--------|
|                             |            |          |                     |              | абс.*                                           | %  | p**    |
| Золотистый стафило-<br>кокк | штамм      | I        | 15                  | 7            | 70 150                                          | 40 | <0.001 |
|                             | 4-0        | контроль | 10                  | 11           | 0 10)                                           | 0  |        |
|                             | штамм      | I        | 5                   | 4            | 40 50                                           | 80 | <0.001 |
|                             | Smith      | контроль | 5                   | 0            | 0 50                                            | 0  | —      |
|                             | штамм      | I        | 5                   | 1            | 12 50                                           | 24 | <0.001 |
|                             | 136        | контроль | 5                   | 0            | 0 50                                            | 0  | —      |
| Дизентерийная пт-<br>лочка  | штамм      | I        | 10                  | 5            | 70 100                                          | 50 | <0.001 |
|                             | 121        | контроль | 10                  | 1            | 10 100                                          | 10 | —      |

Примечание: \* числитель—число мыш-дней в данной группе, знаменатель—максимально возможное число мыш-дней при наблюдении в течение 10 суток.

\*\* Вероятность отсутствия различий между опытом и контролем.

тивность; при стопроцентной гибели контрольных животных изучаемое соединение на стафилококковой модели продлевает суммарную продолжительность жизни зараженных животных на 20—80% в зависимости от заражающего штамма. Соединение I обладает лечебным действием и при дизентерийной экспериментальной модели.

Результаты исследований на примере стафилококковой и дизентерийной инфекций белых мышей показали, что соединение I сохраняет антибактериальную активность и в организме животных.

Таким образом, получено новое малотоксичное соединение—гидрохлорид этилового эфира N-(β-(п-хлорбензоил)этил)глицилглицина, которое обладает выраженной антибактериальной активностью.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Агабабян А. Г., Геворкян Г. А., Дургарян Л. К., Власенко Э. В., Агабабян Р. В., Тер-Захарян Ю. З., Тумаджян А. Е., Апоян Н. А., Мнджоян О. Л. Хим.-фарм. журн., 18, 691, 1981.
2. Белянский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. 30, Рига, 1959.

- Поступило 7.VII 1987 г.

528K 577 16 591.8

## С. И. ОГУНЕСЯН, А. Г. БАБАЯН

Извлечена и очищена *β*-оксида Д-аминокислот из плесневых грибов *Aspergillus nidulans* K-3. В очищенном препарате обнаружены два белка, обладающие Д-аминокислотной оксиданной активностью. Пурферменты очищены в 15 и 60 раз, выход составляет 38 и 30% соответственно. Изучены некоторые из физических химических свойств.

Մեկուսացի 4րդ անկման Ասրը, իսկ ուկեր R-3 անբացի էր տարակախի ան-  
շատմի և մարդիկ է ժամանակագրական հարկապար Մարդկան պրեկարատում  
Հայտնաբերվել է D-ամինաթթվների պրոպագանդի անվանումները անվանում  
կո-պրոպագանդեր, Ուսումնասիրվել է զրանց որոշ ֆիզիկա-քիմիական հատկե-  
րվանքները, էլիտ կադմիումի անկման մարդիկ է 65 և 80 անվան, էլիտ համարում  
ստատիստիկա կադմիում է 35 և 30 անվան:

D-amino acid oxidase has been isolated and purified from the cell-free extracts of *Aspergillus niger* R-3, grown on the molasses. The existence of two proteins with D-amino acid oxidase activity has been identified in the purified preparation. Some of their physico-chemical properties have been investigated. The degrees of purification of the isoenzymes are 61 and 60, the yield 38 and 39 per cent, respectively.

Изучение гриба *Aspergillus niger* — источника D-аминокислот.

**Оксидаза D-аминокислот** (КФ 1.4.3.3) — фермент, катализирующий окислительное дезаминирование аминокислот с образованием соответствующей  $\alpha$ -кетокислоты и аммиака. Имеет широкое биологическое распространение, обнаружен как в прокариотических, так и эукариотических органах. Однако физиологическая роль и значение D-аминокислотных оксидаз окончательно не выяснены.

Исследование D-аминокислотных оксидаз представляется актуальным как в связи с решением вопроса о физиологической их роли, так и в прикладном отношении, поскольку его можно применять для разложения D-аминокислот в рацемических смесях с целью получения оптически чистых природных аминокислот.

Цель настоящего исследования заключалась в очистке и исследовании некоторых физико-химических свойств оксидазы D-аминокислот.