ХИМИЯ

УДК 547.572.3

АНТИФАГОВАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЗАМЕЩЕННЫХ КУМАРИНОВ

О.В. Нечаева*, Е.И. Тихомирова, О.П. Плотников, А.Ю. Никишин, О.В. Федотова**

Саратовский государственный университет,
кафедра органической химии
E-mail: decanat@chem.sgu.ru
* Саратовский государственный медицинский университет,
кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии
** Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

Изучены антифаговая и антиоксидантная активности в рядах замещенных кумаринов и синтезированных на основе 4-гидроксикумарина сложнопостроенных трикетонов. Выявлена корреляция *структура–свойство*, влияние выплощения молекулы в отношении бактериофага Т4 – штамма ES Colli B, возможность использования оксикумаринов в качестве сред стабилизации лиофилизированных образцов вакцинного штамма Y Pestis EV НИИ ЭГ.

Antiphage and Antioxidant Activity of the Substituted Coumarins

O.V. Nechaeva*, E.I. Tikhomirova, O.P. Plotnikov, A.Yu. Nikishin, O.V. Fedotova**

The antiphage and antioxidant activity of a substituted coumarin series and synthesized complicated-built triketones, based on 4-hydroxycoumarin, are investigated. *Structure–property* relationship, the influence of the planarity of molecules on the T4 bacteriophage – culture ES Colli B is revealed; an opportunity of use of oxycoumarins as medium of stabilization of dried samples of vaccinal culture Y Pestis EV NII EG.

В настоящее время возрастает интерес к исследованиям природы процессов свободнорадикального окисления в клетках, их роли в функционировании биологических систем и механизмах защиты от воздействия данных процессов. Известно, что ингибиторами свободных радикалов в эукариотических и прокариотических клетках являются антиоксиданты – вещества различной химической природы, способные тормозить процесс свободнорадикального окисления органических биомолекул. В клетках антиокислительной активностью обладает ряд ферментов (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза и др.). Действие антиоксидантов приводит к снижению выхода токсических продуктов окисления (гидроперекиси, спирты, альдегиды, кетоны и т.п.) и восстановлению нормальной жизнедеятельности клетки [1–3].

В последние годы появилось большое количество синтетических антиоксидантов, которые по химической структуре относятся к различным типам гетероциклических соединений. Несмотря на многочисленные классификации, их можно объединить в три класса [4]:

1) ингибиторы, обрывающие цепи в реакции с перекисными радикалами, – фенолы, ароматические амины, аминофенолы и др.;

2) ингибиторы, обрывающие цепи в реакции с алкильными радикалами, – хиноны, нитроксильные радикалы;

3) ингибиторы, разрушающие гидроперекись, – сульфиды, дисульфиды и др.

© О.В. Нечаева, Е.И. Тихомирова, О.П. Плотников, А.Ю. Никишин, О.В. Федотова, 2007

НАУЧНЫЙ ОТДЕЛ

При этом многие соединения с высокой антиоксидантной активностью характеризуются выраженной биологической агрессией [5, 6]. В плане практического применения наиболее перспективными являются вещества с высокой антиоксидантной активностью, но с низкой биологической агрессией. К таким веществам относятся кислородсодержащие гетероциклические соединения, в том числе замещенные, – кумарины. В этой связи представляло интерес установить корреляцию между антифаговой и антиоксидантной активностями и особенностями химической структуры кумаринов и конденсированных систем, полученных на их основе.

Биологическое тестирование с целью выявления наличия или отсутствия биологической агрессии исследуемых веществ проводили в системе «бактериофага Т4 – штамм *Escherichia coli* B» [7]. Уровень биологической агрессии (БА) различных соединений оценивали как $БА^+$ (выживаемость фага стремится к нулю) и $БА^-$ (выживаемость фага стремится к 100%). При этом учитывалось, что тестируемые препараты делятся на 4 группы: обладающие токсичным действием, если выживаемость фага составляет 0,001–0,1%; инактивирующим действием – выживаемость фага 0,1–10%; ингибирующим действием – выживаемость фага 10–90%; индифферентным действием – выживаемость фага 90–100%.

Антиоксидантную активность синтезированных соединений определяли на хемилюминометре в системе свободнорадикального окисления, инициированного перекисью водорода в растворе нормальной лошадиной сыворотки [8]. Данный метод основан на генерации перекисных радикалов, полученных добавлением к сыворотке крови перекиси водорода. Образующийся при разложении перекиси водорода кислород вступает в реакцию со свободными радикалами биологических молекул с выходом пероксидрадикалов, в результате рекомбинации которых «высвечиваются» кванты света. Добавление антиоксиданта снижает концентрацию свободных радикалов, вследствие чего наблюдается резкое снижение уровня люминесценции. Антиоксидантную активность вычисляли по формуле

$$a_{AO} = A / \sum (B_t/6),$$

где A – уровень свечения при добавлении перекиси; B_t – уровень свечения после добавления антиоксиданта, $t = 1–6$ мин.

Активность оценивается как слабая при $a_{AO} << 1$, умеренная при a_{AO} – 1,0–1,8; хорошая при a_{AO} – 1,8–2,0; сильная при a_{AO} – 2,0–2,8.

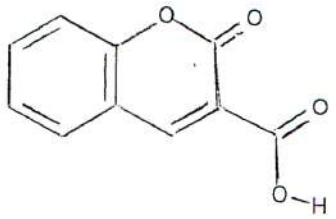
Определение антифаговой активности исследуемых замещенных кумаринов показало, что они обладали в основном слабоингибирующими свойствами. Установлено также, что эти свойства изменялись в зависимости от положения различных радикалов в структуре соединений. Полученные результаты исследований представлены в таблице.

Антифаговая и антиоксидантная активности исследуемых гетероциклических соединений

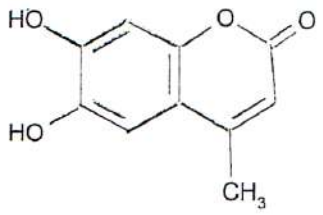
№ п/п	Название соединения	*E. coli* B + (T4+AO), БОЕ/мл × 10^9 (M ± m)	Выживаемость бактериофага, % (M ± m)	Уровень фонового свечения с AO, mV (M ± m)	Антиоксидантная активность, у.е. (M ± m)
1	4-метил-6-аминокумарин	16,5 ± 1,34	66,0 ± 3,4*	3495 ± 335*	0,86 ± 0,03
2	6,7-диоксикумарин	20,5 ± 1,9	82,0 ± 3,8*	5159 ± 441*	0,26 ± 0,04
3	Карбоксикумарин	0	0	н.о.	н.о.
4	Ацетамидо-кумарин	13,7 ± 1,6	55,0 ± 1,2*	2241 ± 254*	1,90 ± 0,06
5	4-метил-7-оксикумарин	10,2 ± 0,89	41,0 ± 1,9*	н.о.	н.о.
6	4-метил-7,8-диоксикумарин	14,7 ± 0,76	59,0 ± 3,9*	н.о.	н.о.
7	4-метил-6,7-диоксикумарин	27,0 ± 1,8	108,0 ± 5,04*	2778 ± 238*	1,34 ± 0,04
8	4-метил-6-оксикумарин	15,5 ± 1,72	62,0 ± 2,5*	н.о.	н.о.
9	3-[6-оксо(1)бензо-пирано[4,3-в]-(1)-10-гидроксибензопиран-7-ил]-4-гидроксикумарин	18,4 ± 0,9	38,0 ± 2,4*	н.о.	н.о.
10	3-(2-гидроксибензоил)-2-хроменон	22,7 ± 1,64	12,0 ± 1,7*	н.о.	н.о.

Примечание: н.о. – не определяли; * – наличие достоверности при уровне значимости P < 0,05 по отношению к контролю.

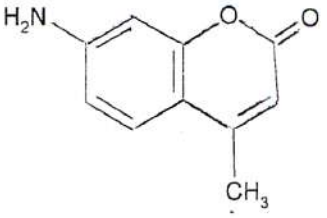
Так, 6-оксикумарин характеризовался более низкой биологической агрессией в отличие от своего изомера с оксигруппой в положении 7. Резко возрастала выживаемость бактериофага Т4 при введении в состав кумаринов двух оксигрупп, причем 6,7-диоксикумарин обладал более низкой биологической агрессией, чем 7,8-диоксикумарин. Таким образом, в наибольшей степени на инактивирование антифаговой активности оказывают влияние оксигруппы, находящиеся в непосредственной близости в положениях 6, 7 (рисунок, *б* и *з*). Метилирование пиранового цикла кумарина в положении 4 в целом сопровождается существенным ослаблением антифаговой активности испытуемых соединений. К усилению этого эффекта также приводит и включение электронодонорных заместителей в положения 6, 7, 8.



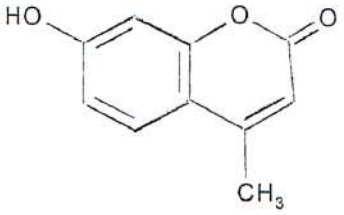
а – карбоксикумарин



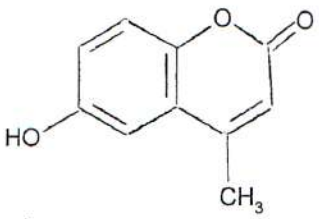
б – 4-метил-6,7-диоксикумарин



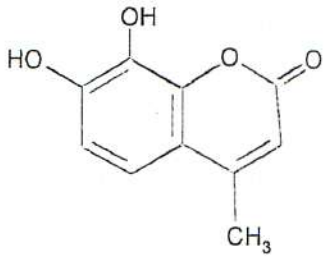
в – 4-метилметил-6-амино-кумарин



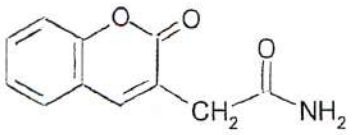
г – 4-метил-7-оксикумарин



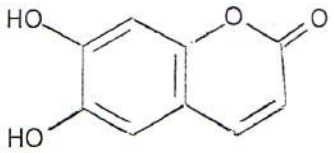
д – 4-метил-6-оксикумарин



е – 4-метил-7,8-диоксикумарин



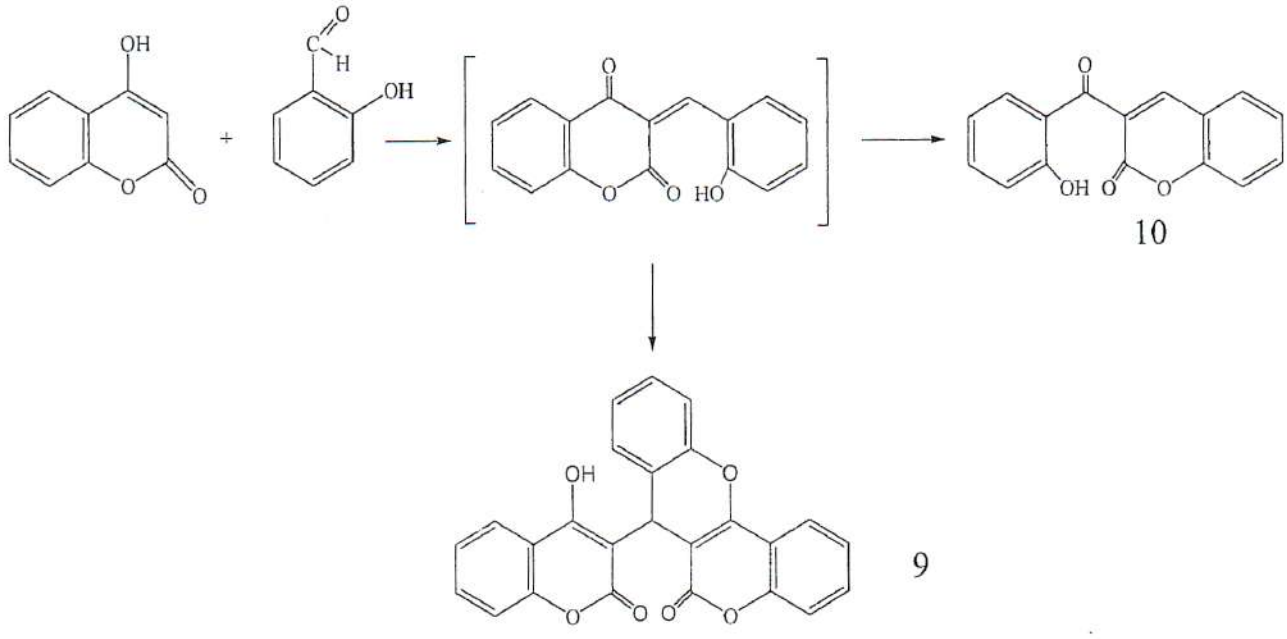
ж – ацетамидокумарин



з – 6,7-диоксикумарин

Структурные формулы производных кумарина

Наиболее выраженным антифаговым действием обладали: карбоксикумарин, так как показатель выживаемости фага был равен 0 (введение в состав кумаринов карбоксильной группы приводит к возникновению токсических свойств соединения) и оксосоединения 9, 10, синтезированные конденсацией 4-оксикумарина с салициловым альдегидом по следующей схеме:



Установлено, что 6,7-диоксикумарин обладал низкой АО-активностью. При введении в состав соединения метильного радикала АО-активность возрастала ≈ в 6 раз. Наличие в составе кумарина ацетамидогруппы также резко повышало АО-свойства кислородсодержащих гетероциклов.

Анализ полученных результатов показал, что антифаговая и антиоксидантная активности кислородсодержащих гетероциклических соединений определяется не только наличием гетерофрагмента основного кольца, но и замещающих радикалов.

Механизм ингибирующего действия исследованных производных кумарина, структурные формулы которых представлены на рисунке, можно объяснить следующим образом. Наибольшую ингибирующую активность проявляют молекулы, содержащие сопряженные заместители в гетероциклическом фрагменте, например, карбоксикумарин (рисунок, *а*), оксосоединение 3-(2-гидроксибензоил)-2-хроменон и в значительной степени выплощенные ангулярные системы, как это наблюдается в трикетоне кумаринового ряда – (3 - [6 - оксо(1)бензопирано - [4,3-в] - (1) - 10 - гидроксибензопиран - 7 - ил] - 4 - гидроксикумарине (9). Повышение сопряженности приводит к повышению липофильности и соответственно общей активности соединения. Этот эффект отмечен H. Yuan, A. Parrill [9] у 3-[6-оксо(1) бензопирано-[4,3 - в]-(1)-10-гидроксибензопиран-7-ил]-4-гидроксикумарина (9), который является ингибитором ВИЧ-1 интегразы и систем, имеющих два (и более) совмещённых арильных блока, отличающихся высокой симметрией.

Обнаруженная взаимосвязь структуры изучаемых кумаринов с антифаговой активностью позволяет предположить, что их ингибирующее и инактивирующее действие обусловлено способностью молекул к стекинг-взаимодействиям с ДНК бактериофага Т4 не только благодаря плоской структуре кумаринового ядра, но и возможности стабилизации стекинг-структур водородными связями электронодонорных заместителей.

Ранее было установлено, что некоторые синтетические антиоксиданты оказывают выраженное защитное действие при консервации микроорганизмов [10–12]. Поэтому на следующем этапе исследования была проведена оценка положительного влияния кислородсодержащих гетероциклических соединений ряда кумаринов на сохранение бактериальных клеток при лиофильном высушивании. В качестве объекта исследований был использован вакцинный штамм *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, для которого в состав сред консервирования добавляли кумарины. Было проведено два цикла лиофилизации, по которым рассчитывали превышение срока хране-

ния над контролем по общепринятой методике [13]. Из полученных результатов следует, что, например, при введении ацетамидокумарина в состав среды стабилизации сроки хранения лиофилизированных образцов вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ увеличивались в 3,9 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, была изучена антифаговая и антиоксидантная активности в рядах замещенных кумаринов и синтезированных на основе 4-гидроксикумарина сложнопостроенных трикетонов. Выявлена корреляция *структура–свойства* и влияние выплощения молекулы в отношении состояния системы *бактериофаг Т4 – штамм E. coli B*. Показана возможность использования оксикумаринов в качестве добавок в среды стабилизации при лиофилизации бактерий.

Проведенные исследования позволяют заключить, что сложнопостроенные кумарины с выраженной антифаговой активностью являются перспективными противовирусными препаратами, в том числе и в отношении ВИЧ-1. Соединения с антиоксидантной активностью могут быть рекомендованы для практического использования в микробиологической, медицинской и ветеринарной практике для повышения жизнеспособности и стабилизации свойств микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 06-03-32667а).

Библиографический список

1. *Куликов О.А., Дробков В.И., Дармов И.В., Смирнов Е.В.* Супероксиддисмутазы чумного микроба // Вестн. РАМН. 1995. №5. С.45–49.

2. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Шергин С.М.* Биохимия окислительного стресса. Оксиданты и антиоксиданты. Новосибирск, 1994. 203 с.

3. *Победимский Д.Г., Винаров А.Ю., Решетник О.А.* Влияние антиоксидантов на получение микробной биомассы // Acta Biotechnol. 1988. V.8, №1. P.55–69.

4. *Бакуев М.М., Саидов М.З., Бутаков А.А.* Особенности секреции миелопероксидазы и хемилюминесцентного ответа нейтрофилов человека при контакте со стимуляторами различной природы // Иммунология. 1991. №1. С.15–17.

5. *Новикова (Нечаева) О.В., Виноградова Н.А., Плотников О.П.* Биологическая активность гетероциклических соединений // Материалы XXVI межвуз. науч.-практ. конф. по проблемам биологии и медицинской паразитологии, посвящ. памяти акад. Е.Н. Павловского. СПб., 1999. С.83–84.

6. *Новикова (Нечаева) О.В., Григорьев А.В., Виноградова Н.А. и др.* Применение синтетических антиоксидантов циклического ряда при консервации бактериальных штаммов методом лиофилизации // Изв. Сарат. ун-та. Сер. биологическая. Саратов. 2001. С.148–154.

7. *Фонштейн Л.М., Сурайкина Т.И., Таль Е.К.* Действие солей палладия и платины на бактериофаг Т4 и его изолированную ДНК // Генетика. 1975. Т.11, №7. С.128–133.

8. *Архипова О.Т.* Определение хемилюминесценции в сыворотке крови // Методы исследования в профпатологии. М., 1988. 32 с.

9. *Yuan H., Parril A.* Qsar statis of HIV-1 interase inhibition // Bioorg. and Med. Chem. 2002. №10(12). P.4169–4183.

10. *Липатова Е.В., Сотников А.А., Федотова О.В.* Синтез и реакционная способность биологически активных карбонилзамещенных спирогидропиранов и их N-гетероаналогов // Органическая химия. СПб., 1995. С.225–226.

11. *Плотников О.П., Шведун Г.П., Гусева И.В.* Влияние целлюлозы микрокристаллической, декстрана, ДЭАЭ-целлюлозы и антиоксидантов (феноксана, анфена) на жизнеспособность клеток при лиофилизации *Y. pestis EV* НИИЭГ // Проблемы особо опасных инфекций. 1993. №1–2. С.87–96.

12. *Смирнова Н.С., Плотников О.П., Виноградова Н.А.* Синтез и биологическая активность 7-аза-8-(оксо-бицикло-4.3.0-нонадиенов-6.9) // Хим.-фарм. журн. 1995. №1. С.44–46.

13. Методика определения термостабильности живых сухих вакцин и прогнозирование их жизнеспособности в процессе хранения: Метод. рекомендации. Ставрополь, 1985. 10 с.

УДК 547.594.3

КАРБОНИЛЗАМЕЩЕННЫЕ ГИДРОКСИЦИКЛОГЕКСАНОНЫ В РЕАКЦИЯХ С АЗОТСОДЕРЖАЩИМИ ПОЛИНУКЛЕОФИЛЬНЫМИ РЕАГЕНТАМИ

О.А. Щелочкова, Н.В. Поплевина, В.Е. Субботин, А.П. Кривенько

Саратовский государственный университет,
кафедра органической и биоорганической химии
E-mail: Krivenko@info.sgu.ru

Обобщены результаты исследования реакционной способности карбонилзамещенных гидроксициклогексанонов с азотсодержащими полинуклеофильными реагентами ароматического, алифатического, алициклического рядов. Показано, что в зависимости от природы реагента и условий реакции образуются продукты аминирования по наиболее активной алициклической карбонильной группе одной либо двух молекул субстрата, продукты енаминного строения или гетероциклизации.

© О.А. Щелочкова, Н.В. Поплевина, В.Е. Субботин, А.П. Кривенько, 2007