

© Коллектив авторов, 2014

С. С. Зыкова¹, Т. Ф. Одегова², С. В. Бойчук³, А. Р. Галембикова³

СИНТЕЗ И ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ 3-ЗАМЕЩЕННЫХ 3-ГИДРОКСИ-6-ФЕНИЛ-3,4-ДИГИДРО-2*H*-1,3-ОКСАЗИНОВ

¹ ФКОУ ВПО "Пермский институт ФСИН России", Пермь, Россия

² ФГБОУ ВПО "Пермская государственная фармацевтическая академия", Пермь, Россия

³ ФГБОУ ВПО "Казанский государственный медицинский университет", Казань, Россия

Реакция 1,6-диарила-3,4-дигидрокси-2,4-гексадиен-1,6-диона с арилиденариламинами приводит к образованию 3-замещенных-3-гидрокси-6-фенил-3,4-дигидро-2*H*-1,3-оксазинов. Изучены антиоксидантная, острая токсичность синтезированных соединений, а также их цитотоксические свойства *in vitro*. Наибольшей антиоксидантной активностью обладают (2*Z*)-3-гидрокси-3-[4-гидрокси-3-(4-метоксифенил)-2-(4-метилфенил)-6-фенил-3,4-дигидро-2*H*-1,3-оксазин-4-ил]-1-фенилпроп-2-ен-1-он и (2*Z*)-3-гидрокси-3-[4-гидрокси-2-(4-метилфенил)-2-(4-метилфенил-3,6-дифенил-3,4-дигидро-2*H*-1,3-оксазин-4-ил)-1-фенилпроп-2-ен-1-он. Данные соединения не обладают цитотоксическими свойствами *in vitro*.

Ключевые слова: 3-замещенные 3-гидрокси-6-фенил-3,4-дигидро-2*H*-1,3-оксазины; антиоксидантная активность; антирадикальная активность;ДФПГ; цитостатическая активность; МТТ-тест.

Источником для большого числа биологически активных гетероциклов являются реакции 1,3,4,6-тетракарбонильных систем с различными нуклеофильными агентами [1 – 3]. Среди тетракарбониллов особый интерес представляет 1,6-диарил-3,4-дигидрокси-2,4-гексадиен-1,6-дион, структура которого имеет сходство с природными поликарбонилами — халконами, которые обладают противовоспалительной, антиоксидантной, цитостатической и противоопухолевой активностью. Примерами таких соединений являются выделенный из растения *Jatropha gossypifolia* ятрофон, способный связывать сульфгидрильные группы, а также эремантолиды, обнаруженные в растениях рода *Centaurea* [4].

С целью синтеза биологически активных соединений нами изучена реакция 1,6-диарил-3,4-дигидрокси-2,4-гексадиен-1,6-диона с арилиденариламинами (основаниями Шиффа) в среде протофильных растворителей. Исследованы цитотоксические свойства и антиоксидантная активность синтезированных соединений *in vitro*, а также их острая токсичность.

Экспериментальная химическая часть

Исходный 1,6-дифенил-3,4-дигидрокси-2,4-гексадиен-1,6-дион (I) получают известной конденсацией Кляйзена. Квантово-химические расчеты указывают на то, что более устойчивой является таутомерная форма кетала 1,6-диарил-3,4-дигидрокси-2,4-гексадиен-1,6-диона Iz [5].

Нами исследовано взаимодействие 1,6-диарил-3,4-дигидрокси-2,4-гексадиен-1,6-диона (Iх, Iу, Iz) с арилиденариламинами, которое приводит к 3-замещен-

ным 3-гидрокси-6-фенил-3,4-дигидро-2*H*-1,3-оксазином (IIа – е) (схема).

Синтезированные соединения получены с удовлетворительными выходами и представляют собой большей частью кристаллические порошки желтого цвета, растворимые в диметилформамиде (ДМФА), диметилсульфоксиде (ДМСО), бензоле, толуоле, трудно растворимые в этаноле, не растворимые в воде.

В ИК-спектрах соединений оксазинов присутствует полоса валентных колебаний связи (СН=, С(4)–ОН) в области 3050 – 3080 см⁻¹, а также полоса ОН-хелатного цикла при 1580 – 1620 см⁻¹. Смещение частот кетонного карбонила и гидроксильной группы обусловлено образованием внутримолекулярной водородной связи типа –С=О...Н–О– в ОН-хелатном цикле. В спектрах ЯМР ¹Н замещенных оксазинов II присутствуют синглет 2 протонов метиленовой группы кето-формы IIх (3,99 – 4,22 м.д.), синглеты протонов С²Н (5,84 – 6,47 м.д.) и С⁵Н (6,57 – 7,14 м.д.). Сигналы протонов С⁵Н находятся в области сигналов ароматических колец.

Масс-спектры соединений не содержат пика молекулярного иона, имеются пики осколочных ионов оксазинового цикла и пик бензоилацетильного фрагмента, что свидетельствует в пользу предложенной структуры.

Экспериментальная химическая часть

¹Н ЯМР спектры получены на приборе Bruker AC-300 (300 МГц) в растворах дейтерохлороформа и ДМСО-d₆, внутренний стандарт — ГМДС. ИК-спек-

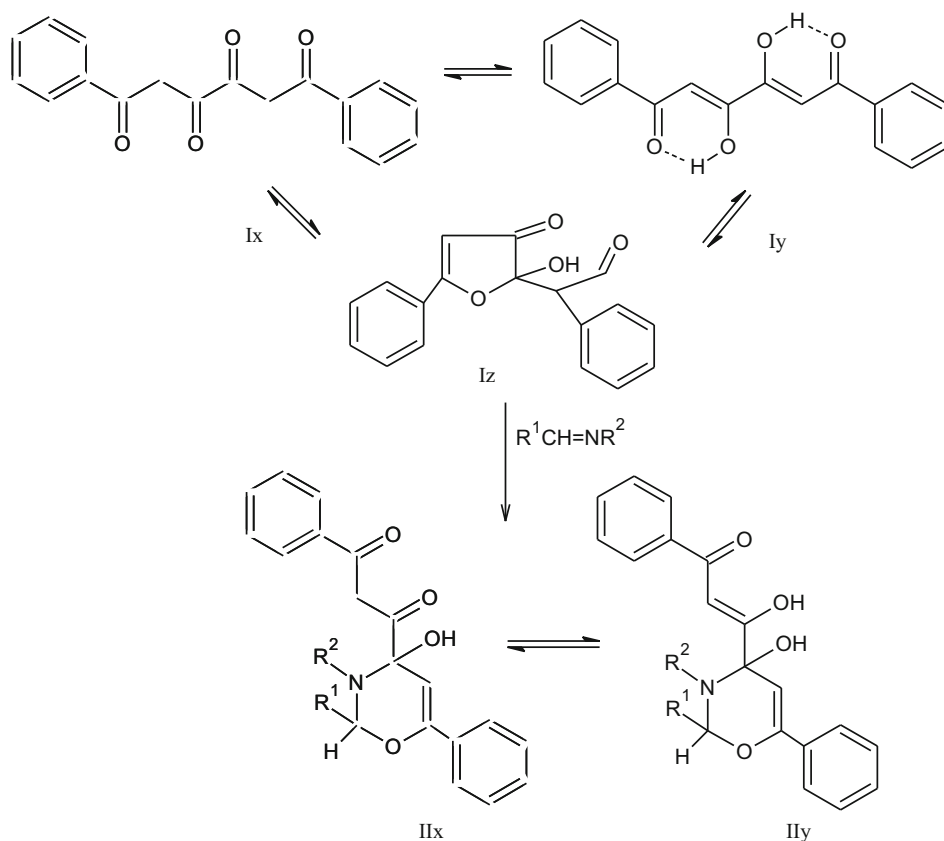


Схема. Синтез 3-замещенных 3-гидрокси-6-фенил-3,4-дигидро-2H-1,3-оксазинов (IIa – e).

тры в калия бромиде сняты на приборе на ИК-Фурье спектрометре Bruker Alpha. Масс-спектры записаны на приборе Agilent Technologies 6890N/5975B, колонка: HP-5ms, 30 м × 0,25 мм, 0,25 мкм, газ-носитель — гелий (1 мл/мин), ионизация электронным ударом (70 эВ). Индивидуальность и чистота всех полученных соединений подтверждена с помощью метода ТСХ на пластинках Silufol UV-254® в системе бензол – эфир – ацетон (10:9:1), детектирование проводили в камере, насыщенной парами йода.

6-Фенил-4-бензоилацетил-4-гидрокси-5,6-дигидро-2,3-дифенил-1,3-оксазин (IIa). К 30 мл этанола, содержащего 0,88 г (3 ммоль) диона I, добавляют 0,54 г (3 ммоль) N-(бензилиден)анилина. Нагревают в течение 2 ч. Оставляют при комнатной температуре на 5 – 6 ч. Полученный осадок промывают гексаном, высушивают, перекристаллизовывают из бензола.

(2Z)-3-Гидрокси-3-[4-гидрокси-2-(4-метилфенил)-3,6-дифенил-3,4-дигидро-2H-1,3-оксазин-4-ил]-1-фенилпроп-2-ен-1-он (IIб). К 30 мл этанола, содержащего 0,88 г (3 ммоль) диона I, добавляют эквимолекулярное количество 0,63 г (3 ммоль) соответствующего основания Шиффа. Нагревают в течение 2 ч. Оставляют при комнатной температуре на 5 – 6 ч. Полученный осадок промывают гексаном, высушивают, перекристаллизовывают из бензола.

(2Z)-3-Гидрокси-3-[4-гидрокси-3-(4-метоксифенил)-2-(4-метилфенил)-6-фенил-3,4-дигидро-2H-1,3-оксазин-4-ил]-1-фенилпроп-2-ен-1-он (IIв). К 30 мл этанола, содержащего 0,88 г (3 ммоль) диона I, добав-

ляют эквимолекулярное количество 0,68 г (3 ммоль) соответствующего основания Шиффа. Нагревают в течение 2 ч. Оставляют при комнатной температуре на 5 – 6 ч. Полученный осадок промывают гексаном, высушивают, перекристаллизовывают из бензола.

(2Z)-3-Гидрокси-3-[4-гидрокси-2,3-бис(4-нитрофенил)-6-фенил-3,4-дигидро-2H-1,3-оксазин-4-ил]-1-фенилпроп-2-ен-1-он (IIг). К 30 мл этанола, содержащего 0,88 г (3 ммоль) диона I, добавляют эквимолекулярное количество 0,68 г (3 ммоль) соответствующего основания Шиффа. Нагревают в течение 2 ч. Оставляют при комнатной температуре на 5 – 6 ч. Полученный осадок промывают гексаном, высушивают, перекристаллизовывают из бензола.

Замещенные оксазины II получены с препаративными выходами, физико-химические константы некоторых соединений приведены в табл. 1.

Спектральные характеристики полученных соединений приведены в табл. 2.

Экспериментальная биологическая часть

Антиоксидантную активность изучали на штамме бактерий *Escherichia coli* BW 25113, выращенных на жидкой питательной среде M-9 в лаборатории изучения физиологии микроорганизмов в Институте экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН (Пермский филиал). Для исследования антиоксидантной активности использована оценка влияния синтезированных оксазинов на устойчивость клеток

бактерий *Escherichia coli* штамм BW 25113 к бактериостатическому действию раствора пероксида водорода H_2O_2 по методике, ранее эффективно использованной для доказательства антиоксидантной активности экстрактов растений [6].

Бактерии *E. coli* штамм BW 25113 выращивали аэробно на минимальной среде М9 с добавлением глюкозы. После центрифугирования клетки из конечной культуры ресуспендировали в 100 мл свежей среды до показателя оптической плотности при длине волны 600 нм от 0,1 – 0,15 и далее выращивали при 37 °С в колбах объемом 250 мл при перемешивании с частотой вращения 150 об/мин. За ростом бактерий следили по изменению величины оптической плотности, измеряемой на фотометре КФК-3 (толщина кюветы 5 мм). В середине логарифмической фазы роста клетки центрифугировали и затем ресуспендировали в 4 мл среды М-9. По 100 мкл клеточной суспензии (до конечной оптической плотности 0,1) вносили в пробирки, содержащие 5 мл среды и 50 мкл веществ, взятых в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М, и инкубировали в пробирках при перемешивании и температуре 37 °С до достижения значения оптической плотности 0,2. Затем клетки бактерий подвергали действию H_2O_2 (3 мМ) и инкубировали ещё в течение 30 мин. Удельную скорость роста рассчитывали по уравнению:

$$\mu = \ln(N/N_0)/t,$$

где μ — удельная скорость роста, $ч^{-1}$, N и N_0 — значения оптической плотности в начальный и t момент времени соответственно.

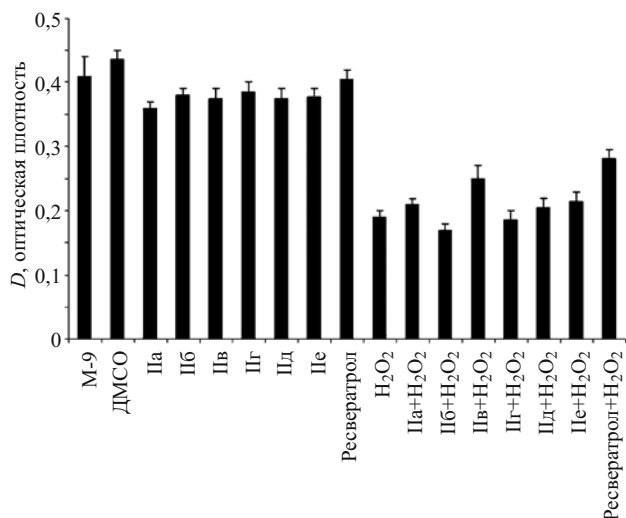


Рис. 1. Удельная скорость роста *E. coli* BW 25113 за 1 ч.

В качестве стандарта антиоксидантной активности использовали субстанцию ресвератрола, который соответствовал эквимольной концентрации исследуемых оксазинов ($1 \cdot 10^{-5}$ М).

Данная методика является универсальной, поскольку предполагается, что синтезированные соединения могут влиять на антиоксидантную систему бактерий [7].

Характер роста микроорганизмов в присутствии веществ и среды М-9, а также в присутствии раствора пероксида водорода в концентрации 3 мМ представлен на рис. 1.

Показатель удельной скорости роста бактерий в присутствии соединений Па, Пв, Пд и Пе рассчитан по

Таблица 1
Физико-химические константы и выходы 3-замещенных 3-гидрокси-6-фенил-3,4-дигидро-2H-1,3-оксазинов (Па – е)

Соединение	R ¹	R ²	Выход, %	Т. пл., °С	Брутто-формула
Па	C ₆ H ₅	C ₆ H ₅	83	170 – 171	C ₃₁ H ₂₇ NO ₄
Пб	<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄	C ₆ H ₅	67	189 – 190	C ₃₂ H ₂₉ NO ₄
Пв	<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄	<i>p</i> -CH ₃ OC ₆ H ₄	61	162 – 163	C ₃₃ H ₃₁ NO ₅
Пг	<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	<i>p</i> -NO ₂ C ₆ H ₄	59	205 – 206	C ₃₁ H ₂₅ N ₃ O ₈
Пд	<i>p</i> -CH ₃ C ₆ H ₄	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	72	189 – 190	C ₃₂ H ₂₉ BrNO ₄
Пе	<i>p</i> -CH ₃ OC ₆ H ₄	<i>p</i> -BrC ₆ H ₄	64	202 – 203	C ₃₂ H ₂₉ BrNO ₅

Таблица 2
Спектральные характеристики 3-замещенных 3-гидрокси-6-фенил-3,4-дигидро-2H-1,3-оксазинов

Соединение	ЯМР ¹ Н, ДМСО-d ₆ , δ, м.д.
Па	4,22 (с, 2H, CH ₂ , Пх), 5,98 (с, 1H, CH, Пх), 6,46 (с, 1H, CH, Пу), 6,62с (с, 1H, CH, Пу), 6,88 – 8,28 м (м, 20H, 4C ₆ H ₅)
Пб	2,18 (с, 3H, CH ₃), 3,35 (с, 3H, CH ₃), 4,11 (с, 2H, CH ₂), 5,82 (с, 1H, CH), 6,06 (с, 1H, C ² H), 6,65 (с, 1H, C ⁵ H), 8,02 – 8,16 (м, 18H, 2C ₆ H ₅ , 2C ₆ H ₄)
Пв	2,45 (с, 3H, CH ₃), 3,52 (с, 3H, OCH ₃), 6,15 (с, 1H, CH, Пх), 6,45 (с, 1H, CH, Пу), 6,60 (с, 1H, CH, Пу), 6,92 – 8,02 (м, 18H, 2C ₆ H ₅ , 2C ₆ H ₄)
Пг	4,20 (с, 2H, CH ₂ , Пх), 5,88 (с, 1H, CH, Пх), 6,40 (с, 1H, CH, Пу), 6,64 (с, 1H, CH, Пу), 6,90 – 8,24 (м, 18H, 2C ₆ H ₅ , 2C ₆ H ₄)
Пд	2,18 (с, 3H, CH ₃ , Пх, 65%), 2,37 (с, 3H, CH ₃ , Пу, 35%), 4,07 (с, 2H, CH ₂ , Пх), 5,99 (с, 1H, CH, Пх), 6,47 (с, 1H, CH, Пу), 6,66 (с, 1H, CH, Пх), 6,84 – 7,90 (м, 18H, 2C ₆ H ₄ , 2C ₆ H ₅ , Пх и Пу), 8,72 (уш. с., 1H, C ⁴ OH, Пх и Пу)
Пе	3,54 (с, 3H, OCH ₃ , Пх, 63%), 3,69 (с, 3H, OCH ₃ , Пу, 37%), 4,17 (с, 2H, CH ₂ , Пх), 5,90 (с, 1H, CH, Пх), 6,40 (с, 1H, CH, Пх), 6,56 (с, 2H, CH ₂ , Пх), 6,87 – 8,21 (м, 18H, 2C ₆ H ₄ , 2C ₆ H ₅ , Пх и Пу), 8,70 (уш. с., 1H, C ⁴ OH, Пх и Пу)

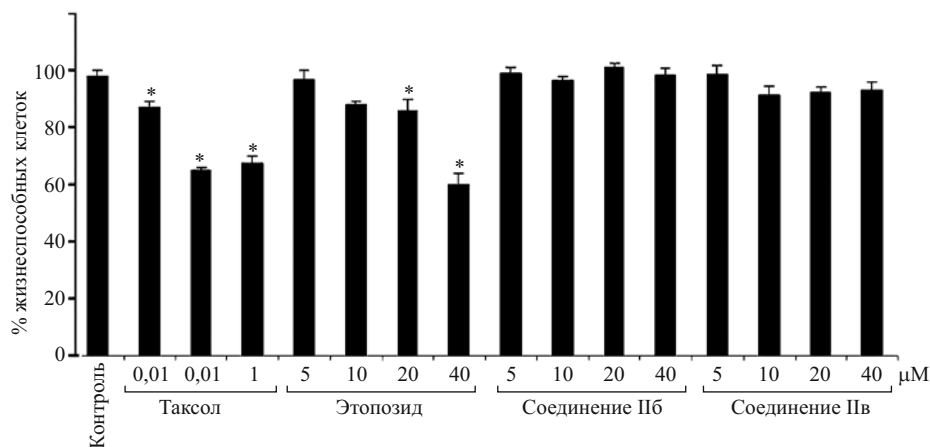


Рис. 2. Количество жизнеспособных клеток линии U2OS (в %) после их инкубации с цитотоксическими препаратами (таксол и этопозид), а также оксазинами (соединение Пб и Пв) в течение 48 ч (* $p < 0,05$).

t -критерию Стьюдента при $p < 0,05$ в сравнении с контролем и является статистически значимым.

Удельная скорость роста бактерий за 1 ч позволяет оценить протективное антиоксидантное действие синтезированных соединений на бактерии кишечной палочки. Показатель удельной скорости роста позволяет оценить вклад соединений в создании устойчивости бактерий к пероксиду водорода.

Для определения антирадикальной активности использовали реакцию со стабильным свободным радикалом дифенилпикрилгидразилом (ДФПГ) (Sigma-Aldrich). Концентрация ДФПГ в 95 % этаноле составила $6,5 \cdot 10^{-5}$ М. В качестве эталона сравнения использовался тролокс (производство Sigma-Aldrich) [8].

Реакционная смесь, которая состоит из 3 мл 0,3 мМ раствора ДФПГ, 1 мл буферного раствора ТРИС-НСI с $pH = 7,4$ и $1 \cdot 10^{-5}$ М веществ или тролокса, растворенных в ДМСО, инкубируется при стандартных температурных условиях ($T = 293$ К) в течение 30 мин. Затем при длине волны 517 нм в кюветах с толщиной слоя 0,5 см определяют оптическую плотность реакционной смеси на фотоэлектроколориметре КФК-3-01. Ингибирующий эффект представляет собой убыль радикалов ДФПГ (Q), которую рассчитывают по формуле:

$$Q = 100(D_0 - D_x)/D_0,$$

Таблица 3
Антирадикальная активность 3-замещенных 3-гидрокси-6-фенил-3,4-дигидро-2H-1,3-оксазинов

Соединение	Убыль радикалов Q , %
Па	$22,34 \pm 3,18^*$
Пб	$50,06 \pm 0,53$
Пв	$57,19 \pm 2,25^*$
Пг	$26,80 \pm 3,02$
Пд	$31,61 \pm 3,80^*$
Пе	$34,99 \pm 2,67^*$
Тролокс	$80,12 \pm 2,93^*$

* $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

где D_0 — оптическая плотность контрольного раствора ДФПГ, D_x — оптическая плотность раствора ДФПГ в присутствии исследуемого вещества, либо раствора эталона сравнения. Полученные результаты обрабатывали по стандартной методике с использованием t -критерия Стьюдента (доверительная вероятность составляла 0,95). Каждый результат (табл. 3) представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

С целью дальнейшего изучения биологической активности синтезированных оксазинов исследована их острая токсичность. Тест острой токсичности проводили на беспородных белых мышах массой 18–20 г при однократном введении исследуемых соединений внутривенно. Каждую дозу соединений испытывали одновременно на 8 животных. Соединения вводили в виде взвеси 2 % крахмальной слизи из расчета 0,1 мл на 10 г веса в концентрации исследуемых соединений 1500 мг/кг. Все животные находились в стандартных условиях вивария под наблюдением в течение 10 сут. В течение этого времени регистрировали внешний вид, поведение и гибель животных. В течение 10 дней все животные остались живы, физиологическое состояние — без видимых изменений. Статистическую обработку данных проводили по методу Литчфилда-Уилкоксона при $p = 0,05$.

Исследования острой токсичности показали, что синтезированные оксазины являются малотоксичными (4 класс) [9], LD_{50} составляет более 1500 мг/кг.

Изучение цитотоксических свойств *in vitro* для некоторых из описанных выше соединений проводили методом спектрофотометрии (Multiscan, Thermo Scientific) с использованием общепринятого МТТ-теста, основанного на способности клеточных трансфераз восстанавливать бесцветный водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) в формазан. В качестве объекта для исследования цитотоксических свойств соединений были выбраны нормальные фибробласты человека линии ВJ, а также опухолевые клетки линии U2OS (остеосаркома), которые культивировали в 96-луноч-

ных плоскодонных культуральных планшетах (Costar, USA) в полной культуральной среде DMEM с добавлением антибиотиков (пенициллин-стрептомицин), L-глутамина (все реагенты Gibco, Invitrogen) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone). Клетки инкубировали с вышеуказанными соединениями в течение 48 ч. В качестве положительного контроля использовали противоопухолевые препараты таксол (Sigma) и этопозид (CalbioChem).

Показано отсутствие цитотоксичности у исследованных нами 6-арил-4-бензоилацетил-4Н-1,3-оксазинов (соединения IIб и в) в отношении как нормальных, так и опухолевых клеток человека (рис. 2).

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показывают, что 3-замещенные 3-гидрокси-6-фенил-3,4-дигидро-2Н-1,3-оксазины обладают антиоксидантной (IIв) и прооксидантной (IIб) активностью в тесте определения устойчивости бактерий к действию пероксида водорода.

Антирадикальная активность замещенных оксазинов II наиболее выражена у оксазина IIб и IIв. Данные соединения являются малотоксичными (4 класс) и не обладают цитотоксическими свойствами *in vitro* по от-

ношению как к нормальным, так и опухолевым клеткам человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Л. Пидэмский, Р. Р. Махмудов, *Скрининг и изучение механизма действия флоголитиков, нейротропных и противомикробных тел*, Перм. ун-т, Пермь (2008), 116 с.
2. Ю. С. Андрейчиков, Ю. В. Ионов, Л. Н. Карпова и др., *Химия биологически активных азотистых гетероциклов. Сб. материалов*, Черноголовка (1990), с. 6.
3. С. С. Ширинкина, Н. М. Игидов, В. О. Козьминых, *Мат. юбил. межвуз. научно-практ. конф., посвящ. 275-летию г. Перми и 80-летию фарм. образования на Урале*, Пермь (1998).
4. S. M. Kupchan, C. W. Sigel, M. I. Mats, et al., *J. Am. Soc.*, **98**(8), 2295 – 2300 (1976).
5. S. S. Zyкова, *W. Appl. Sci. J.*, **24**(4), 476 – 480 (2013).
6. З. Ю. Самойлова, Г. В. Смирнова, Г. И. Высочина, О. Н. Октябрьский, *Тез. IV молодеж. школы-конф. с междунар. участ.*, Москва (2008), с. 43.
7. O. Oktyabrsky, G. Vysochina, N. Muzyka, Z. Samoilova, et al., *J. Appl. Microbiol.*, **106**, 1175 – 1183 (2009).
8. P. Molyneux, *Songklanakar J. Sci. Technol.*, **26**(2), 211 – 219 (2004).
9. И. В. Березовская, *Хим.-фарм. журн.*, **37**(3), 32 – 34 (2005); *Pharm. Chem. J.*, **37**(3), 139 – 141 (2003).

Поступила 19.04.14

SYNTHESIS AND PHARMACO-TOXICOLOGICAL CHARACTERISTICS OF 3-SUBSTITUTED 3-HYDROXY-6-PHENYL-3,4-DIHYDRO-2H-1,3-OXAZINES

S. S. Zyкова^{1*}, T. F. Odegova², S. V. Boichuk³, and A. R. Galembikova³

¹ Perm Penal Service Institute, Perm, 614012 Russia

² Perm Pharmaceutical Academy, Russia

³ Kazan State Medical State University, Kazan, Tatarstan, 420012 Russia

* e-mail: zykova.sv@rambler.ru

Reactions between 1,6-diaryl-3,4-dihydroxy-2,4-hexadiene-1,6-dione and various arylidenarylamines lead to the formation of 3-substituted-3-hydroxy-6-phenyl-3,4-dihydro-2H-1,3-oxazines. The synthesized compounds were examined for anti-oxidant properties, cytotoxic activity, and acute toxicity *in vitro*. The most significant anti-oxidant activity was observed for (2Z)-3-hydroxy-3-[4-hydroxy-2-(4-methylphenyl)-3, 6-diphenyl-3, 4-dihydro-2H-1, 3-oxazin-4-yl]-1-phenylprop-2-en-1-one (IIb) and (2Z)-3-hydroxy-3-[4-hydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-2-(4-methylphenyl)-6-phenyl-3, 4-dihydro-2H-1, 3-oxazin-4-yl]-1-phenylprop-2-en-1-one (IIc). At the same time, the synthesized compounds exhibited no cytotoxic activity *in vitro*.

Keywords: 3-substituted 3-hydroxy-6-phenyl-3,4-dihydro-2H-1,3-oxazines; anti-oxidant activity; antiradical activity; DPPH; cytostatic activity; MTT-test