

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИОДИДОВ (+)-(4S,5S) И (-)-(4R,5R)-1-МЕТИЛ-4-(4-НИТРОФЕНИЛ)-1-АЗОНИА-3,7-ДИОКСАБИЦИКЛО [3,3,0] ОКТАНОВ¹

© 2006 С.Х. Шарипова, М.Н. Николаенко, И.Ф. Шаталаев²

Из (+)-(1S,2S) и (-)-(1R,2R)-2-амино-1-(4-нитрофенил)-1,3-пропандиолов в результате двухстадийного синтеза получены бициклические четвертичные аммониевые соли. С помощью программы PASS выполнен прогноз спектра биологической активности. Обнаружена антибактериальная активность (+)-изомера. Показано различие в действии изомеров на общую активность пяти индикаторных ферментов сыворотки крови человека и на относительную активность изоферментов лактатдегидрогеназы.

Введение

Известно, что кольцо оксазолидина является структурным элементом некоторых используемых в медицинской практике лекарственных препаратов. В настоящее время продолжается поиск новых производных оксазолидина, обладающих биологической активностью. Теоретический и практический интерес представляют также четвертичные аммониевые соли, поскольку соединения этого класса сравнительно легко могут быть синтезированы и применяются в медицинской практике в качестве антисептических, антибактериальных, сердечно-сосудистых средств [1,2].

В работе приведены методики синтеза производных оксазолидина в виде четвертичных солей аммония (III) из (+)-(1S,2S) и (-)-(1R,2R)-2-амино-1-(4-нитрофенил)-1,3-пропандиолов (I), являющихся промежуточными продуктами в производстве антибиотика левомецетина. Представлены результаты экспериментального исследования биологической активности синтезированных оптических изомеров, в частности, антимикробной активности, а также влияния полученных соединений на общую активность некоторых индикаторных ферментов сыворотки крови человека и на изоферментный спектр терминального фермента гликолиза лактатдегидрогеназы.

1. Методика химического эксперимента

ИК-спектры синтезированных соединений сняты на спектрофотометре ИКС-29.

¹Представлена доктором химических наук профессором П.П. Пурьгиным.

²Шарипова Сафия Хакимовна, Николаенко Маргарита Николаевна (marganik@mail.ru), Шаталаев Иван Федорович, кафедра химии фармацевтического факультета Самарского государственного медицинского университета, 443001, Россия, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171.

(+)-(4S,5S)-4-(4-Нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октан.

В круглодонную колбу на 250 мл, снабженную насадкой Дина-Старка и обратным холодильником, помещали 42 г (0,2 моль) (+)-(1S,2S)-2-амино-1-(4-нитрофенил)-1,3-пропандиола и 16 г (0,5 моль) параформа. Через насадку Дина-Старка колбу заполняли на 2/3 бензолом. Реакционную смесь кипятили 1–2 часа. За ходом реакции следили по количеству воды, собирающейся в насадке Дина-Старка. Об окончании синтеза судили по следующим критериям: объем воды в насадке Дина-Старка равен рассчитанному (7,2 мл); реакционная смесь становится прозрачной, принимает светло-зеленую окраску.

Затем реакционную смесь фильтровали на воронке для горячего фильтрования. Растворитель отгоняли на роторном испарителе, расплавленный (+)-(4S,5S)-4-(4-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октан выливали в фарфоровую чашку, где он закристаллизовывался. Продукт реакции представлял собой кристаллы светло-желтого цвета, нерастворимые в воде и растворимые в спирте при нагревании.

После перекристаллизации из спирта получали вещество белого цвета.

Выход: 36 г (77% от теоретического), т. пл. 77°C. По данным [3] 79°C.

ИК-спектр (см⁻¹): 1180; 1140; 1100; 1060 (оксазолидиновые кольца).

(+)-(4S,5S)-1-метил-4-(4-нитрофенил)-1-азониа-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октана иодид. В круглодонную колбу емкостью 100 мл, снабженную обратным холодильником, помещали 20 г (0,1 моль) (+)-(4S,5S)-4-(4-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октана, 8 мл (0,1 моль) иодистого метила, 40 мл ацетона. Реакционную смесь нагревали. Выпадали кристаллы желтого цвета. Продукт реакции отфильтровывали на воронке Бюхнера и промывали ацетоном. Выход 31,7 г (95% от теоретического), т. пл. 183–185°C [4].

ИК-спектр (см⁻¹): 1170; 1120; 1090; 1065 (оксазолидиновые кольца).

2. Методика биохимического эксперимента

Общую активность ферментов определяли на многоканальном биохимическом анализаторе "Синхрон СХ4" фирмы БЕКМАН, который предназначен для выполнения комплекса биохимических исследований *in vitro* в различном биологическом материале — сыворотке, плазме, моче и cerebro-спинальной жидкости.

В качестве биологического объекта исследования использовали сыворотку крови человека, а не плазму крови, поскольку многие антикоагулянты, например, гепарин, способны тормозить ферментативную активность. Водные растворы синтезированных веществ концентрацией 10 мг/мл и объемом 1 мл смешивали с равным объемом сыворотки крови, инкубировали в течение 1 часа при температуре 36°C. В полученных образцах определяли общую активность следующих ферментов: лактатдегидрогеназа (ЛДГ), α-амилаза, щелочная фосфатаза (ЩФ), аланинаминотрансфераза (АлАТ), аспартатаминотрансфераза (АсАТ).

Определение изменения относительной активности изоферментов ЛДГ сыворотки крови под действием синтезированных соединений проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле. В работе использовали акриламид и метиленабисакриламид фирмы "Reanal" (Венгрия). Водные растворы исследуемых образцов с концентрацией 10 мг/мл и объемом 1 мл смешивали с равным объемом сыворотки крови, инкубировали в течение 1 часа при температуре 36°C. Полученные образцы в объеме 50 мкл в смеси с 40% раствором сахарозы наносили

на линию старта. В качестве электродного буфера использовали 1 М трис-ЭДТА-боратный буфер с рН 9,2. Электрофорез проводили при 5,0 мА/см в первые 30 мин, а затем 10,0 мА/см до окончания электрофореза. Изоферменты выявляли феназинметасульфат-тетразолиевой реакцией в среде следующего состава: водные растворы НАД (91 мг/мл) — 40 мл, нитросиний тетразолиевый (1 мг/мл) — 25 мл, 1М раствор лактата лития с рН 7,0–10 мл, феназинметасульфат (1 мг/мл) — 4 мл, 0,2 М трис-НСl буфер с рН 7,0 — до 100 мл. Инкубировали 4 часа при 37°С. МФ ЛДГ выявлялись в виде темно-синих зон. Относительную активность МФ ЛДГ устанавливали путем прямой денситометрии на анализаторе фореграмм АФ-1.

3. Методика микробиологического эксперимента

Антибактериальные свойства синтезированных соединений исследовали в опытах *in vitro* в отношении бактериальных тест-культур, представленных грамположительными бактериями *Staphylococcus aureus* (штаммы 209-Р и 139), *Bacillus anthracoides* (штаммы 96 и 1312); грамотрицательными бактериями: *Escherichia coli* (штаммы К-12 и "Berlin"). противогрибковую активность изучали в отношении дрожжеподобных грибов *Candida albicans* (штаммы 968 и 326).

Минимальные ингибирующие концентрации веществ в отношении всех тест-штаммов грибов и бактерий определяли методом серийных разведений в соответствующих жидких и плотных питательных средах в интервале концентраций от 25 до 500 мкг на мл питательной среды.

В качестве растворителя использовали изотонический раствор натрия хлорида. Рабочая концентрация веществ составляла 5 мг/мл. Разведением раствора указанной концентрации получили серию растворов для проведения микробиологических исследований.

В качестве плотной среды для определения антибактериальной активности испытуемых соединений использовали мясопептонный агар в объеме 20 мл на чашку; соответственно для определения противогрибковой активности — глюкозопептонные плотные среды Сабуро в тех же количествах.

Инокулят для посева готовили путем получения взвеси соответствующих агаровых культур в изотоническом растворе натрия хлорида с последующим доведением до определенной концентрации (для бактерий — по оптическому стандарту мутности, для грибов — в камере Горяева).

Посев осуществляли бактериологической петлей с предварительным определением количества петель в 1 мл. Посевная доза для плотной питательной среды составила $2 \cdot 10^7$ микробных клеток.

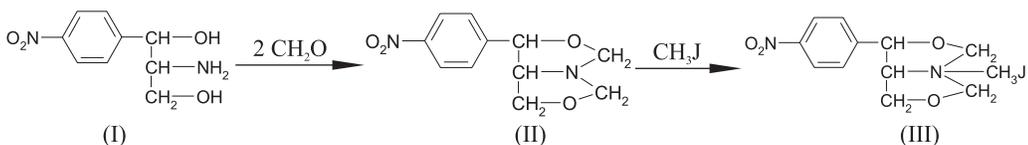
Учет результатов проводили визуально. Для бактерий после суточного инкубирования в термостате при 37°С, для грибов — после 14-ти дневного инкубирования в термостате при 27°С.

За минимальную ингибирующую концентрацию принимали то наименьшее количество вещества в питательном субстрате, которое полностью подавляло рост соответствующего тест-микроба в течение срока наблюдения на фоне развития культуры в контрольных средах.

В качестве препаратов сравнения были использованы водный раствор левомецетина и раствор нистатина в диметилсульфоксиде в тех же концентрациях.

4. Результаты исследования и их обсуждение

В результате двухстадийного синтеза из (+)-(1S,2S) и (-)-(1R,2R)-2-амино-1-(4-нитрофенил)-1,3-пропандиолов (I), путем последовательной обработки параформом и метилиодидом, получены стереоизомерные бициклические четвертичные соли аммония (III):



Предварительно была проведена оценка потенциальной биологической активности синтезированных солей с помощью доступной в Интернете компьютерной программы PASS для прогноза спектра биологической активности низкомолекулярных соединений на основе их структурных формул. К сожалению, стереохимические особенности молекул, например, хиральность, не учитываются программой, хотя хорошо известна важность их для биологической активности.

Таблица 1

**Результат выполнения прогноза для
1-метил-4-(4-нитрофенил)-1-азония-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октана
иодида**

*Pa	**Pi	Активность
0,855	0,002	Антагонист D1 дофамина
0,739	0,007	Антагонист дофамина
0,673	0,018	Антагонист ГАМК рецепторов
0,661	0,020	Ингибитор топоизомеразы II
0,602	0,028	Психотропная активность

*Pa — вероятность того что данный вид активности проявится в эксперименте

**Pi — вероятность того что данный вид активности не проявится в эксперименте

Для исследования биологической активности полученных соединений выбрано изучение взаимодействия их с пятью ферментами, относящимися к индикаторным и представляющими особый интерес в диагностике заболеваний, т.к. их появление в необычных количествах позволяет судить о функциональном состоянии и заболевании различных органов (например, печени, сердечной и скелетной мускулатуры).

Как известно, многие лекарственные препараты вызывают изменение активности ферментов в результате прямого воздействия или опосредованных эффектов. Резкое повышение или понижение активности ферментов может быть связано с изменением первичной, вторичной, третичной и четвертичной структуры ферментов, определяющей их активность.

В ходе работы было отмечено, что обе соли оказывают влияние на общую активность выбранных ферментов, причем характер влияния изомерных солей различен (табл. 2):

Установлено, что синтезированный (+) изомер снижает активность всех пяти исследуемых ферментов, причем в большей степени ингибирует аланинаминотрансферазу, в то время как (-) изомер напротив, увеличивает ферментативную

Таблица 2

Изменение общей активности ферментов сыворотки крови под действием синтезированных соединений

Изомер	Фермент				
	ЛГД	Амилаза	ЩФ	АлАТ	АсАТ
Изменение активности, %					
(+)-изомер	-17,5	-11,2	-10,4	-11,3	-29,5
(-)-изомер	+8,0	+14,0	+12,8	+8,1	+29

активность, и в большей степени это проявляется также в отношении аланина-минотрансферазы.

Из выбранных в качестве объектов исследования ферментов именно лактатдегидрогеназа является одним из индикаторных ферментов, который исключительно тонко реагирует на различные изменения внутренней и внешней среды. ЛДГ функционирует во всех органах и тканях организма. Известны 5 различных изоферментов ЛДГ, различающихся по сочетанию полипептидных цепей и характеризующих преимущественно определенные органы. Так, ЛДГ₁ является кардиоспецифическим, а ЛДГ₄ и ЛДГ₅ — гепатоспецифическими изоферментами. Поэтому диагностическое значение имеет исследование изоферментного спектра ЛДГ [5].

Изоферменты ЛДГ отличаются по электрофоретической подвижности, субстратной специфичности, каталитической активности, термолабильности. Поэтому для определения их активности используют различные методы.

Процентное соотношение изоферментов ЛДГ сыворотки крови, определенное различными авторами, варьирует. Это зависит прежде всего от выбора методики выявления изоферментов ЛДГ, от условий, сроков хранения исследуемого материала и других факторов. Однако имеется одна закономерность в отношении активности изоферментов ЛДГ, которая отмечается большинством исследователей: активность ЛДГ₂ > ЛДГ₁ > ЛДГ₃ > ЛДГ₄ > ЛДГ₅.

Анализ изоферментных спектров ЛДГ в присутствии синтезированных соединений также показал различие в характере действия энантиомеров. Причем оба оптических изомера соли в различной степени меняют относительную активность изоферментов. Соль (+) (4S,5S)-4-(4-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октана с метилиодидом увеличивает активность изофермента ЛДГ₁, ЛДГ₂, практически не влияет на активность ЛДГ₄, ЛДГ₅, уменьшает активность изофермента ЛДГ₃. Соль (-) (4R,5R)-4-(4-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октана с метилиодидом увеличивает активность изофермента ЛДГ₁, уменьшает активность изофермента ЛДГ₃, не влияет на активность изоферментов ЛДГ₂, ЛДГ₄, и ЛДГ₅ (табл. 3)

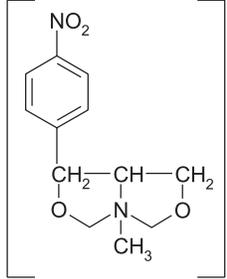
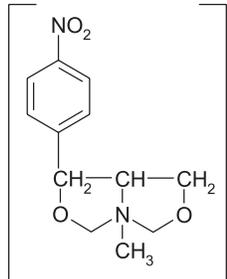
Бактериостатический эффект отмечен у четвертичной соли аммония (+) (4S,5S)-4-(4-нитрофенил)-1-аза-3,7-диоксабицикло[3,3,0]октана с йодистым метилом в отношении *St. Aureus*, *Bacillus anthracoides*, *E. Coli* в концентрации 500 мкг/мл.

Обнаруженная большая активность (+)-изомера соли по сравнению с (-)-изомером представляет практический интерес, поскольку исходное соединение (+) (1S,2S)-2-амино-1-(4-нитрофенил)-1,3-пропандиол является крупнотоннажным побочным продуктом производства антибиотика левомецетина и поиск путей его утилизации актуален.

На основании вышеизложенных данных можно рекомендовать дальнейшее изу-

Таблица 3

**Результаты электрофоретического исследования ЛДГ сыворотки крови
в присутствии исследуемых соединений**

Объект исследования	Изомер	ЛДГ ₁	ЛДГ ₂	ЛДГ ₃	ЛДГ ₄	ЛДГ ₅
Сыворотка (контроль)		19,8	42,1	23,7	5,8	8,6
	(+)-(4S,5S)	27,2	49,2	8,0	5,1	10,5
	(-)-(4R,5R)	41,6	40,8	5,1	6,6	5,8

чение биологической активности синтезируемых четвертичных аммониевых солей, содержащих в структуре кольцо оксазолидина. Это создает перспективы получения новых лекарственных препаратов, а также позволяет установить определенные закономерности в ряду "структура-свойство-биологическая активность"

Литература

- [1] Машковский, М.Д. Лекарственные средства: практ. пособие: в. 2 т. Т. 1-14 изд, перер., испр. и доп. / М.Д. Машковский. М.: Новая волна, 2002. 540 с.
- [2] Машковский, М.Д. Лекарственные средства: практ. пособие: в. 2 т. Т. 2-14 изд, перер., испр. и доп. / М.Д. Машковский. М.: Новая волна, 2002. 608 с.
- [3] Edgerton, W.H. / W.H. Edgerton, J.R. Fischer, G.W. Moersch // J. Amer. Chem. Soc. 1957. No. 79 P. 6487.
- [4] Зайцев, В.П. Синтез галогенидов (-)-(4R,5R)- и(+)-(4S,5S)-1-алкил-4-(4-нитрофенил)-1 азония-3,7-бицикло[3,3,0] октанов / В.П. Зайцев, П.П. Пурьгин, С.Х. Шарипова // ХГС. Рига: Зинатне, 1990. №10. С. 1394–1395.
- [5] Долгов, В.А. Аналитическая энзимология: практ. пособие / В.А. Долгов. М.: Наука, 2002. 89 с.

Поступила в редакцию 30/III/2006;
в окончательном варианте — 30/III/2006.

**SYNTHESIS AND STUDY OF BIOLOGICAL ACTIVITY
OF IODIDES (+)-(4S,5S) И (-)-(4R,5R)-1-METHYL-4
(4-NITROPHENYL) - (-AZONIA-3,7-DIOXADICYCLIC
(3,3,0) OCTANES³**

© 2006 S.Kh. Sharipova, M.N. Nikolaenko, I.F. Shatalaev⁴

As a result of two-phasic synthesis from (+)-(1S,2S) и (-)-(1R,2R)-2-Amine-1-(4-Nitrophenyl)-1,3-propanediols dicyclic quarternary ammonium salts are received. The forecast of a spectrum of biological activity is executed with the help of computer program PASS. Antibacterial activity of (+)-isomer is found. Distinction in operation of isomers on the general activity of five display enzymes of whey of blood of the man and on relative activity of isoenzymes of lactate dehydrogenase is shown.

Paper received 30/III/2006.

Paper accepted 30/III/2006.

³Communicated by Dr. Sci. (Chem.) Prof. P.P. Purygin.

⁴Sharipova Saphiya Khakimovna, Nickolaenko Margarita Nickolaevna, Shatalaev Ivan Fedorovich, Samara State Medical University, Samara, 443099, Russia.