

УДК 547.92:544.1:544.165:577.1:615-015.11

DOI: 10.31040/2222-8349-2020-0-1-36-40

**СИНТЕЗ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ С2-БЕНЗИЛИДЕНОВЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ ДИПТЕРОКАРПОЛА****© И.Е. Смирнова, А.В. Петрова, А.А. Федорова, З.Р. Зилеева,
Т.В. Иванова, Тао Тран Тхи Фуонг**

Даммарановые тритерпеноиды являются доступными и биоактивными природными метаболитами с большим структурным потенциалом, что делает их привлекательными источниками в качестве платформ для разработок лекарственных средств. Флора Вьетнама богата растениями, которые используются в народной медицине, метаболиты которых в свою очередь могут стать основой новых лекарственных препаратов. К одному из таких важных растений относится тропическое дерево *Dipterocarpus alatus*. Смола данного дерева, в виде гурьонского бальзама, используется в народной медицине в качестве ранозаживляющего, противовоспалительного и антибактериального средства. Основным метаболитом смолы данного дерева является даммарановый тритерпеноид – диптерокарпол. Диптерокарпол и его производные обладают различными видами активности (противораковой [1], противовирусной [2] и др.). В работе приведены синтез и цитотоксическая активность С2-бензилиденовых производных диптерокарпола. Диптерокарпол **1** выделяли из живицы *Dipterocarpus alatus*, собранной во Вьетнаме в 2018 г. В результате альдольной конденсации по Кляйзену–Шмидту, катализируемой сильным основанием (40% КОН в этаноле), даммаранового тритерпеноида диптерокарпола **1** с ароматическими альдегидами: 2,3-диметоксибензальдегидом, 2-, 3-, 4-пиридинилальдегидами синтезирована серия 2-бензилиденовых производных **2–5** с выходами 64–89% после хроматографической очистки. Структура всех вновь синтезированных соединений подтверждена методами ЯМР ¹H и ¹³C-спектроскопии. Была изучена цитотоксичность соединений **2–5** в отношении клеточных линий: эмбриональной почки человека Hek23, аденокарциномы легких А-549, карциномы молочной железы MCF-7 и нейробластомы человека SH-SY5Y в опытах *in vitro*. Результаты проведенных исследований показали, что введение в структуру диптерокарпола фрагментов 3- или 4-никотинового альдегида приводило к умеренной цитотоксичности данных производных в отношении ряда изученных клеток. Остальные соединения активности к данным клеточным линиям не проявили.

Ключевые слова: даммарановые тритерпеноиды, диптерокарпол, С2-бензилиден, цитотоксичность.

Введение. Согласно литературным данным, введение в структуру тритерпеноидов таких как босвелловая кислота, олеаноловая кислота бензилиденовых фрагментов по положению С-2 приводит к усилению противораковой активности соединений [3], а также они являются интермедиатами в синтезе разнообразных гетероциклических систем [4]. Учитывая литературные данные об активности 2-бензилиден

производных и перспективность даммарановых тритерпеноидов как доступной платформы для синтеза новых биологически активных соединений, нами осуществлен синтез соединений данного типа на основе даммаранового тритерпеноида диптерокарпола **1**.

Экспериментальная часть. Синтез соединений 2-5: К раствору 1 ммоль (0.42 г)

СМИРНОВА Ирина Евгеньевна – к.х.н., Уфимский Институт химии УФИЦ РАН,
e-mail: si8081@yandex.ru

ПЕТРОВА Анастасия Валерьевна, Уфимский Институт химии УФИЦ РАН, e-mail: Pnastya08@mail.ru

ФЕДОРОВА Александра Александровна, Башкирский государственный университет,
e-mail: fedorova.aleksasha@bk.ru

ЗИЛЕЕВА Зульфия Рустамовна, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, e-mail: Zileeva81@list.ru

ИВАНОВА Татьяна Викторовна, Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН,

e-mail: ivandatanya1992@gmail.com

ФУОНГ Тао Тран Тхи – к.х.н., Институт химии Вьетнамской академии наук и технологий,

e-mail: ntuelam2010@gmail.com

соединения **1** (0.42 г) в 20 мл этанола при перемешивании добавляли 1.3 ммоль соответствующего альдегида (2,3-диметоксибензальдегида, 2-, 3-, 4-пиридинилальдегида) и 0.1 мл 40% раствора КОН/EtOH. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов, далее выливали в 50 мл 5% р-ра HCl, осадок отфильтровывали, промывали до нейтральной среды маточника, сушили на воздухе. Продукт хроматографировали на колонке с Al₂O₃, элюируя последовательно петролейным эфиром, бензолом, хлороформом.

2-[2',3'-Диметоксибензил]-метиленодиптерокарпол (2). Выход 0.39 г (89%), Т.пл 103-105°C, $[\alpha]_{20}^D - 11$ (с 0.5, CHCl₃). ¹H-ЯМР (CDCl₃, 500 МГц), δ_H (м.д.): 0.80, 0.90, 0.98, 1.11, 1.12, 1.61, 1.69 (21H, 7с, CH₃), 1.19-1.52 (16H, м, CH, CH₂), 1.70-2.19 (11H, м, CH, CH₂), 3.75 (3H, с, OCH₃), 3.91 (3H, с, OCH₃), 5.11 (1H, т, J₁ = 7.0, J₂ = 7.1, H24), 6.79-7.75 (3H, м, H_{аром}). ¹³C-ЯМР (CDCl₃, 125 МГц), δ_c (м.д.): 16.06, 17.75, 19.66, 20.33, 21.03, 22.04, 22.56, 24.79, 25.35, 25.79, 26.71, 27.57, 29.24, 31.15, 34.18, 36.60, 39.89, 40.15, 40.48, 40.63, 44.27, 45.52, 48.50, 49.72, 50.33, 53.60, 55.81 (OCH₃), 61.14 (OCH₃), 75.33 (C20), 112.53, 121.76, 123.56, 124.71 (C24), 130.43, 131.62 (C25), 132.94 (C1'), 135.28 (C2), 148.33, 152.85, 208.00 (C3). C₃₉H₅₈O₄. Найдено, %: С 79.28; Н 9.89. Вычислено, %: С 79.11; Н 9.66.

2-[2'-Пиридинил]-метиленодиптерокарпол (3). Выход 0.33 г (75%), Т.пл 154-155°C $[\alpha]_{20}^D + 61$ (с 1, CHCl₃). ¹H-ЯМР (CDCl₃, 500 МГц), δ_H (м.д.): 0,78, 0,90, 0,99, 1,08, 1,11, 1,58, 1,61 (21H, 7с, 7CH₃), 1.20-2.50 (27H, м, CH, CH₂), 5.10 (1H, т, J₁ = 7.0, J₂ = 7.0, H24), 7.07-7.76 (4H, м, H_{аром}). ¹³C-ЯМР (CDCl₃, 125 МГц), δ_c (м.д.): 14.77, 15.98, 16.32, 17.74, 20.39, 22.27, 22.29, 22.57, 23.54, 24.80, 25.36, 25.77, 27.64, 29.41, 31.15, 32.06, 34.10, 37.54, 40.60, 42.40, 45.18, 48.37, 49.79, 53.25, 75.41 (C20), 122.04, 122.25, 124.70 (C24), 126.81, 131.65 (C25), 134.12, 136.18, 138.82 (C2), 149.44 (C1'), 155.58, 209.06 (C3). C₃₆H₅₃NO₂. Найдено, %: С 81.30; Н 10.05; N 2.63. Вычислено, %: С 81.17; Н 9.89; N 2.58.

2-[3'-Пиридинил]-метиленодиптерокарпол (4). Выход 0.32 г (73%), Т.пл 160-161°C, $[\alpha]_{20}^D + 37$ (с 0.25, CHCl₃). ¹H-ЯМР (CDCl₃, 500 МГц), δ_H (м.д.): 0.80, 0.91, 0.99, 1.10, 1.11, 1.60, 1.69 (21H, 7с, CH₃), 1.19-1.51 (16H, м, CH, CH₂), 1.71-2.32 (11H, м, CH, CH₂), 5.11 (1H, т,

J₁=7.1, J₂=7.1 H24), 7.21-8.72 (4H, м, H_{аром}). ¹³C-ЯМР (CDCl₃, 125 МГц), δ_c (м.д.): 14.80, 15.89, 16.30, 17.76, 20.34, 22.30, 22.57, 24.78, 25.46, 25.77, 27.57, 29.42, 29.71, 31.14, 34.12, 36.49, 40.14, 40.60, 42.31, 42.39, 44.80, 45.41, 48.52, 49.68, 50.31, 53.31, 75.35 (C20), 123.83, 124.63 (C24), 131.73 (C25), 132.67, 137.16 (C1'), 138.18 (C2), 147.76, 149.67, 207.72 (C3). C₃₆H₅₃NO₂. Найдено, %: С 81.30; Н 10.05; N 2.63. Вычислено, %: С 81.14; Н 9.91; N 2.55.

2-[4'-Пиридинил]-метиленодиптерокарпол (5). Выход 0.28 г (64%), Т.пл 133-134°C $[\alpha]_{20}^D + 45$ (с 0.5, CHCl₃). ¹H-ЯМР (CDCl₃, 500 МГц), δ_H (м.д.): 0.80, 0.99, 1.15, 1.11, 1.19 (5H, 5с, 5CH₃), 1.27-2.39 (16H, м, CH, CH₂), 2.89-3.19 (11H, м, CH, CH₂), 5.13 (1H, т, J₁ = 7.1, J₂ = 7.1, H24), 7.14-7.80 (4H, м, CH, H_{аром}). ¹³C-ЯМР (CDCl₃, 125 МГц), δ_c (м.д.): 14.80, 15.92, 16.30, 17.72, 20.30, 22.33, 22.56, 24.76, 25.44, 25.73, 27.54, 29.26, 31.13, 34.03, 36.03, 36.57, 40.18, 40.62, 42.32, 44.76, 45.58, 48.57, 49.76, 50.30, 53.38, 75.42 (C20), 124.61, 124.74 (C24), 131.72 (C25), 132.83, 134.43 (C1'), 138.21 (C2), 140.10, 147.68, 150.13, 207.61 (C3). C₃₆H₅₃NO₂. Найдено, %: С 81.30; Н 10.05; N 2.63. Вычислено, %: С 81.23; Н 9.92; N 2.49.

Цитотоксичность соединений (2-5). Все клеточные линии получены из Российской коллекции клеточных культур, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург. Все клеточные линии культивировали в среде ДМЕМ (Биолот, Россия) в присутствии 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 2 mM L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина сульфата. После 24 ч культивирования в каждую лунку вносили исследуемые соединения в конечных концентрациях 1, 10, 100 мкМ (в 0.1% ДМСО) и инкубировали в течение 48 ч. По окончании инкубации к клеткам добавляли коммерческий реагент «PrestoBlue®» (Invitrogen, США) в количестве, рекомендованном производителем (1/9 объема культуры). Флуоресценцию красителя (степень редукции красителя) измеряли при длине волны 590 нм, используя мультипланшетный анализатор «2300 EnSpire® Multimode Plate Readers» (Perkin Elmer, США). Значение концентрации соединений, вызывающее 50%-е подавление жизнеспособности клеток (IC₅₀), определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения «GraphPad Prism v.5.02» (GraphPad Software Inc., США). Данные, полученные в 2-х независимых экспериментах, выражали в виде средне-

го значения 3-х измерений для каждой концентрации \pm стандартное отклонение, по отношению к значениям контроля (0.1% ДМСО), принятого за 100%.

Результаты и их обсуждение. Диптерокарпол **1** выделяли из живицы *Dipterocarpus alatus* с выходом 23% (в пересчете на исходное сырье). Взаимодействием диптерокарпола **1** с ароматическими альдегидами в этаноле в результате альдольной конденсации по Кляйзену–Шмидту (в присутствии сильного основания, 40% КОН в этаноле) синтезирована серия С-2 бензилиденовых производных **2-5** (2,3-диметокси-бензилидено, 2-, 3-, 4-пиринилметиленодиптерокарпол) с выходами 64-89%, после очистки колоночной хроматографией (рис.).

Структуры всех соединений подтверждены методами ЯМР спектроскопии. В спектрах ЯМР ^{13}C наблюдался сдвиг сигнала С-3 карбонильного углерода с δ 212 м.д. (соединение **1**) в область δ 208–209 м.д. Сигналы метиленовой двойной связи С2-С1' обнаруживались в области δ 132–135 м.д. В спектрах данных соедине-

ний наблюдались сигналы ароматических атомов углерода (протонов) в области δ 155.5–122.2 (6.8–8.1) м.д. Для соединения **2** в протонном спектре наблюдались характеристичные синглеты OCH_3 групп в области δ 3.5–4.0 м.д.

Изучение цитотоксичности соединений **2-5** было проведено в отношении клеток эмбриональной почки человека Нек23, аденокарциномы легких А-549, карциномы молочной железы МСF-7, нейробластомы SH-SY5Y в опытах *in vitro*. Результаты представлены в табл.

В результате проведенного анализа показано, что среди изученного ряда веществ **2-5** соединения **4** и **5** обладают умеренной цитотоксической активностью в отношении исследованных клеточных линий.

Заключение. Таким образом, введение в структуру даммаранового тритерпеноида диптерокарпола **1** фрагментов ароматических альдегидов (изоникотинового и никотинового) по положению С-2 приводит к умеренной цитотоксичности в отношении изученного ряда клеточных линий.

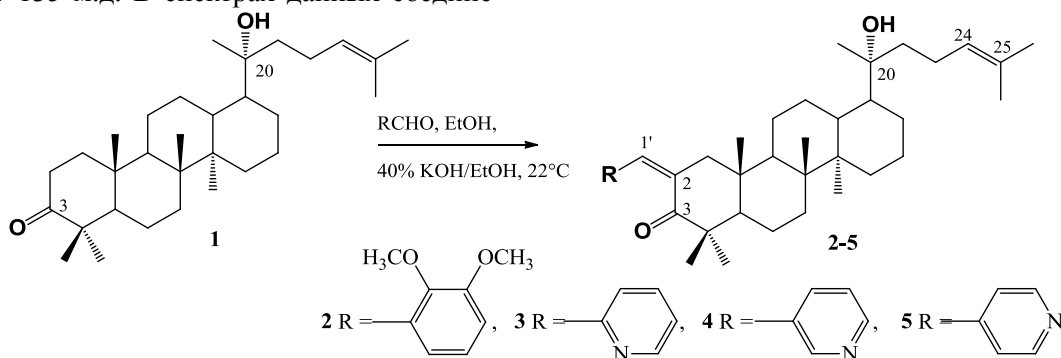


Рис. 1. Синтез 2-арилиденовых производных **2-5** на основе диптерокарпола **1**

Т а б л и ц а

Цитотоксичность соединений 2-5 in vitro

Соединение	IC ₅₀ , мкМ			
	Нек293	А-549	МСF-7	SH-SY5Y
2	>100	>100	>100	>100
3	44.48 \pm 0.59	20.63 \pm 2.27 (p=0.00004) ^a	28.86 \pm 4.29 (p=0.0006) ^a	16.93 \pm 3.60 (p=0.00002) ^a
4	>100	60.81 \pm 6.99 (p=0.0002) ^a	124.5 \pm 16.26	>100
5	13.40 \pm 5.02	>100 (p=0.000009) ^a	42.72 \pm 2.92 (p=0.000019) ^a	26.21 \pm 2.68 (p=0.005) ^a

Примечание. Данные представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение (N=2). ^a – различия значений IC₅₀, определенных для клеточных линий опухолевого происхождения относительно значений IC₅₀, определенных для условно-нормальных клеток (НЕК293); однофакторный парный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Даннета.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-53-54005 Вьет_а, биологическая часть финансировалась в рамках темы государственного задания ИБГ УФИЦ РАН № АААА-А16-116020350033-8.

Литература

1. Akihisa T., Tokuda H., Ukiya M., Suzuki T., Enjo F., Koike K., Nikaido T., Nishino H. 3-epicabraleahydroxylactone and other triterpenoids from camellia oil and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation // *Chem. Pharm. Bull.* 2004. V. 52. P. 153–156.
2. Akihisa T., Ogihara J., Kato J., Yasukawa K., Ukiya M., Yamanouchi S., Oishi K. Inhibitory effects of triterpenoids and sterols on human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase // *Lipids.* 2001. V. 36. P. 507–512.
3. Fan H., Geng L., Yang F., Dong X., He D., Zhang Y. Ursolic acid derivative induces apoptosis in glioma cells through down-regulation of cAMP // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. V. 176. P. 61–67.
4. Mallavadhani U.V., Vanga N.R., Jeengar M.K., Naidu V.G.M. Synthesis of novel ring-A fused hybrids

of oleanolic acid with capabilities to arrest cell cycle and induce apoptosis in breast cancer cells // *Eur. J. Med. Chem.* 2014. V. 74. P. 398–404.

References

1. Akihisa T., Tokuda H., Ukiya M., Suzuki T., Enjo F., Koike K., Nikaido T., Nishino H. 3-epicabraleahydroxylactone and other triterpenoids from camellia oil and their inhibitory effects on Epstein-Barr virus activation. *Chem. Pharm. Bull.*, 2004, vol. 52, pp. 153–156.
2. Akihisa T., Ogihara J., Kato J., Yasukawa K., Ukiya M., Yamanouchi S., Oishi K. Inhibitory effects of triterpenoids and sterols on human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *Lipids*, 2001, vol. 36, pp. 507–512.
3. Fan H., Geng L., Yang F., Dong X., He D., Zhang Y. Ursolic acid derivative induces apoptosis in glioma cells through down-regulation of cAMP. *Eur. J. Med. Chem.*, 2019, vol. 176, pp. 61–67.
4. Mallavadhani U.V., Vanga N.R., Jeengar M.K., Naidu V.G.M. Synthesis of novel ring-A fused hybrids of oleanolic acid with capabilities to arrest cell cycle and induce apoptosis in breast cancer cells. *Eur. J. Med. Chem.*, 2014m, vol. 74, pp. 398–404.

SYNTHESIS AND CYTOTOXICITY OF 2-BENZILIDENES DERIVATIVES OF DIPTEROCARPOL

© I.E. Smirnova¹, A.V. Petrova¹, A.A. Fedorova², Z.R. Zileeva³, T.V. Ivanona³,
Thao Tran Thi Phuong⁴

¹Ufa Institute of Chemistry – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
69, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

²Bashkir State University,
32, ulitsa Zaki Validi, 450076, Ufa, Russian Federation

³Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences,
71, prospect Oktyabrya, 450054, Ufa, Russian Federation

⁴Institute of Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology,
A18, Hoang Quoc Viet Str., Cau Giay Dist., Hanoi, Vietnam

Dammarane triterpenoids are available and bioactive natural metabolites with great structural potential, making them attractive sources as platforms for drug development. Flora of Vietnam is rich in plants that are used in traditional medicine, whose metabolites, in turn, can become the basis of new drugs. One of these important plants

is the tropical tree *Dipterocarpus alatus*. The resin of this tree, in the form of a Guryun balm, is used in traditional medicine as a wound healing, anti-inflammatory, and antibacterial agent. The main metabolite of the resin of this tree is dammarane triterpenoid – dipterocarpol. Dipterocarpol and its derivatives possess various types of activity (anticancer [1], antiviral [2], etc.).

In this work, C2-benzylidene derivatives of dipterocarpol were synthesized and its cytotoxic activity was determined. Dipterocarpol **1** was isolated from the resin of *Dipterocarpus alatus*, collected in Vietnam in 2018. As a result of the Kleisen-Schmidt's aldol condensation, catalyzed by a strong base (40% KOH in ethanol), dammarane triterpenoid dipterocarpol **1** with aromatic aldehydes: 2,3-dimethoxybenzaldehyde and 2-, 3-, 4-pyridinylaldehydes a series of 2-benzylidene derivatives **2-5** in 63–97% yields after chromatographic purification was synthesized. The structure of all new compounds was confirmed by ¹H NMR and ¹³C spectroscopy. The cytotoxicity of compounds **2-5** against cell lines: human Hek23 embryonic kidney, A-549 lung adenocarcinoma, MCF-7 breast carcinoma and SH-SY5Y human neuroblastoma *in vitro* was studied. The results of the studies showed that the introduction of 3- or 4-nicotinic aldehyde fragments into the structure of dipterocarpol led to moderate cytotoxicity of these derivatives in relation to a number of studied cells. The remaining compounds of activity to these cell lines did not show.

Key words: dammarane triterpenoids, dipterocarpol, 2-benzilidenes, cytotoxicity.