



## СИНТЕЗ, АНТИМИКРОБНАЯ И ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛЕНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ СМОЛЯНЫХ КИСЛОТ

© 2019 г. Е. В. Третьякова\*., Е. В. Салимова\*, Л. В. Парфенова\*

\*Институт нефтехимии и катализа Российской академии наук  
Россия, 450075, Уфа, пр. Октября, 141

Поступила в редакцию 10.04.2019 г.

После доработки 22.04.2019 г.

Принята к публикации 29.04.2019 г.

На основе ацетиленовых производных абиетиновой, 7-формилабиетиновой, дегидроабиетиновой, малеопимаровой и дигидрохинопимаровой кислот получены производные, содержащие морфолиновый, пирролидиновый, бензильный, нитрофенильный и 1,2,3-тетразольный гетероциклические фрагменты. Изучена антибактериальная активность *in vitro* в отношении микроорганизмов и патогенных грибов, а также проведена первичная оценка цитотоксичности и гемолитической активности синтезированных соединений. Установлено, что ацетиленовые производные абиетиновой и дегидроабиетиновой кислот с остатком пирролидина способны эффективно ингибировать рост грибов *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans*, обладая при этом низкой гемолитической активностью.

**Ключевые слова:** дитерпеноиды, абиетиновая кислота, дегидроабиетиновая кислота, 7-формилабиетиновая кислота, малеопимаровая кислота, дигидрохинопимаровая кислота, антибактериальная активность, фунгицидная активность

**DOI:** 10.1134/S0132342319050154

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время, в связи с ростом резистентности многих бактерий к известным противомикробным препаратам, актуальным направлением исследований медицинской химии является поиск новых лекарственных средств, воздействующих на грамположительные и грамотрицательные патогены [1]. Наряду с синтетическими лекарственными средствами большую роль при создании новых перспективных препаратов играют природные соединения, получаемые на основе воспроизводимого растительного сырья [2].

Терпеноиды принадлежат к самому многочисленному классу природных соединений. Среди них немаловажное значение имеют природные смоляные кислоты – абиетиновая, левопимаровая и дегидроабиетиновая, легко получаемые из сосновой живицы [3].

Известно, что смоляные кислоты и их полусинтетические производные обладают широким спектром биологических свойств, в том числе противовоспалительными, противовирусными,

противоопухолевыми, противосудорожными, антипротозойными, антилейшманиальными и др. [4–9]. Абиетиновая и дегидроабиетиновая кислоты проявляют фунгицидную, а также антибактериальную активности, в основном, в отношении грамположительных микроорганизмов [10]. Функционализация исходных смоляных кислот различными фармакофорными фрагментами привела к получению множества разнообразных производных, проявляющих биологическую активность в отношении *Staphylococcus*, *Pseudomonas* или *Cladosporium* sp. [11–16]. Обнаружена способность 7-формилпроизводного абиетиновой кислоты, содержащего пирролидиновый остаток, эффективно ингибировать рост культуры бактерий *St. aureus*, а также культур грибов *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans* [17]. Некоторые гетероциклические производные дегидроабиетилamina способны эффективно ингибировать рост патогенных микроорганизмов, в частности бактерий *St. aureus* и некоторых видов грибов [18]. Исходя из литературных данных [19–23], можно предположить, что механизм действия производных абиетановых кислот, по-видимому, заключается в их взаимодействии с фосфолипидными мембранами.

# Автор для связи: (тел: +7(347)284-27-50; эл. почта: tret'yakovaelv@gmail.com).

дами бактериальных мембран и ферментами, связанными с ними.

В продолжение исследований по поиску перспективных биологически активных веществ в ряду дитерпеноидов абиетанового ряда [24–26] мы осуществили синтез ряда производных абиетана, содержащих ацетиленовые и гетероциклические фрагменты, и исследовали их антимикробную активность *in vitro* в отношении грамположительных (*St. aureus*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Ps. aeruginosa*) бактерий, а также грибов (*C. albicans* и *Cr. neoformans*). Для наиболее активных соединений были также изучены цитотоксическое действие *in vitro* в отношении клеточной линии эмбриональных почек человека HEK29 и способность вызывать разрушение эритроцитов крови (гемолитическая активность).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве исходных соединений использовали абиетиновую (I), малеопимаровую (II) и дигидрохинопимаровую (III) кислоты, а также пропаргиловые эфиры абиетиновой, 7-формилабиетиновой и дегидроабиетиновой кислот (IV)–(VI). Пропаргиловые эфиры (IV)–(VI) вводили в реакции, характерные для тройной связи: аминотетилирование по Манниху, кросс-сочетание с арилгалогенидами (реакция Соногаширы) и 1,3-дипольное циклоприсоединение ацетиленов с генерируемыми *in situ* азидами.

Однореакторный трехкомпонентный синтез оснований Манниха (VII)–(XIV) в результате аминотетилирования пропаргиловых эфиров смоляных кислот (IV)–(VI) формальдегидом и вторичными аминами описан в работе [17].

Синтез замещенного ацетиленового эфира абиетиновой кислоты (XV) осуществляли кросс-сочетанием пропаргилового эфира (IV) в условиях реакции Соногаширы с *n*-иоднитробензолом в присутствии триэтиламина и CuI, PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> в качестве катализаторов. Реакция протекала при комнатной температуре в течение 3 ч с образованием соединения (XV), выделенного с выходом 89% после очистки колоночной хроматографией. В <sup>1</sup>H-ЯМР-спектре нитробензилэтильного производного (XV) наблюдаются сигналы протонов ароматического кольца в области δ 7.56–8.17 м.д., в <sup>13</sup>C-ЯМР-спектрах сигналы бензильных атомов углерода регистрируются в области δ 123.52–147.32 м.д. Синтез замещенных ацетиленовых производных малеопимаровой и дигидрохинопимаровой кислот (XVI), (XVII) выполнен согласно работе [27].

Однореакторный синтез 1,2,3-триазольного производного (XVIII) абиетиновой кислоты был осуществлен в два приема. Первоначально, при взаимодействии эквимольных количеств бензила бромида, триэтиламина и азид натрия при комнатной температуре в хлористом метиле получали бензилазид, который без выделения вводили в реакцию с пропаргиловым эфиром абиетиновой кислоты (IV) в присутствии CuI в качестве катализатора с образованием 1,4-дизамещенного 1,2,3-триазола (XVIII) с выходом 80%. В <sup>1</sup>H-ЯМР-спектре соединения (XVIII) отсутствовал сигнал протона ацетиленовой группы и наблюдался уширенный сигнал протона триазольного цикла при δ 7.52 м.д, который в HSQC и HMBC спектрах коррелировал с сигналами углеродных атомов C2' и C3' гетероциклического кольца в области 146.75 и 126.89 м.д. Сигналы ароматических протонов наблюдались при δ 7.15–7.40 м.д., в спектре <sup>13</sup>C-ЯМР присутствовали резонансные линии атомов углерода ароматического кольца в области 128.66–143.57 м.д. 1,2,3-Триазольные производные (XIX), (XX) малеопимаровой и дигидрохинопимаровой кислот получали согласно работе [28].

Скрининг противомикробной активности соединений (I)–(XX) проводили CO-ADD (The Community for Antimicrobial Drug Discovery), финансируемом Wellcome Trust (Великобритания) и Университетом Квинсленда (Австралия), на пяти бактериальных штаммах: *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853 и *Staphylococcus aureus* (*St. aureus*) ATCC 43300. Противогрибковую активность определяли на двух грибковых штаммах: *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 90028 и *Cryptococcus neoformans* (*Cr. neoformans*) ATCC 208821.

Первичный скрининг противомикробной активности проводили путем тестов на ингибирование размножения клеток, используя образцы в одной (32 мкг/мл) концентрации. Аликвоту каждого образца в DMSO помещали в 384-луночный планшет и обрабатывали соответствующей бактериальной культурой. Ингибирование роста бактерий определяли спектрофотометрически при 600 нм на монохромном микропланшетном ридере Tecan M1000 Pro. Процент ингибирования роста рассчитывали для каждой лунки с использованием отрицательного контроля (только для среды) и положительного контроля (бактерии без ингибиторов) на той же пластинке. В случае если наблюдалось ингибирование роста ≥80%, соединение считалось активным (табл. 1).

**Таблица 1.** Противомикробная активность *in vitro* соединений (I)–(XX) по отношению к патогенным микроорганизмам

Соединение	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
(I)	10.79	5.93	28.63	38.28	22.22	4.59	–30.81
(II)	12.87	7.65	–0.30	24.69	7.80	9.49	–29.23
(III)	26.67	13.60	12.59	13.71	17.13	12.31	–32.62
(IV)	–1.25	7.41	19.39	–4.24	30.73	8.12	–1.63
(V)	8.93	21.04	27.4	–0.2	38.38	5.64	9.00
(VI)	5.03	14.47	28.07	2.82	45.86	0.39	–2.12
(VII)	14.93	23.39	10.55	–1.61	11.30	13.08	–19.31
(VIII)	18.62	26.06	11.65	5.59	8.40	8.47	–7.69
(IX)	–1.5	1.61	13.65	–5.13	–16.97	8.12	–0.14
(X)	5.08	3.61	23.43	7.10	12.16	4.93	–23.80
(XI)	49.6	14.24	28.58	0.59	29.43	<b>98.34</b>	<b>106.20</b>
(XII)	–16.36	11.39	17.18	0.12	25.06	11.74	35.18
(XIII)	–1.50	1.61	13.65	–5.13	–16.97	8.12	–0.14
(XIV)	11.21	10.94	22.47	–6.38	38.16	<b>99.92</b>	<b>106.20</b>
(XV)	–5.12	1.43	12.89	–0.69	–34.85	5.46	6.53
(XVI)	32.21	7.31	7.73	3.32	8.92	–1.91	–51.55
(XVII)	11.55	14.71	3.75	8.25	–1.97	6.30	–66.24
(XVIII)	22.92	–1.23	10.27	13.11	2.89	4.78	–29.03
(XIX)	13.65	24.03	4.04	–2.04	–38.68	2.58	–20.46
(XX)	5.17	12.08	0.25	–0.39	8.51	4.16	–8.27

\* Приведена величина роста клеток (%) для концентрации соединений 32 мкг/мл.

При первичном скрининге противомикробной активности установлено, что исходные абиетиновая, малеопимаровая и дигидрохинопимаровая кислоты (I)–(III), а также пропаргильевые эфиры абиетиновой, 7-формилабиетиновой и дегидроабиетиновой кислот (IV)–(VI) не проявляют ни бактерицидной, ни фунгицидной активности в отношении исследуемых микроорганизмов. Кроме того, ацетиленовые производные дитерпеновых кислот, содержащие фрагменты диэтиламина, нитробензола и морфолина (VII)–(X), (XII), (XIII), (XV)–(XVII), соединения с 1,2,3-триазольным заместителем (XVIII)–(XX) также не показали значимой противомикробной активности. В то же время, введение пирролидинового фрагмента в структуру ацетиленовых производных с образованием соединений (XI), (XIV) приводит к появлению антибактериальной и фунгицидной активности, причем фунгицидный эффект проявляется в большей степени, чем бактерицидный. Так, соединение (XI) показало активность в отношении культур бактерии метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA), ингибируя его рост на 49%. Наиболь-

ший фунгицидный эффект у производных (XI), (XIV) был обнаружен по отношению к культурам грибов *C. albicans* и *Cr. neoformans* (ингибирование роста *C. albicans* составило 98% для соединения (XI) и 99% для соединения (XIV) соответственно; *Cr. neoformans* – более 100% для обоих соединений) (табл. 1).

Для оснований Манниха (XI), (XIV) была определена минимальная ингибирующая концентрация в отношении вышеуказанных культур бактерий и грибов, а также концентрация, вызывающая гибель 50% клеток почки эмбриона человека НЕК293 (ATCC CRL-1573) и концентрация, вызывающая 50%-й гемолиз эритроцитов человека (табл. 2).

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИС; мкг/мл) устанавливали в соответствии с рекомендациями Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), США), определяя наименьшую концентрацию, при которой было обнаружено полное ингибирование бактерий или грибов. Тесты проводили в двойном повторе. Соединение считалось активным при МИС ≤

Таблица 2. Противомикробная, цитотоксическая и гемолитическая активность соединений (XI), (XIV)

Соединение	MIC, мкг/мл			CC <sub>50</sub> , мкг/мл	HC <sub>50</sub> , мкг/мл
	<i>St. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Cr. neoformans</i>	HEK293	RBC
(XI)	32	16	16	16.5	>32
	32	16	8	18.8	>32
(XIV)	>32	16	16	10.2	>32
	>32	32	16	8.26	>32

≤ 16 мкг/мл в любой реплике ( $n = 2$  на разных пластинах).

Цитотоксическое действие определяли на клеточной линии эмбриональных почек человека HEK293 путем определения концентрации, вызывающей гибель 50% клеток (CC<sub>50</sub> (мкг/мл)). Ингибирование роста клеток HEK293 определяли, измеряя флуоресценцию после добавления 5 мкл (25 мкг/мл) резазурина (конечная концентрация 2.3 мкг/мл) и после инкубации в течение еще 3 ч при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием монохромного микропланшетного ридера Tecan M1000 Pro и автоматического вычисления коэффициента усиления. Соединение считалось токсичным при CC<sub>50</sub> ≤ 32 мкг/мл.

Гемолитическую активность (HC<sub>50</sub> (мкг/мл) – концентрация при 50%-м гемолизе) определяли путем измерения при 405 нм поглощения супернатанта – надосадочной жидкости, образованной после инкубации в течение 1 ч при 37°C планшетов, содержащих образцы соединений с добавленными к ним промытыми клетками крови человека, и последующего центрифугирования при 1000 об./мин в течение 10 мин. Абсорбцию измеряли с использованием монохромного микропланшетного ридера Tecan M1000 Pro. Образцы, обладающие гемолитической активностью, были охарактеризованы при HC<sub>50</sub> ≤ 32 мкг/мл.

Из табл. 2 следует, что соединение (XI) обладает умеренной активностью в отношении метициллин-резистентных бактерий *St. aureus* (MIC = 32 мкг/мл), соединение (XIV) имеет более слабое антимикробное действие в отношении указанной бактерии (MIC > 32 мкг/мл). Оба соединения показали также способность ингибировать рост исследуемых грибковых культур – в отношении *C. albicans* минимальная ингибирующая концентрация для обоих соединений составила 16 мкг/мл и в отношении *Cr. neoformans* – 8–16 мкг/мл для соединения (XI) и 16 мкг/мл для соединения (XIV) соответственно.

Для определения общей токсичности соединений (XI), (XIV) для клеток и специфичности действия в качестве потенциальных противогрибковых средств было изучено их действие на клеточную линию почки эмбриона человека и на эритроциты крови. Результаты исследования гемолитической активности соединений (XI), (XIV) показали, что они не оказывают влияния на эритроциты человеческой крови даже при максимально тестируемой концентрации >32 мкг/мл. Величины значений цитотоксичности (CC<sub>50</sub>) исследуемых соединений (XI), (XIV) оказались сравнимы со значениями минимальных ингибирующих концентраций в отношении грибов *C. albicans* и *Cr. neoformans*, что позволяет предположить, что эти соединения не обладают четкой селективностью в отношении клеток микробов или человека (табл. 2).

Таким образом, исследованы антибактериальные и фунгицидные свойства ряда синтезированных ацетиленовых и гетероциклических производных дитерпеновых кислот. Установлено, что пирролидиновые производные абиетиновой и дегидроабиетиновой кислот способны эффективно ингибировать рост патогенных грибов *C. albicans* и *Cr. neoformans*, обладают низкой гемолитической активностью, но плохой избирательностью к бактериальным клеткам и клеткам человека. Эти результаты свидетельствуют о потенциале оснований Манниха, полученных на основе производных смоляных кислот, в качестве отправной точки для поиска новых перспективных классов противогрибковых препаратов после более широких исследований и решения задачи снижения токсичности полученных соединений.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры <sup>1</sup>H- и <sup>13</sup>C-ЯМР регистрировали на спектрометре “Bruker” Avance III (500.13 (<sup>1</sup>H) и 125.47 МГц (<sup>13</sup>C)) в CDCl<sub>3</sub>, внутренний стандарт – тетраметилсилан (δ, м.д., J, Гц). ИК-спектры твердых веществ регистрировали в вазелиновом масле, жидких – в тонком слое на спектрофотомет-

ре “Bruker Vertex 70 v” (диапазон 4000–500 см<sup>-1</sup>). Температуры плавления определены на приборе РНМК 80/2617 (столик Кофлера). ТСХ проводили на пластинах Сорбфил (ЗАО Сорбполимер, Россия), используя систему растворителей гексан–этилацетат, 1 : 1. Вещества обнаруживали 10% раствором серной кислоты с последующим нагреванием при 100–120°C в течение 2–3 мин. Абиетиновая (I) [29], малеопимаровая (II) [30], дигидрохинопимаровая (III) [31] кислоты были получены по ранее описанным методикам. Синтез соответствующих пропаргиловых эфиров (IV)–(VI) абиетиновой, 7-формилабиетиновой и дегидроабиетиновой кислот, а также оснований Манниха (VII)–(XIV) описан в работе [17]. Замещенные ацетиленовые (XVI), (XVII) и 1,2,3-триазольные (XIX), (XX) производные малеопимаровой и дигидрохинопимаровой кислот получали согласно работам [27, 28].

**3-(4-Нитрофенил)проп-2-ин-1-ил-абиета-7,13-диен-20-оат (XV).** К раствору 0.34 г (1.0 ммоль) пропаргилового эфира абиетиновой кислоты (IV) и 0.25 г (1 ммоль) *n*-иоднитробензола в 30 мл DMF при перемешивании последовательно добавляли 0.02 г (0.11 ммоль) CuI, 0.07 г (0.06 ммоль) PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> и 0.16 мл (1.1 ммоль) триэтиламина. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч, затем промывали 5% раствором HCl (3 × 20 мл), водой (2 × 100 мл), сушили над CaCl<sub>2</sub>. Растворитель упаривали, продукт реакции хроматографировали на колонке с Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, элюируя хлористым метиленом. Выход: 0.37 г (81%). Т. пл. 101–103°C. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР: 0.81 (3 H, с, H18), 0.83–0.89 (2 H, м, H1), 1.01 (3 H, д, *J* 6.9, H15), 1.02 (3H, д, *J* 6.9, H16), 1.22 (3H, с, H19), 1.28–2.22 (13H, м, H2, H3, H5, H6, H9, H11, H12, H14), 4.88 (2H, с, H1'), 5.34 (1H, с, H7), 5.77 (1H, с, H17), 7.56 (2H, д, *J* 8.5, H<sub>Ar</sub>), 8.17 (2H, д, *J* 8.5, H<sub>Ar</sub>). Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР: 14.01 (C18), 16.99 (C19), 18.01 (C2), 20.85 (C15), 21.42 (C16), 22.46 (C11), 25.63 (C6), 27.46 (C12), 34.54 (C10), 34.57 (C14), 36.99 (C3), 38.25 (C1), 45.17 (C5), 46.74 (C4), 50.91 (C9), 52.45 (C1'), 84.17 (C2'), 88.88 (C3'), 120.42 (C7), 122.35 (C17), 123.52 (C6''), 124.82 (C6''), 129.10 (C4'), 132.58 (C5'), 135.58 (C5''), 138.67 (C8), 145.43 (C13), 147.32 (C7'), 177.59 (C20). Найдено, %: C 75.02; H 7.88; N 3.20. C<sub>29</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>4</sub>. Вычислено, %: C 75.46; H 7.64; N 3.03.

**(1-Бензил-1H-1,2,3-триазол-4-ил)метилабиета-7,13-диен-20-оат (XVIII).** Смесь 0.7 мл (1 ммоль) триэтиламина, 0.07 г (1 ммоль) азида натрия и 0.25 мл (1 ммоль) бензилбромид в 10 мл хлористого метилена перемешивали в течение 30 мин при комнатной температуре. К смеси добавляли 0.34 г (1 ммоль) пропаргилового эфира абиетиновой кислоты (IV) и 0.013 г йодида меди (I) и перемешивали 8 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь выливали в 50 мл воды, экс-

трагировали хлороформом (2 × 50 мл), экстракт промывали водой до нейтральной реакции, сушили над CaCl<sub>2</sub>. Растворитель упаривали, продукт реакции хроматографировали на колонке с силикагелем, элюент – гексан – этилацетат, 40 : 1, 20 : 1, 1 : 1. Выход: 0.39 г, (84%). Т. пл. 120–122°C. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР: 0.85–0.92 (2H, м, H1), 1.17 (3H, с, H18), 1.20 (3H, д, *J* 6.9, H15), 1.25 (3H, д, *J* 6.9, H16), 1.27 (3H, с, H19), 1.30–2.32 (13H, м, H2, H3, H5, H6, H9, H11, H12, H14), 5.14–5.17 (2H, м, H1'), 5.26–5.28 (2H, м, H4'), 5.55 (1H, с, H7), 6.85 (1H, с, H17), 7.15–7.40 (5H, м, H<sub>Ar</sub>), 7.52 (1H, с, H3'). Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР: 16.48 (C18), 16.79 (C19), 18.53 (C2), 21.61 (C11), 23.99 (C15), 24.01 (C16), 25.17 (C6), 29.94 (C12), 33.47 (C10), 33.49 (C14), 36.37 (C3), 36.92 (C1), 37.99 (C5), 44.82 (C4), 47.57 (C9), 54.19 (C4'), 57.76 (C1'), 123.55 (C7), 124.17 (C17), 126.89 (C3'), 128.06 (C6', C6''), 128.83 (C8'), 129.17 (C7', C7''), 134.62 (C8), 143.57 (C5'), 145.69 (C13), 146.75 (C2'), 178.41 (C20). Найдено, %: C 75.02; H 8.44; N 9.10. C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено, %: C 76.07; H 8.30; N 8.87.

#### Биологическая Часть

**Скрининг антибактериальной активности** проводили в Институте молекулярной биологии университета Квинсленда (The Institute for Molecular Bioscience of the University of Queensland, Australia) методом серийных разведений. Образцы готовились в DMSO в тестовой концентрации 32 мкг/мл. Все бактерии культивировались на агаре Мюллера Хинтона (Mueller Hinton) при 37°C в течение ночи. Образец каждой культуры затем разбавляли в 40 раз и инкубировали при 37°C в течение 1.5–3 ч. Полученные культуры добавляли в каждую лунку 384-луночного планшета, содержащую исследуемый образец (плотность клеток 5 × 10<sup>5</sup> КОЕ/мл и общий объем 50 мкл). Все планшеты накрывали и инкубировали при 37°C в течение 18 ч без встряхивания. Ингибирование роста бактерий определяли измерением поглощения при 600 нм с использованием монохромного микропланшетного ридера Tecan M1000 Pro. Процент ингибирования роста рассчитывался для каждой лунки с использованием отрицательного контроля (только для среды) и положительного контроля (бактерии без ингибиторов) на той же пластине.

Значения ингибирования определяли с помощью модифицированных Z-показателей, рассчитанных с использованием медианы и медианного абсолютного отклонения (MAD) образцов (без контроля) на той же пластине. Образцы с величиной ингибирования выше 80% и Z-оценкой выше 2.5 для обеих реплик классифицировали как активные вещества. Образцы с показателями ингибирования от 50 до 80% и Z-оценкой выше 2.5 для обеих реплик классифицировали как частично активные.

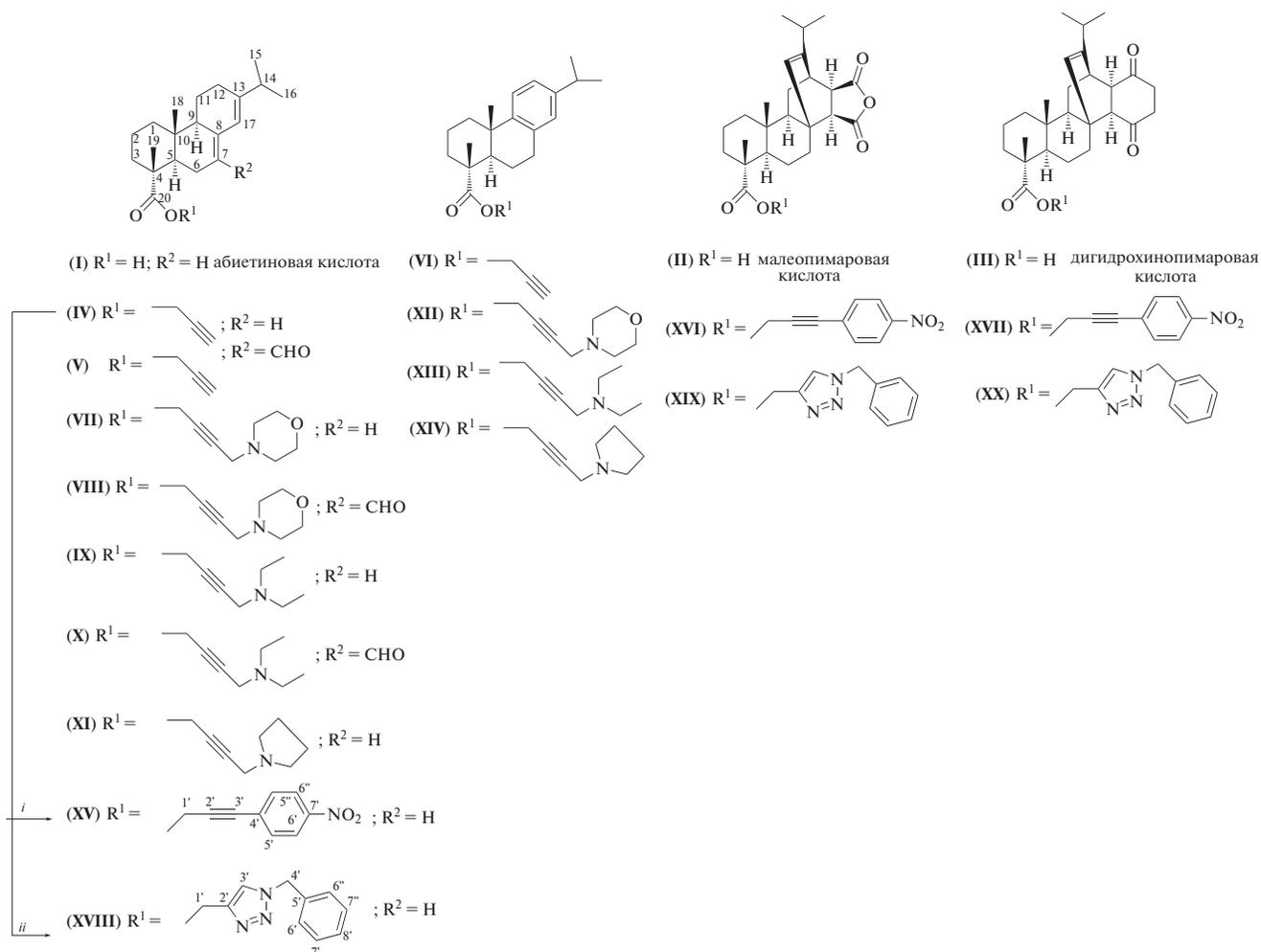


Схема 1. Условия: *i*. -NO<sub>2</sub>, PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CuI, TEA, DMF, 20°C;

*ii*. 1. , NaN<sub>3</sub>, TEA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2. CuI, 20°C.

В качестве положительных стандартов бактериального ингибирования для грамотрицательных и грамположительных бактерий были использованы колистин и ванкомицин, соответственно, в качестве стандартного ингибитора гриба для *C. albicans* и *Cr. neoformans* использовали флуконазол.

**Цитотоксическое действие *in vitro*** оценивали на клеточной линии эмбриональных почек человека HEK293 путем определения концентрации, вызывающей гибель 50% клеток (CC<sub>50</sub>). Ингибирование роста клеток HEK293 определяли, измеряя флуоресценцию после добавления 5 мкл (25 мкг/мл) резазурина (конечная концентрация 2.3 мкг/мл) и после инкубации в течение еще 3 ч при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Интенсивность флуоресцен-

ции измеряли с использованием монохромного микропланшетного ридера Tecan M1000 Pro с использованием автоматического вычисления коэффициента усиления. Положительным стандартом цитотоксичности служил препарат тамоксифен.

**Гемолитическую активность** определяли путем измерения при 405 нм поглощения супернатанта — надосадочной жидкости, образованной после инкубации в течение 1 ч при 37°C планшетов, содержащих образцы соединений с добавленными к ним промытыми клетками крови человека, и последующего центрифугирования при 1000 об./мин в течение 10 мин. Абсорбцию измеряли с использованием монохромного микропланшетного ридера Tecan M1000 Pro. В качестве положительного ге-

молитического стандарта был использован препарат мелиттин.

**Методика тестирования противомикробной, фунгицидной, цитотоксической и гемолитической активности *in vitro* соединений** приведена также на сайте <http://www.co-add.org>.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках проектной части государственного задания (АААА-А19-119022290012-3), при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-43-020021 р\_а). Структурные исследования соединений (IV–VII) проведены в Центре коллективного пользования “Агидель” при Институте нефтехимии и катализа РАН. Антимикробный скрининг соединений (II–VI) был проведен CO-ADD (The Community for Antimicrobial Drug Discovery), при поддержке Wellcome Trust (Великобритания) и университета Квинсланда (Австралия).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Magiorakos A.-P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J. F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. // Clin. Microbiol. Infect. 2012. V. 18(3). P. 268–281.
- Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. // J. Nat. Prod. 2003. V. 66. P. 1022–1037.
- Толстиков Г.А., Толстикова Т.Г., Шульц Э.Э., Толстиков С.Е., Хвостов М.В. Смоляные кислоты хвойных России. Химия, фармакология. Новосибирск: Академическое изд-во “ГЕО”, 2011. С. 395.
- Xu H.T., Liu L.L., Fan X.T., Zhang G.J., Li Y.C., Jiang B. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. V. 27. P. 505–510.
- Huang X.-Ch., Wang M., Pan Y.-M., Yao G.-Y., Zhang Y. // Eur. J. Med. Chem. 2013. V. 69. P. 508–520.
- González M. A., Correa-Royero J., Agudelo L., Mesa A., Betancur-Galvis L. // Eur. J. Med. Chem. 2009. V. 44. P. 2468–2472.
- Hou W., Luo Zh., Zhang G., Cao D., Li D., Ruan H., Ruan B.H., Su L., Xu H. // Eur. J. Med. Chem. 2017. V. 138. P. 1042–1052.
- Olmo F., Guardia J. J., Marin C., Messouri I., Rosales M. J., Urbanova K., Chayboun I., Chahboun R., Alvarez-Manzaneda E.J., Sánchez-Moreno M. // Eur. J. Med. Chem. 2015. V. 89. P. 683–690.
- Pertino M.W., Vega C., Rolón M., Coronel C., De Arias A.R., Schmeda-Hirschmann G. // Molecules. 2017. V. 22. P. 369–379.
- Zhang W.M., Yang T., Pan X.Y., Liu X.L., Lin H.X., Gao Z.B., Yang C.G., Cui Y.M. // Eur. J. Med. Chem. 2017. V. 127. P. 917–927.
- Berger M., Roller A., Maulide N. // Eur. J. Med. Chem. 2017. V. 126. № 27. P. 937–943.
- Helpenstein A., Vahermo M., Nawrot D.A., Demirci F., Iscan G., Krogerus S., Yli-Kauhaluoma J., Moreira V.M., Tammela P. // Bioorg. Med. Chem. 2017. V. 25. P. 132–137.
- Hou W., Zhang G., Luo Zh., Li D., Ruan H., Ruan B. H., Su L., Xu H. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. V. 27. P. 5382–5386.
- Caetano da Silva S.D., Mendes de Souza M.G., Oliveira Cardoso M.J., da Silva Moraes T., Ambrósio S.R., Sola Veneziani R.C., Martins C.H.G. // Anaerobe. 2014. V. 30. P. 146–152.
- Chen N., Duan W., Lin G., Liu L., Rui Z., Li D. // Mol. Divers. 2016. V. 20. P. 897–905.
- Manner S., Vahermo M., Skogman M. E., Krogerus S., Vuorela P.M., Yli-Kauhaluoma J., Fallarero A., Moreira V.M. // Eur. J. Med. Chem. 2015. V. 102. P. 68–79.
- Tret'yakova E.V., Zakirova G.F., Salimova E.V., Kukovinets O.S., Odinokov V.N., Parfenova L.V. // Med. Chem. Res. 2018. V. 27. P. 2199–2213.
- Ковалева К.С., Яровая О.И., Шернюков А.В., Зарубаев В.В., Штро А.А., Оршанская Я.Р., Салахутдинов Н.Ф. // Химия гетероцикл. соед. 2017. Т. 53. С. 364–370.
- Manner S., Vahermo M., Skogman M.E., Krogerus S., Vuorela P.M., Yli-Kauhaluoma J., Fallarero A., Moreira V.M. // Eur. J. Med. Chem. 2015. V. 102. P. 68–79.
- Aranda F. J., Villalaín J. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1327. P. 171–180.
- Ganewatta M.S., Miller K.P., Singleton S.P., Mehrpouya-Bahrami P., Chen Y.P., Yan Y., Nagarkatti M., Nagarkatti P., Decho A.W., Tang C. // Biomacromolecules. 2015. V. 16. P. 3336–3344.
- González M.A. // Eur. J. Med. Chem. 2014. V. 87. P. 834–842.
- Sekido H., Takezawa J.-I., Motoki G., Akatsuka T. // Agric. Biol. Chem. 1990. V. 54. P. 287–290.
- Tret'yakova E.V., Smirnova I.E., Salimova E.V., Odinokov V.N. // Bioorg. Med. Chem. 2015. V. 23. P. 6543–6550.
- Третьякова Е.В., Смирнова И.Е., Салимова Е.В., Пашкова Т.М., Карташова О.Л., Одинокоев В.Н., Парфенова Л.В. // Биоорганич. хим. 2017. Т. 43. С. 317–323.
- Третьякова Е.В., Салимова Е.В., Парфенова Л.В. // Биоорганич. хим. 2018. Т. 44. С. 554–559.

27. Третьякова Е.В., Салимова Е.В., Парфенова Л.В., Одинокоев В.Н. // Ж. орган. химии. 2016. Т. 52. С. 1496–1502.
28. Третьякова Е.В., Салимова Е.В., Шакурова Э.Р., Парфенова Л.В., Одинокоев В.Н. // Ж. орган. химии. 2017. Т. 53. С. 1664–1667.
29. Nong W., Chen X., Liang J., Wang L., Tong Zh., Huang K., Wu R., Xie Q., Jia Y., Li K. // Adv. Mat. Res. 2014. V. 887–888. P. 551–556.
30. Zalkov L.U., Ford R.A., Cutney J.P. // J. Org. Chem. 1962. V. 27. P. 3535–3539.
31. Herz W., Blackstone R.C., Nair M.G. // J. Org. Chem. 1967. V. 32. P. 2992–2998.

## Synthesis, Antimicrobial and Antifungal Activity of Resin Acid's Acetylene Derivatives

E. V. Tretyakova<sup>\*,#</sup>, E. V. Salimova<sup>\*</sup>, and L. V. Parfenova<sup>\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (347) 284-27-50; e-mail: tretyakovaelv@gmail.com

<sup>\*</sup>Institute of Petrochemistry and Catalysis of the Russian Academy of Sciences, pr. Oktyabrya 141, Ufa, 450075 Russia

A series of diterpenes containing morpholine, pyrrolidine, benzyl, nitrophenyl and 1,2,3-tetrazole heterocyclic fragments were obtained on the basis of abietic, 7-formylabietic, dehydroabietic, maleopimaric and dihydroquinopimaric acid's acetylene derivatives. Antibacterial activity against microorganisms and pathogenic fungi was studied *in vitro*; the primary assessment of the synthesized compounds cytotoxicity and haemolytic activity was carried out as well. The ability of abietic and dehydroabietic acids acetylenic derivatives with pyrrolidine substituent to effectively inhibit the growth of fungi *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*, exhibiting low hemolytic activity, was shown.

**Keywords:** diterpenoids, abietic acid, dehydroabietic acid, 7-formylabietic acid, maleopimaric acid, dihydroquinopimaric acid, antibacterial activity, fungicidal activity.