

DOI: 10.33184/dokbsu-2019.6.7

Синтез и цитотоксичность N-этил/метилпиперазиниламидов бетулиновой и глицирретовой кислот

Г. В. Гиниятуллина^{1*}, И. И. Авзалова², А. С. Буранбаева²,
З. Р. Зилеева³, Т. В. Иванова³

¹Уфимский институт химии УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71.

²Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

³Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, проспект Октября, 71.

*Email: gulnaravlg@gmail.com

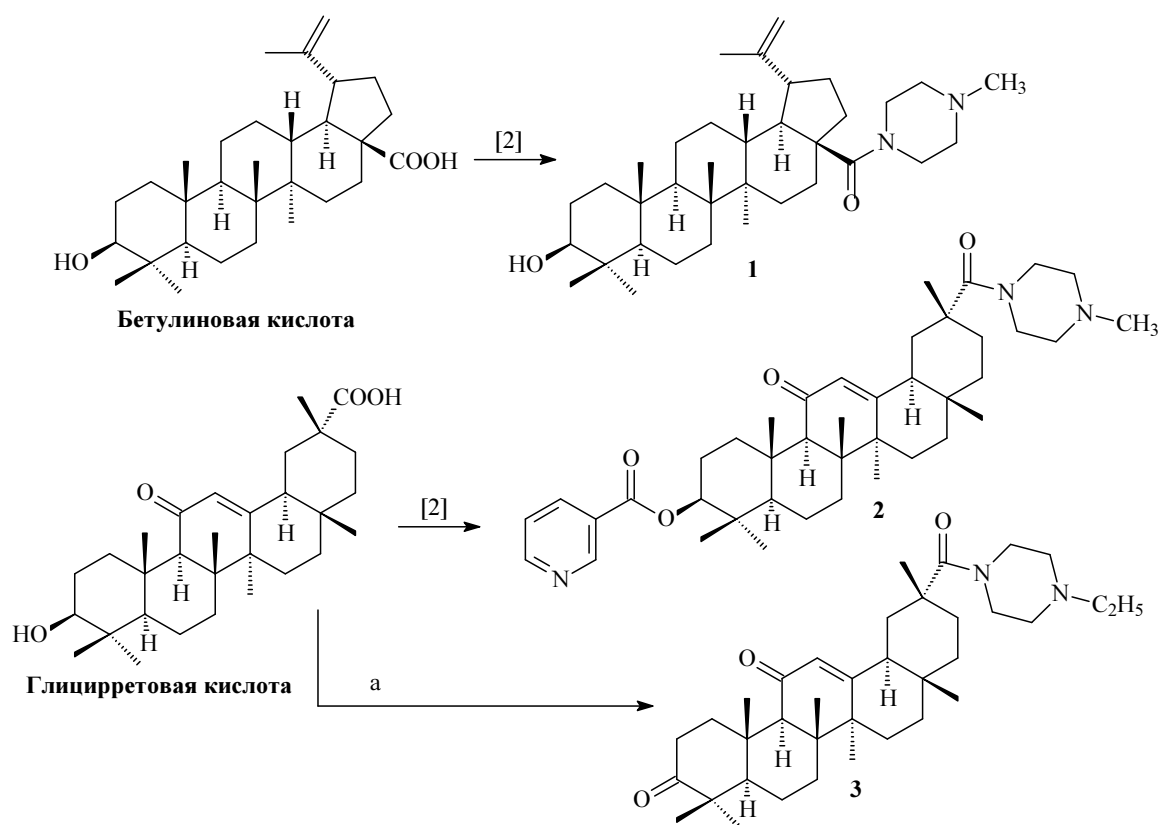
Осуществлен синтез N-этилпиперазиниламида глицирретоновой кислоты. Изучение цитотоксичности показало, что N-этил- и N-метилпиперазиниламиды бетулиновой и глицирретовой кислот обладают активностью в отношении раковых клеток, при этом N-метилпиперазиниламиды подавляют жизнеспособность опухолевых клеток более эффективно.

Ключевые слова: тритерпеноиды, N-этилпиперазиниламид, N-метилпиперазиниламид, противоопухолевая активность.

Пентациклические тритерпеноиды широко распространены в природе и являются эффективными субстратами для синтеза разнообразных по структуре производных и изучения их противораковой активности [1]. Одной из важных фармакофорных групп при модификации тритерпеноидов является пиперазинильный фрагмент. Установлено что N-этил/метилпиперазиниламиды бетулиновой и дигидробетулиновой кислот проявляют выраженную противоопухолевую активность [2–4], аналогичный амидазепанобетулиновой кислоты обладает противоопухолевой активностью *in vitro* в отношении ряда линий раковых клеток и имеет потенциал в качестве антибактериального агента [5]. Пиперазинил- и 3,23-дигидроксипиперазиниламиды бетулиновой кислоты показали высокую цитотоксичность [6, 7]. Ацетилпиперазиниламиды урсоловой, олеаноловой, глицирретовой, платановой, бетулиновой и маслиниковой кислот проявляют низкие значения EC₅₀ для опухолевых клеток человека [8]. Таким образом, высокий потенциал пиперазиниламидов тритерпеновых кислот явился стимулом для разработки новых соединений такого типа.

В настоящей работе сообщается о синтезе N-этилпиперазиниламида глицирретоновой кислоты и изучении цитотоксичности ряда аналогичных производных. На первой ста-

дии провели окисление глицирретовой кислоты пиридинийхлорхроматом, затем получили хлорангидрид по описанной ранее методике [9], который ввели в реакцию с N-этилпиперазином в среде хлороформа в присутствии Et₃N с образованием амида **3** (рис. 1), его структура установлена методом ЯМР спектроскопии. В спектре присутствовал сигнал амидной связи (δ 173.8 м.д. ЯМР ¹³C) и N-этилпиперазинильного фрагмента (δ 2.21–2.31, 2.37, 2.46, 2.49–2.61, 2.81–2.92 м.д. ЯМР ¹H).



Реагенты и условия: а. 1. PCC, ацетон, 30 мин, 25 °С; 2. (COCl)₂, CHCl₃, 2 ч, 25 °С; 3. N-этилпиперазин, Et₃N, CHCl₃, 3 ч, 61 °С.

Рис. 1. Синтез соединений **1–3**.

Изучение цитотоксичности соединений **1–3** проведено в отношении клеток эмбриональной почки человека HEK293, аденокарциномы легких А-549, карциномы молочной железы MCF-7, нейробластомы SH-SY5Y в опытах *invitro* (Таблица 1). Установлено, что соединения **1–3** обладают цитотоксической активностью в отношении как условно-нормальных клеток, так и клеточных линий опухолевого происхождения. Отметим более выраженную способность амидов **1** и **2** подавлять жизнеспособность опухолевых клеток по сравнению с N-этилпиперазиламидами глицирретоновой кислоты **3**.

Таким образом, впервые осуществлен синтез N-этилпиперазиламида глицирретоновой кислоты **3**. Изучение цитотоксичности показало, что амиды **1–3** обладают ак-

тивностью в отношении раковых клеток, при этом амиды **1** и **2** подавляют жизнеспособность опухолевых клеток более эффективно.

Таблица 1. Цитотоксическая активность соединений **1–3** *invitro*

Соединение	IC ₅₀ , мкМ			
	HEK293	A-549	MCF-7	SH-SY5Y
1	10.60 ± 1.55	11.71 ± 0.13	6.79 ± 0.34 (p=0.001)	6.06 ± 0.17 (p=0.0003)
2	18.08 ± 1.99	16.92 ± 0.91	8.21 ± 1.62 (p=0.00006)	13.34 ± 1.86 (p=0.005)
3	101.83 ± 25.56	>100	>100	>100

Примечания. Данные представлены в виде среднего арифметического ± стандартное отклонение (N=2). а – различия значений IC₅₀, определенных для клеточных линий опухолевого происхождения относительно значений IC₅₀, определенных для условно-нормальных клеток (HEK293); однофакторный парный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Даннета.

Экспериментальная часть

Спектры ЯМР ¹H и ¹³C регистрировали на спектрометре “Bruker AM-300” (Германия, 300 и 75.5 МГц соответственно, δ, м.д., КССВ, Гц) в CDCl₃, внутренний стандарт тетраметилсилан. Элементный анализ осуществляли на CHNS-анализаторе EuroEA-3000, основной стандарт ацетанилид. Температуры плавления определяли на микростолике “Boetius”. Оптическое поглощение измеряли на поляриметре “Perkin-Elmer 241 MC” (Германия) в трубке длиной 1 дм. ТСХ-анализ проводили на пластинках Сорбфил (ЗАО Сорбполимер, Россия), используя систему растворителей хлороформ-этилацетат, 40:1. Вещество обнаруживали 10% раствором серной кислоты с последующим нагреванием при 100–120 °C в течение 2–3 мин. N-этилпиперазин и глицирретовая кислота производства AldrichChemicalCo. Соединения **1** и **2** получали согласно [2].

3,11-Диоксо-20-(4-этилпиперазин-1-ил)карбонилолеан-12(13)-ен (3). К раствору (1 ммоль) хлорангидрида глицирретоновой кислоты в 30 мл сухого CHCl₃ добавляли 0.1 мл (1 ммоль) N-этилпиперазина, прикапывали 3 капли Et₃N, кипятили с обратным холодильником 3 ч. Реакционную смесь промывали 5% раствором HCl (2 × 50 мл), водой (50 мл), сушили над CaCl₂, растворитель упаривали в вакууме. Выход 0.43 г (76%). R_f 0.19. Т. пл. 110 °C. [α]_D²⁰ +236° (с 0.01, CHCl₃). Найдено, %: С 76.14; Н 9.75; N 4.63. C₃₆H₅₆N₂O₅ (М 564.854). Вычислено, %: С 76.55; Н 9.99; N 4.96. Спектр ¹H ЯМР: 0.92, 0.98, 1.03, 1.07, 1.12, 1.18, 1.31 (21H, 7 с, 7CH₃), 1.22–2.04 (18H, м, CH₂, CH), 2.21–2.31 (2H, м, Н7'), 2.37 (3H, с, 8'-CH₃), 2.46 (1H, с, Н19), 2.49–2.61 (4H, м, Н3', Н5'), 2.81–2.92 (4H, м, Н2',

H6'), 3.52–3.69 (1H, м, H18), 5.71 (1H, с, H12). Спектр ¹³C ЯМР: 15.8, 15.9, 16.8, 19.3, 19.6, 20.9, 21.6, 22.9, 26.9, 28.5, 29.6, 31.7, 32.2, 32.6, 33.0, 34.2, 35.3, 36.7, 37.7, 39.8, 40.6, 42.1, 42.4, 43.4, 45.1, 47.6, 48.1, 52.2, 53.4, 55.2, 61.0 (C9), 128.3 (C12), 170.1 (C13), 173.8 (C28), 199.3 (C11), 217.1 (C3).

Клетки линии НЕК293, А-549, МСF-7, SH-SY5Y культивировали в среде ДМЕМ (Биолот, Россия) в присутствии 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 2 мМ L-глутамина 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 1/9 объема культуры. Флуоресценцию красителя измеряли при длине волны 590 нм, используя мультипланшетный анализатор «2300 EnSpire® MultimodePlateReaders» (PerkinElmer, США). Значение концентрации соединений IC₅₀ определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения «GraphPadPrism v.5.02» (GraphPad-SoftwareInc., США). Данные, полученные в 2-х независимых экспериментах, выражали в виде среднего значения 3-х измерений для каждой концентрации ± стандартное отклонение, по отношению к значениям контроля (0.1% ДМСО), принятого за 100%.

Работа выполнена по теме Госзадания № АААА-А19-119020890014-7.

Литература

1. Salvador J. A. R., Leal A. S., Valdeira A. S., Gonçalves B. M. F., Alho D. P. S., Figueiredo S. A. C., Silvestre S. M., Mendes V. I. S. Oleanane-, ursane-, and quinonemethidefriedelane-type triterpenoid derivatives: Recent advances in cancer treatment. // Eur. J. Med. Chem. 2017. Vol. 142.No. 1. Pp. 95–130.
2. Kazakova O. B., Giniyatullina G. V., Tolstikov G. A., Medvedeva N. I., Utkina T. M., Kartashova O. L. Synthesis, modification, and antimicrobial activity of the N-methylpiperazinyl amides of triterpenic acids. // Rus. J. Bioorg. Chem. 2010.Vol. 36.No. 3.Pp. 383–389
3. Свидетельство об официальной регистрации базы данных No. 2445317. N-Этилпиперазиламидбетулоновой кислоты как противоопухолевое средство тритерпеновой природы. / Покровский А. Г., Покровский М. А., Майнагашев И. Я., Салахутдинов Н. Ф., Толстиков Г. А. (RU). Зарегистрировано в Реестре баз данных от 28.10.2010.
4. Свидетельство об официальной регистрации базы данных No. 2448115. Гидрированная бетулоновая кислота и ее амиды как противоопухолевые средства тритерпеновой природы. / Покровский А. Г., Покровский М. А., Майнагашев И. Я., Салахутдинов Н. Ф., Толстиков Г. А. (RU). Зарегистрировано в Реестре баз данных от 20.12.2010.
5. Giniyatullina G. V., Kazakova O. B., Baikova I. P., Yamansarov E. Yu., Osterman I. A., Komarova E. S., Skvortsov D. A., Saltikova I. V., Majouga A. G., Ivanenkov Y. A. Synthesis and cytotoxicity of azepanobetulinic acid N-methylpiperazinylamide // Nat. Prod. Comm. 2019. Vol. 14. No. 7. Pp. 1–5.

6. Lan P., Wang J., Zhang D. M., Shu C., Cao H. H., Sun P. H., Wu X. M., Ye W. C., Chen W. M. Synthesis and antiproliferative evaluation of 23-hydroxybetulinic acid derivatives. // Eur. J. Med. Chem. 2011. Vol. 46.No. 6. Pp. 2490–2502.
7. Bildziukevich U., Vida N., Rárová L., Kolář M., Šaman D., Havlíček L., Drašar P., Wimmer Z. Polyamine derivatives of betulinic acid and β -sitosterol: A comparative investigation. // Steroids. 2015. Vol. 100. No. 1.Pp. 27–35.
8. Sommerwerk S., Heller L., Kerzig C., Kramell A. E., Csuk R. Rhodamine B conjugates of triterpenoic acids are cytotoxic mitocans even at nanomolar concentrations. // Eur. J. Med. Chem. 2017. Vol. 127.No. 1. Pp. 1–9.
9. Flekhter O. B., Boreko E. I., Nigmatullina L. R., Tret'yakova E. V., Pavlova N. L., Baltina L. A., Nikolaeva S. N., Savinova O. V., Galin F. Z., Tolstikov G. A. Synthesis and antiviral activity of ureides and carbamates of betulinic acid and its derivatives. // Rus. J. Bioorg. Chem. 2003.Vol. 29.No. 6.Pp. 655–661.

Статья рекомендована к печати кафедрой технической химии и материаловедения Башкирского государственного университета (д-р. техн. наук, доц. А. А. Мухамедзянова)

Synthesis and cytotoxicity of N-ethyl/methylpiperazinylamides of betulinic and glycyrrhetic acids

G. V. Giniyatullina^{1*}, I. I. Avzalova², A. S. Buranbaeva²,
Z. R. Zileeva³, T. V. Ivanova³

¹*Ufa Institute of Chemistry, Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Science
71 Oktyabrya Avenue, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

²*Bashkir State University
32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

³*Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences
71 Oktyabrya Avenue, 450054, Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.*

*Email: gulnaravlg@gmail.com

The synthesis of N-ethylpiperazinylamideglycyrrhetic acid was carried out. A study of cytotoxicity has shown that N-ethyl- and N-methylpiperazinylamides of betulinic and glycyrrhetic acids have activity against cancer cells, but N-methylpiperazinylamides inhibit tumor cell viability more efficiently.

Keywords: triterpenoids, N-ethylpiperazinylamide, N-methylpiperazinylamide, cytotoxic activity.