

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУ-
ДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра органической и биорганической химии
наименование кафедры

**Синтез и антибактериальная активность арилгидразонов
имидазо[1,2-а]дiazобициклоалканонов**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента (ки) II курса 251 группы

направления 04.04.01 – «Химия»

Институт Химии

Демешко Ильи Александровича
фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

доцент, к.х.н.
должность, уч. степень, уч. звание

Зав. кафедрой

профессор, д.х.н., профессор
должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

подпись, дата

В.С. Гринёв
инициалы, фамилия

А.Ю.Егорова
инициалы, фамилия

Саратов 2024

Актуальность работы. Инфекционные заболевания являются основной причиной смертности во всем мире, и существует растущая потребность в новых противоинфекционных средствах для борьбы с мультирезистентными штаммами бактерий. В настоящее время одной из актуальных проблем, стоящих перед человечеством, является возрастающая устойчивость штаммов бактерий к антибиотикам и антибактериальным средствам. Эта устойчивость в первую очередь объясняется их чрезмерным использованием и многочисленными мутациями. Для повышения бактерицидной эффективности применяются различные методы, например, такие как введение в структуру углеводородных цепей разной длины и повышение липофильности.

Цель работы: Разработка и проведение модификации акрилгидразонов оксазол-5(4H)-она посредством реакции нуклеофильного присоединения для повышения биодоступности и антибактериальной активности.

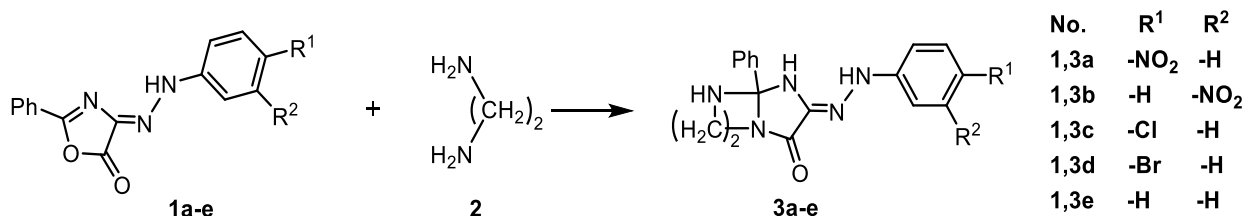
Работа выполнена на 51 странице машинописного текста. Состоит из введения, 3 глав, выводов. Содержит 3 таблицы, 3 рисунка, инструкцию по охране труда и технике безопасности, список использованных источников (содержит 50 наименований).

Основное содержание работы

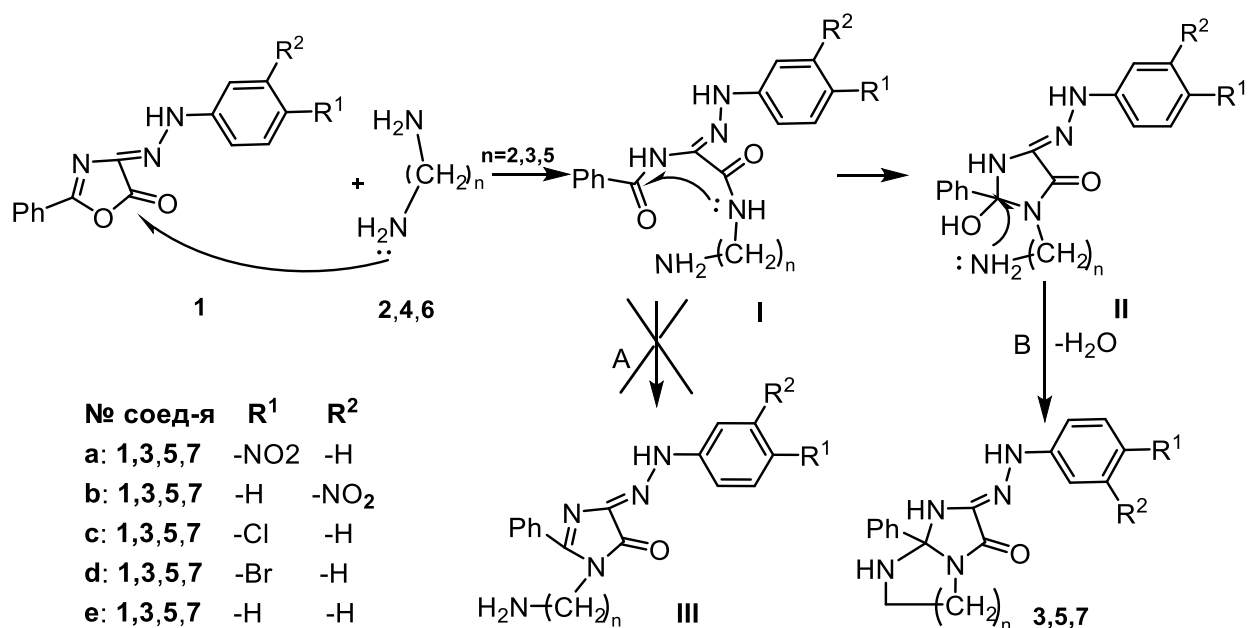
Первая глава выпускной квалификационной работы посвящена литературному обзору, который включает в себя общую информацию о производных имидазолидин-4-онов, а также реакции оксазол-5(4H)-онового кольца с моно- и бинуклеофилами.

1. Реакции нуклеофильного присоединения 1,2-этандиамина к производным арилгидразонов оксазол-5(4H)-она

Впервые проведена реакция нуклеофильного присоединения 1,2-этандиамина к арилгидразонам оксазол-5(4H)-она проводилась в плоскодонной колбе при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 3 ч.



Предлагаемая схема реакции включает первоначальную нуклеофильную атаку на атом углерода лактона, приводящую к раскрытию оксазолонового кольца с образованием *N*-{2-[(аминоалкил)амино]-2-оксо-1-(2-арилгидразинилиден)этил} бензамида (**I**) с последующей нуклеофильной атакой того же атома азота на вновь образованном амидном атоме углерода, что приводит к образованию нового имидазолидинонового кольца (**II**). Далее, происходит атака свободной первичной аминогруппы на четвертичный атом углерода, приводящая к образованию целевых продуктов **3a-e** бициклической структуры (путь **B**).



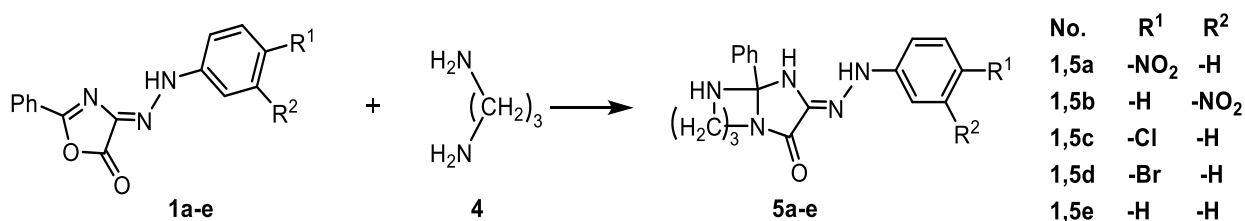
Альтернативный способ **A**, начинающийся с бензамида (**I**), путем нуклеофильной атаки амидной NH-группы, оставляя свободный аминоалкильный фрагмент без изменения, с последующим удалением воды с образованием 3-(аминоалкил)-2-фенил-5-(2-арилгидразинилиден)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она (**III**) не осуществляется.

В результате реакции нуклеофильного присоединения получены производные бициклического строения – (2-гидразинилиден)гексагидро-3*H*-имидазо[1,2-*a*]имидазол-3-оны (**3a-d**). Реакции проходят по пути **B** с хорошими выходами 65–91%. Полученные соединения были охарактеризованы с помощью набора аналитических данных, включая элементный анализ, ИК-спектроскопию, одномерную и двумерную ЯМР-спектроскопию.

При исследовании арилгидразонов имидазолонов **3a-e** методом двумерной ЯМР-спектроскопии в спектре НМВС были выявлены характерные кросс-пики при 3.65/158.2 м.д., соответствующие соотношениям атомов водорода в С6 и атомов углерода в соседнем ароматическом кольце. Кроме того, корреляции атомов водорода при С5 и атома углерода карбонильной группы при 3.43/168.0 м.д. подтверждают протекание циклизации и образование целевых бициклических гидразонов.

1.2 Реакции нуклеофильного присоединения 1,3-пропандиамина к производным арилгидразонов оксазол-5(4*H*)-она

С целью расширения ряда целевых продуктов бициклического строения проведено присоединение 1,3-пропандиамина (**4**) к арилгидразонам оксазол-5(4*H*)-она посредством реакции нуклеофильного присоединения. За счёт высокой реакционной способности диамина реакция не требовала нагревания, поэтому взаимодействие проводили при комнатной температуре в плоскодонной колбе в течение 40 мин.



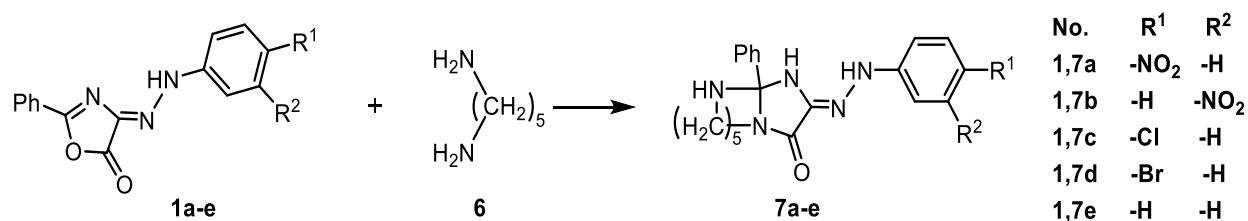
Получены целевые продукты нуклеофильного присоединения бициклического строения – фенилгексагидроимидазо[1,2-*a*]пиримидин-3(2*H*)-оны (**5a-e**)

с выходами 67.8-76.3%. Предполагаемая схема реакции аналогична предыдущей.

Для продуктов серии имидазопиримидинона **5a-e** корреляции в двумерном спектре НМВС атомов водорода у атома углерода C7 и соседним четвертичным атомом углерода соответствуют кросс-пикам при приблизительно 3.60/158.2 м.д., а для атомов водорода у атома углерода C5 с соседним карбонильным атомом углерода кросс-пик 3.35/166.8 м.д., что доказывает образование алицикла и подтверждает структуру целевых продуктов (**5a-e**).

1.3 Реакция нуклеофильного присоединения 1,5-пентандиамина к производным арилгидразонов оксазол-5(4H)-она

Для исследования влияния длины алифатического фрагмента на биодоступность была проведена реакция нуклеофильного присоединения 1,5-пентандиамина к арилгидразонам оксазол-5(4H)-онам. Данный диамин обладает более низкой реакционной способностью чем предыдущие его гомологи, поэтому реакцию проводили в круглодонной колбе при нагревании в течение 10 мин. Контроль над ходом реакции осуществляли с помощью ТСХ.



Реакция прошла с хорошим выходом 66-87%. Предполагаемая схема реакции аналогична предыдущей.

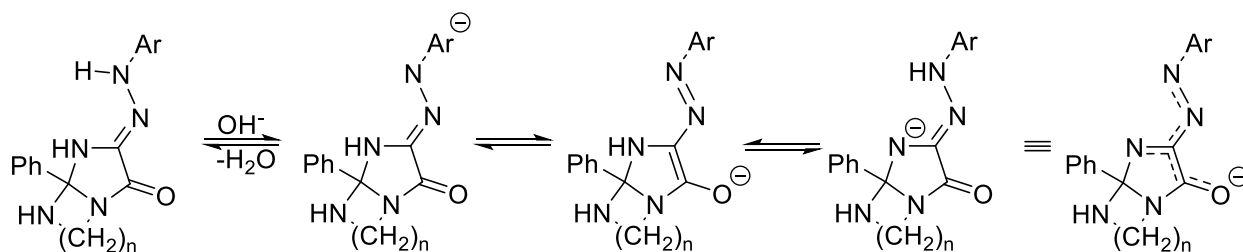
Анализ структуры продукта проводили посредством ЯМР ¹H спектроскопии. Для имидазодиазоцинонов **7a-e** получены аналогичные кросс-сигналы атомов водорода у самых удаленных атомов углерода вновь образованного неароматического цикла с атомами углерода, приведенными ранее, в области 3.49/158.3 м.д. и 3.18/164.9 м.д., соответственно. Примечательно, что двумер-

ные спектры COSY этих соединений показали кросс-пики при 8.07/3.49 м.д. атома водорода у N6 и атома водорода у соседнего атома C9, что согласуется с предполагаемой структурой продуктов.

1.4 Спектры поглощения арилгидразонов имидазодиазациклоалканов в ультрафиолетовом и видимом диапазонах

Учитывая, что бактерии посредством своих метаболических процессов могут вызывать подщелачивание окружающей среды, становится целесообразным изучить характеристики арилгидразонов имидазодиазациклоалканов **3**, **5**, **7** в условиях повышения значения pH. Способность антимикробных средств сохранять стабильность в щелочной среде имеет важное значение, поскольку это обеспечивает их устойчивую эффективность на протяжении различных фаз роста микроорганизмов, что приводит к длительному периоду бактериостатического или бактерицидного действия.

При повышении pH среды гидразогруппа депротонируется, что позволяет арилгидразонам имидазодиазациклоалканов **3**, **5**, **7** существовать в различных таутомерных формах. В растворе существует равновесие между нейтральной молекулярной и анионной формами. Равновесие может быть представлено следующим рядом резонансных форм с делокализованным отрицательным зарядом:



Нейтральная молекулярная форма полученных продуктов **3**, **5**, **7** в растворе соответствует полосам перехода $n \rightarrow \pi^*$ в диапазоне 350-410 нм. В то же время природа арильного заместителя не влияет на переходы. С увеличением

значения pH наблюдаемые батохромные сдвиги полос в диапазоне 460-520 нм указывают на удлинение цепи делокализации (рис. 1).

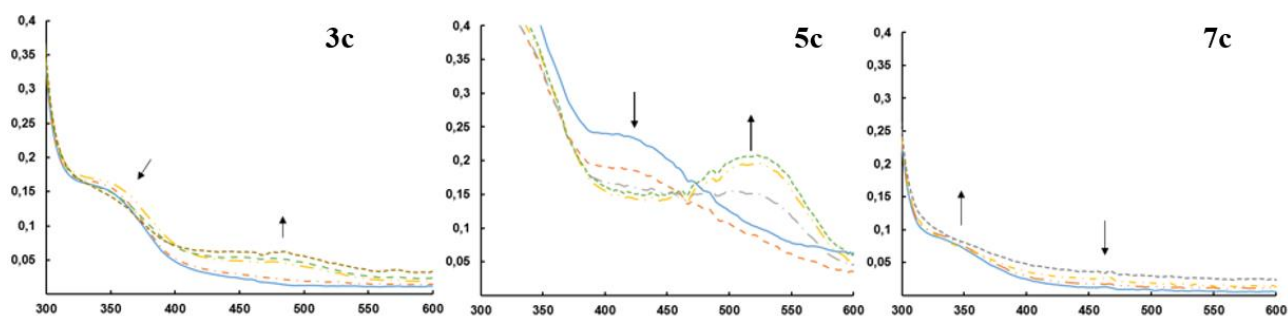


Рисунок 1 – Представлены репрезентативные УФ-спектры полученных продуктов **3**, **5**, **7** при различных значениях pH, иллюстрирующие переход от одной формы к другой.

При сравнении полученных спектров поглощения со спектрами исходных соединений, наблюдается сходные переходы, подтверждающие гидразонную природу продуктов. В отличие от исходных соединений **1a-e**, электронные спектры продуктов модификации **3**, **5**, **7** не демонстрируют четких изобестических точек. Переходы из одной формы в другую менее выражены, коэффициенты экстинкции относительно невелики (ϵ , ~370-6500). Предположительно, такое изменение спектров поглощения УФ-излучения наблюдается из-за уменьшения цепи сопряжения вследствие модификации. Кроме того, введение алифатического фрагмента в молекулу нарушает ее планарность, уменьшая площадь делокализации, что может повлиять на интенсивность УФ-спектров при депротонировании.

Анализируя спектры поглощения, можно предположить, что увеличение значения pH раствора переводит арилгидразоны имидазодиабициклоалканов **3**, **5**, **7** из молекулярного состояния в депротонированное с делокализованным отрицательным зарядом, стабилизированным цепью сопряжения. Природа арильного заместителя не влияет на спектры поглощения. В то же время проведенная модификация уменьшает цепь сопряжения, что влияет на интенсивность переходов.

1.5 Оценка антибактериальной активности препаратов *in vitro* полученных продуктов

1.5.1 Исследование способности ингибирования роста планктонных форм бактерий

Активность арилгидразонов имидазодиазабициклоалканонов **3**, **5**, **7** (500 мкг/мл) была протестирована в отношении грамположительных *Staphylococcus aureus* 209P, *Bacillus subtilis* 26D, *Bacillus cereus* 8035 и *Micrococcus luteus* B-109, а также грамотрицательных *Escherichia coli* K-12, *Pseudomonas aeruginosa* V-31, *Pseudomonas fluorescens* T283, и *Pseudomonas putida* TSh-18.

Соединения **3e**, **5e**, **7a-c**, **e** не проявляли ингибирующего действия в отношении культур грамположительных и грамотрицательных бактерий. Вещества **3a** и **5a** подавляли рост бактерий *E. coli* K-12, *S. aureus* 209P и *B. subtilis* 26D примерно в равной степени. Таким образом, диаметры зон ингибирования роста *E. coli* K-12 под воздействием этих соединений в среднем составляли 13 мм, а в случае бактерий *B. subtilis* 26D – 16 и 12 мм соответственно. Соединения **3a** и **5a** оказывают такое же действие на бактерии *S. aureus* 209P, как и антибиотик канамицин (17-19 мм). Для бактерий *B. subtilis* 26D, антибиотик ампициллин показал аналогичные зоны ингибирования (в среднем 13 мм). Продукты **3b** и **5b** подавляли рост всех использованных видов грамотрицательных бактерий и грамположительных бактерий *S. aureus* 209P. 3-нитрозамещенный имидазопиримидинон **5b** проявлял наивысшую антибактериальную активность в отношении *S. aureus* 209P, при этом зоны ингибирования роста достигали диаметра 17.2 ± 2.3 мм, что сопоставимо с действием канамицина на тот же штамм. 3-нитрозамещенный бициклический гидразон с меньшим алифатическим циклом (**3b**) продемонстрировал ингибирующий эффект в отношении *S. aureus* 209P в меньшей степени, диаметры зон ингибирования не превышали 10 мм. Что касается грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa* V-31, *P. fluorescens* T283, *P. putida* TSh-18 и *E. coli* K-12, то образцы **3b** и **5b** проявляли сходный ингибирующий эффект, при этом зоны ингибирования роста достигали 14-16 мм, независимо от штамма. Бициклы **3c** и **5c** ингибировали рост исключительно

грамположительных бактерий *S. aureus* 209P, *B. subtilis* 26D и *B. cereus* 8035. Диаметры зон ингибирования роста бактерий *S. aureus* 209P составили 19.4 ± 3.1 мм и 21.3 ± 2.8 мм соответственно. У бактерий рода *Bacillus* зоны ингибирования роста под воздействием соединений **3c** и **5c** имели сходный диаметр в пределах 16-18 мм. Соединения **3d**, **5d** и **7d** оказывали ингибирующее действие только на грамотрицательные бактерии рода *Pseudomonas*. Антимикробная активность соединений повышалась в серии **7d** → **5d** → **3d**, при этом максимальный эффект наблюдался в отношении бактерий *P. aeruginosa* V-31. Зоны ингибирования роста штамма *P. aeruginosa* V-31 под воздействием соединения **3d** достигли значений 24.5 ± 2.4 мм, в то время как для штаммов *P. fluorescens* T283 и *P. putida* TSh-18 они не превышали 20 мм.

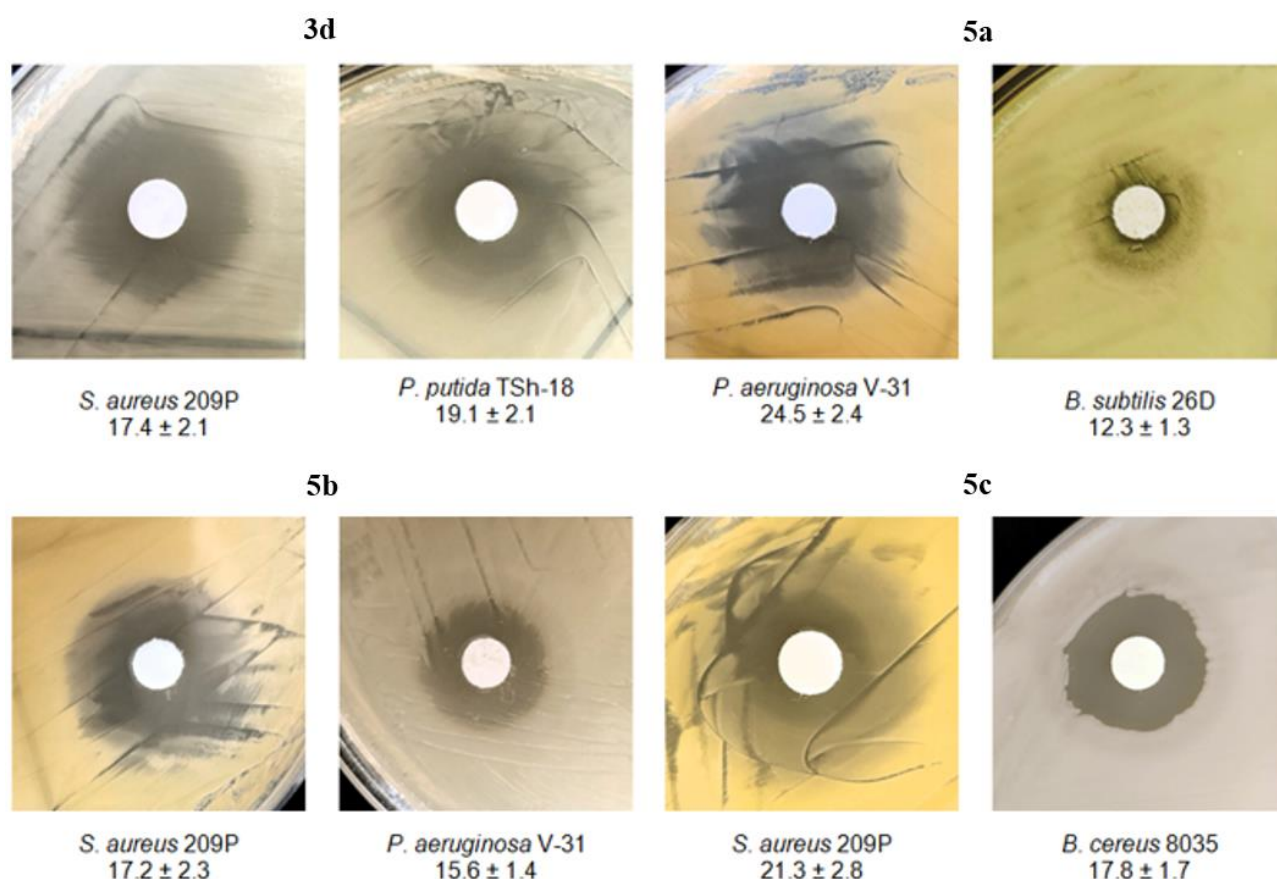


Рисунок 3 – Репрезентативные изображения зон ингибирования, отражающие антимикробную активность соединений **3d** и **5a-c** в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий ($\alpha = 0.95$)

На основании проведенного скрининга можно выделить соединения **3a**, **c** и **5a-c**, которые проявляют наиболее выраженную антибактериальную активность в отношении штамма *S. aureus* 209P, сравнимую с активностью антибиотика канамицина. Также заслуживает внимания вещество **3d**, способное подавлять рост бактерий *Pseudomonas* наряду с ампициллином, канамицином, стрептомицином и тетрациклином.

1.5.2 Оценка МИК и МБК для соединений **3, 5, 7**

Для дальнейшего определения значений МИК и МБК были выбраны соединения **3a-d**, **5a-d** и **7d** (таблица 2). Соединения **3a** и **5a** показали МИК не менее 500 мкг/мл против бактерий *E. coli* K-12, и их бактерицидного действия не наблюдалось. Между тем, для образцов **3a** и **5a** против бактерий *S. aureus* 209P МИК составляла 125 мкг/мл, а МБК - 500 мкг/мл. Аналогичные результаты были получены для штамма *B. subtilis* 26D, за исключением МБК соединения **5a**, который не удалось определить. Соединение **3b** проявляло МИК 500 мкг/мл в отношении *S. aureus* 209P, *P. aeruginosa* V-31, *P. putida* TSh-18 и *E. coli* K-12 и не обладало выраженным бактерицидным действием.

Таблица 2. МИК и МБК продуктов с более выраженными бактерицидными свойствами.

Comp-d	МИК и МБК (µg/mL)							
	<i>S. aureus</i> 209P	<i>M. luteus</i> B-109	<i>B. subtilis</i> 26D	<i>B. cereus</i> 8035	<i>P. aeruginosa</i> V-31	<i>P. fluorescens</i> T283	<i>P. putida</i> TSh-18	<i>E. coli</i> K-12
3a	125 500	–	125 500	–	–	–	–	500 –
5a	125 500	–	125 –	–	–	–	–	500 –
3b	500 –	–	–	–	500 –	250 500	500 –	500 –
5b	125 250	–	–	–	500 –	500 –	500 –	250 –
3c	62.5 250	–	250 500	250 500	–	–	–	–
5c	31.3 250	–	250 500	125 500	–	–	–	–
3d	–	–	–	–	31.3 62.5	62.5 250	31.3 250	–
5d	–	–	–	–	62.5 125	125 250	125 250	–

7d	–	–	–	–	62.5 500	125 500	250 500	–
----	---	---	---	---	-------------	------------	------------	---

Основываясь на полученных результатах, стоит отметить, что ингибирование роста грамположительных бактерий *S. aureus* 209P с использованием соединения **5c** может быть сопоставимо с воздействием антибиотиков канамицина и тетрациклина на этот штамм при активных концентрациях 30 мкг/мл. Аналогичные результаты получены в отношении соединения **3d** и его деструктивного действия на грамотрицательные бактерии *P. aeruginosa* V-31, *P. putida* TSh-18 и *E. coli* K-12. Этот факт открывает перспективы для дальнейших исследований антимикробной активности этих соединений с потенциальным внедрением в фармакологию и медицину.

1.5.3 Комбинированное действие выбранных соединений с антибиотиками

Исследовано комбинированное действие соединений **3d** и **5c**, отобранных на основе результатов скрининга, с антибиотиками аналогичного спектра действия на бактериальные культуры (таблица 3).

Таблица 3. Данные по комбинированному антимикробному действию избранных продуктов с известными антибиотиками.

Соед-е	Канамицин		Тетрациклин	
	3d	<i>P. aeruginosa</i> V-31 Σ FIC = 2.7	<i>P. putida</i> TSh-18 Σ FIC = 2.3	<i>P. aeruginosa</i> V-31 Σ FIC = 2.8
5c	<i>S. aureus</i> 209P Σ FIC = 0.9		<i>S. aureus</i> 209P Σ FIC = 0.3	

Было проанализировано влияние соединения **3d** на бактерии *P. aeruginosa* V-31 и *P. putida* TSh-18 в комбинации с канамицином и тетрациклином. Кроме того, оценено одновременное воздействие соединения **5c** и антибиотиков канамицина и тетрациклина на грамположительные бактерии *S. aureus* 209P. Это соединение продемонстрировало выраженный аддитивный эффект при использовании с

канамицином ($\Sigma\text{FIC} = 0.9$). Однако в комбинации с тетрациклином наблюдалось синергическое действие ($\Sigma\text{FIC} = 0.3$). Таким образом, было показано, что введение дополнительных заместителей в исходное соединение **3e** способствовало появлению у вновь синтезированных соединений антибактериальных свойств в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Полученная информация об антимикробных свойствах производных арилгидразонов может быть использована при разработке новых лекарственных средств для борьбы с инфекциями, вызываемыми как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями.

Выводы

1. Предложена и проведена модификация арилгидразонов оксазол-5(4*H*)-она повышающая их биодоступность посредством реакции нуклеофильного присоединения алифатических диаминов.
2. Арилгидразоны имидазо[1,2-*a*]диазабициклоалканонов способны в растворе полярных растворителей существовать в равновесии двух форм – молекулярной и депротонированной, в нейтральной среде превалирует молекулярная, а при переходе к основной среде – существенно увеличивается доля ионизированной формы.
3. Образование бициклической системы приводит к уменьшению цепи сопряжения и частичному нарушению планарности молекул арилгидразонов имидазо[1,2-*a*]диазабициклоалканонов при сохранении характерного поведения в растворе полярных растворителей в виде существования двух форм, аналогично арилгидразонам оксазол-5(4*H*)-она.
4. Скрининг бактерицидных свойств показал повышение активности по сравнению с исходными арилгидразонами оксазол-5(4*H*)-она сравнимую с аналогичным действием известных антибиотиков апициллина, канамицина и тетрациклина по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям.
5. Наиболее эффективными оказались 4-нитрофенил-, 4-хлорфенил- и 4-бромфенил-замещённые диазабициклоалканоны, способные угнетать рост в равной степени грамположительных и грамотрицательных бактерий, что перспективно для разработки антимикробных агентов нового поколения.

Публикации автора:

1. Grinev V. S. Demeshko I. A., Sklyar A. E., Dmitriev M. V., & Yegorova A. Y. // Crystal Structure of 2-(Ethoxymethylene) Malononitrile, Hirshfeld Surface Analysis and DFT Evaluation of the Non-covalent Interactions Energy // Journal of Chemical Crystallography. – 2024. – С. 1-8.
2. И.А. Демешко, В.С. Гринёв, А.Ю. Егорова//Биологическая активность *in silico* замещённых азопроизводных оксазол-5(4H)-она// достижения молодых ученых: химические науки, С. 61. Тезисы докладов VII Всероссийской (заочной) молодежной конференции (г. Уфа, 19 – 20 мая 2022 г.)
3. И. Е. Меняйло, М. В. Пожаров , Т. В. Захарова, А. Ю. Кострицкий, И. А. Демешко// Оценка реакционной способности некоторых хроменопиразолов методами квантовой химии//Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2022. Т. 22, вып. 1, С. 26-32. Журнал, включённый в список ВАК.
4. Амальчиева О. А., Гринёв В. С., Демешко И. А., Егорова А. Ю. Взаимодействие 3Н-фуран-2-онов и 4-оксо-бутановых кислот с 2-(аминофенил)метанолом // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2022. Т. 22, вып. 3. С. 244-250. Журнал, включённый в список ВАК.
5. Амальчиева О. А., Гринёв В. С., Демешко И. А., Егорова А. Ю. Биологическая активность *in silico* замещённых азопроизводных оксазол-5(4H)-она // Тезисный доклад VII Всероссийской молодёжной конф. «Достижения молодых учёных: химические науки». – Уфа: РИЦ БашГУ. 2022. – с.61.
6. Демешко И.А., Гринёв В.С., Егорова А.Ю., «Синтез производных арилгидразонов оксазол-5(4H)-она и исследование их антибактериальной ак-

тивности» // Сб. тез. Всеросс. конф. «Марковниковские чтения: Органи-
ческая химия от Марковникова до наших дней». Сочи 2022 – С. 126.