

ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 6-АМИНО-5-МЕТИЛ-2-ФЕНИЛ- И 6-АМИНО-1,5-ДИМЕТИЛ-2-ФЕНИЛИНДОЛОВ

Степаненко И.С., Коткин А.И., Алямкина Е.А., Ямашкин С.А.

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный педагогический институт имени М. Е. Евсевьева», Саранск, Саранск, Россия (430007, г. Саранск, ул. Студенческая, 11 а), saranskchem@mail.ru

Проведено изучение противомикробной активности трифторметилзамещенных амидов, не описанных ранее в литературе, – 9-гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидропирроло-[2,3-f]хинолин-7-она и N-(1,5-диметил-2-фенил-1H-индол-6-ил)-4,4,4-трифторо-3-оксобутанамид. Анализ результатов показал наличие противомикробной активности у исследуемых амидов в отношении тест-штаммов грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. Тест-штамм *Bacillus cereus* 96 показал высокую чувствительность к N-(1,5-диметил-2-фенил-1H-индол-6-ил)-4,4,4-трифторо-3-оксобутанамиду. Исследованные амиды получены в результате изучения реакций 6-амино-1,5-диметил-2-фенил-, 6-амино-5-метил-2-фенилиндолов с этиловым эфиром 4,4,4-трифторацетоуксусной кислоты. Было установлено первичное образование соответствующих амидов – продуктов конденсации аминов по сложноэфирной группе кетоэфиров. При этом 6-амино-5-метил-2-фенилиндол при кипячении с кетоэфиром в абсолютном бензоле дает циклический амид, в то время как 6-амино-1,5-диметил-2-фенилиндол в таких же условиях превращается в нециклический амид. Невозможность образования циклического амида в случае 6-амино-1,5-диметил-2-фенилиндола следует объяснить стерическими требованиями N-метильной группы.

Ключевые слова: противомикробная активность, метод серийных разведений, диско-диффузионный метод, 6-амино-5-метил-2-фенилиндол, 6-амино-1,5-диметил-2-фенилиндол, этиловый эфир 4,4,4-трифторацетоуксусной кислоты, амиды.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF 6-AMINO-5-METHYL-2-PHENYL- AND 6-AMINO-1,5-DIMETHYL-2-PHENYLINDOLE DERIVATIVES

Stepanenko I. S., Kotkin A. I., Alyamkina E. A., Yamashkin S. A.

FSBEI HPE «Mordovian State Pedagogical Institute named after M. E. Evsevjev», Saransk, Saransk, Russia (11a Student str., 430007, Saransk, Russia); saranskchem@mail.ru

The study on antimicrobial activity of trifluoromethyl substituted amides 9-hydroxy-5-methyl-2-phenyl-9-(trifluoromethyl)-1,6,8,9-tetrahydropyrrolo[2,3-f]quinoline-7-one and N-(1,5-dimethyl-2-phenyl-1H-indol-6-yl)-4,4,4-trifluoro-3-oxobutanamide which were not described before was conducted. The results analysis revealed the existence of antimicrobial activity of the amides studied in relation to test-strains of gram-positive and gram-negative microorganisms. Test-strain *Bacillus cereus* 96 displayed high sensitivity to N-(1,5-dimethyl-2-phenyl-1H-indole-6-yl)-4,4,4-trifluoro-3-oxobutanamide. The studied amides were obtained as the result of the study of the reaction of 6-amino-1,5-dimethyl-2-phenyl-, 6-amino-5-methyl-2-phenylindoles with ethyl ester of 4,4,4-trifluoroacetylacetic acid. Primary formation of the corresponding amides which are the condensation product of amines by the ester group of ketoesters was found out. At the same time 6-amino-5-methyl-2-phenylindole being boiled with ketoester in absolute benzene produces cyclic amide, while 6-amino-1,5-dimethyl-2-phenylindole under the same conditions reacts to form noncyclic amide. Failure of cyclic amide production in the case of 6-amino-1,5-dimethyl-2-phenylindole should be explained by steric requirements of N-methyl group.

Keywords: antimicrobial activity, method of series dissolutions, disco-diffusion method 6-amino-5-methyl-2-phenylindole, 6-amino-1,5-dimethyl-2-phenylindole, ethyl ester of 4,4,4-trifluoroacetylacetic acid, amides.

На протяжении последних лет во всем мире отмечается значительный рост устойчивости возбудителей внебольничных и нозокомиальных инфекций к антимикробным препаратам (АМП). Возникновение антимикробной резистентности является естественным биологическим ответом на использование АМП, которые создают селективное давление, способствующее отбору, выживанию и размножению антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [5].

Возбудители внутрибольничных инфекций по-прежнему остаются одной из наиболее распространенных проблем здравоохранения всего мира с серьезным прогнозом. Общая летальность, например от пневмонии, составляет 20–30 случаев на 100 тысяч человек в год [2]. Так же результаты многих исследований указывают на зависимость этиологии внутрибольничных инфекций от тяжести заболевания. У пациентов с тяжелыми заболеваниями наиболее вероятными возбудителями внутрибольничных инфекций являются *Staphylococcus aureus*.

S. aureus является одним из самых сложных возбудителей различных угрожающих жизни инфекций из-за его высокой способности адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды, в частности к действию антимикробных препаратов [1]. В этиологической структуре так же внебольничных пневмоний стафилококки составляют, по мнению различных авторов, от 0,5 до 5 %. Уровень летальности, при этом, составляет свыше 30 % [2].

Известно, что природная чувствительность стафилококков к подавляющему большинству антибактериальных препаратов достаточно высока. Поэтому в условиях роста резистентности стафилококков к антибиотикам, часто используемым в клинической практике, особую значимость приобретает поиск новых соединений, обладающих антимикробной активностью, пример тому применение новых поколений антибиотиков, таких как тигециклин, даптомицин, линезолид; использование эффективных комбинаций антибиотиков с усилением бактерицидного действия и с активностью в отношении как микробных биопленок, так и внутриклеточно расположенных бактерий [1].

Необходимо отметить, что ряд исследований, проводимых на предмет чувствительности некоторых микроорганизмов, показали, что многие химические вещества циклического строения, имеющие в структуре фторсодержащий радикал и полученные синтетическим путем, проявляли противомикробную активность, поэтому исследование новых соединений этой группы имеет актуальное значение [3]. Также, немаловажен поиск соединений, проявляющих узкий спектр противомикробной активности.

Цель исследования. Изучение противомикробной активности азотсодержащих гетеросистем, полученных из 6-амино-1,5-диметил-2-фенил-, 6-амино-5-метил-2-фенилиндолов и этилового эфира 4,4,4-трифторацетоуксунной кислоты.

Материалы и методы исследований

Исследование противомикробной активности соединений проводилось на базе бактериологической лаборатории кафедры иммунологии, микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева».

В качестве препарата сравнения использован диоксидин (производство «Биосинтез»,

раствор для местного применения, эндотрахеального и внутривенного введения, 10 мг/мл), антибактериальный препарат, производное хиноксалина.

В качестве тест-микробов использовали музейные штаммы: *Salmonella enteritidis* 5765 ATCC, *Shigella sonnei* S-форма 20, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* 453, *Escherichia coli* M17 утамм, *Escherichia coli* 25922 ATCC, *Staphylococcus aureus* 29213 ATCC, *Staphylococcus aureus* 906, *Enterococcus faecalis* 2919 ATCC, *Citrobacter freundii* 101/57, *Proteus vulgaris* 222, *Klebsiella pneumoniae* 9172, *Bacillus cereus* 96, *Streptococcus pyogenes* 1238 ATCC. Музейные штаммы, используемые в работе, получены из коллекции музея живых культур ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

Определение чувствительности микроорганизмов к исследуемым соединениям методом серийных разведений и диско-диффузионным методом (ДДМ) проводили в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890–04 [4].

Методы статистической обработки. Статистическую обработку полученных результатов проводили методами вариационной статистики, достоверность результатов оценивали с помощью метода определения t-критерия Стьюдента. Достоверными считали результаты при $P \leq 0,05$. В работе использовали персональный компьютер и стандартный пакет прикладных программ Statistica 6.0.

Спектры ЯМР ^1H впервые полученных соединений записаны на мультядерном спектрометре ядерного магнитного резонанса Joel JNM-ECX400 (400 МГц) в DMSO- d_6 . Расчетные спектры соединений выполнены с использованием программы ACD/LABS HNMR Spectrum Generator: Chems sketch Windows. Электронные спектры сняты на приборе LEKI SS2109UV в этаноле. Масс-спектры получены на масс-спектрометре Finnigan MAT INCOS-50 с прямым вводом образца в ионный источник при энергии ионизации 70 эВ. Очистку продуктов реакции проводили методом колоночной хроматографии. В качестве сорбента использовали оксид алюминия (нейтральный, I и II ст. акт. по Брокману). Контроль за ходом реакции, чистотой полученных соединений, определение R_f осуществляли с помощью ТСХ на пластинках *Silufol UV-254*.

Аминоиндолы **1**, **2** получены по методике, приведенной в работе [7].

9-Гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидропирроло-[2,3-f]хинолин-7-он (3). Смесь 0,30 г (1,35 ммоль) 5-метил-2-фенил-6-аминоиндола (**1**) и 0,37 г (2,0 ммоль) этилового эфира трифторацетоуксусной кислоты в 200 мл абсолютного бензола, в присутствии следов ледяной уксусной кислоты нагревают 50 часов с насадкой Дина-Старка. По окончании реакции (контроль хроматографический) бензол отгоняют. Полученное вещество очищают промыванием кипящим бензолом. Выход соединения **3**: 0,24 г (49 %). Т. пл. = 244–245 °С. Спектр ЯМР ^1H , d, м.д., J (Гц): 2,78 (3H, c, 5-CH₃), 2,87 (1H, d, $J_{\text{NH}} = 15$, 8–

H), 3,17 (1H, д, $J_{8H^*8H}=15$, 8-H'), 6,78 (1H, с, 3-H), 7,28 (1H, т, *n*-2-Ph), 7,33 (1H, с, 4-H), 7,36 (1H, с, 9-OH), 7,42 (2H, т, *m*-2-Ph), 7,72 (2H, д, *o*-2-Ph), 9,46 (1H, с, 6-H), 9,77 (1H, с, 1-H). Масс-спектр, m/z (I отн., %): 360 (98, M⁺), 342 (11), 392 (22), 291 (100), 290 (12), 273 (15), 245 (16), 221 (37), 220 (11), 219 (17), 180 (17), 146 (15), 136 (13), 122 (26), 110 (24), 78 (13), 77 (17), 43 (25). УФ спектр, λ max, нм (lg ϵ): 207 (4,38), 255 (4,31), 338 (4,44).

N-(1,5-диметил-2-фенил-1H-индол-6-ил)-4,4,4-трифторо-3-оксобутанамид (4)

получают аналогично из 0,30 г (1,27 ммоль) 1,5-диметил-2-фенил-6-аминоиндола (2) и 0,24 г (1,30 ммоль) этилового эфира трифторацетоуксусной кислоты, но нагревают 80 ч. Выход соединения 4: 0,16 г (34 %). Т. пл. = 158–159 °С (бензол). Масс-спектр, m/z (I отн., %): 374 (1, M⁺), 278 (33), 263 (26), 262 (100), 261 (15), 237 (17), 236 (79), 235 (53), 234 (13), 233 (29), 221 (13), 220 (23), 219 (14), 165 (11), 131 (14), 116 (14), 102 (11), 89 (11), 77 (15), 69 (19), 51 (11), 44 (18), 43 (47), 43 (22), 15 (30). УФ спектр, λ max, нм (lg ϵ): 208 (4,62), 225 (4,63), 311 (4,58).

Результаты исследования и их обсуждение

Проведено исследование противомикробной активности 9-гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидропирроло[2,3-f]хинолин-7-она (3) и N-(1,5-диметил-2-фенил-1H-индол-6-ил)-4,4,4-трифторо-3-оксобутанамид (4) методом серийных разведений в бульоне по отношению к эталонным штаммам *S. aureus* 29213, *E. coli* 25922, *P. aeruginosa* 27853. Результаты противомикробной активности соединений 3, 4, приведены в таблице 1.

Таблица 1

Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) соединений 3, 4 методом серийных разведений в жидкой питательной среде

Тест-культура		<i>Staphylococcus aureus</i> 29213		<i>Escherichia coli</i> 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 27853	
исследуемое вещество		3	4	3	4	3	4
Концентрация веществ в питательной среде, мкг/мл	250,0	0	0	0	0	+++	0
	125,0	+/- ¹	0	0	0	+++	0
	62,5	++	+/- ¹	+/- ¹	0	+++	+/- ¹
	31,25	++	++	++	+/- ¹	+++	++
	15,7	+++	++	+++	++	+++	++
	7,8	+++	+++	+++	++	+++	+++
	3,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	1,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	0,9	+++	+++	+++	+++	+++	+++
«Отрицательный» контроль		+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

Примечание: -¹ титр активности, «+++» – обильный рост; «++» – глубинный или поверхностный рост штаммов менее обильный; рост слабый – неактивный менее 50–30 % (+); более 70 % задержки или отсутствие роста культуры по сравнению с контролем (+/-,0).

Для препарата сравнения диоксидина МПК относительно штаммов *Staphylococcus spp.* составляет 125,0–1000,0 мкг/мл, *Escherichia coli* 8,0–250,0 мкг/мл, *Pseudomonas spp.* 125,0–1000,0 мкг/мл.

Из данных таблицы 1 видно, что МПК относительно *S.aureus* 29213 для соединения **3** – 125 мкг/мл, для соединения **4** – 62,5 мкг/мл, МПК относительно *E.coli* 25922 для соединений **3** – 62,5 мкг/мл, для соединения **4** – 31,2 мкг/мл, МПК относительно *P.aeruginosa* 27853 для соединения **3** – более 250 мкг/мл, для соединения **4** – 62,5 мкг/мл.

Таким образом, исследуемые соединения **3, 4** обладают способностью подавлять рост эталонных штаммов *S. aureus* 29213, *E. coli* 259213, а соединение **4** также в отношении *P.aeruginosa* 27853.

Результаты исследований противомикробной активности соединений **3, 4** диско-диффузионным методом приведены в таблице 2.

Таблица 2

Исследование противомикробной активности исследуемых соединений 3, 4 относительно тест-штаммов микроорганизмов диско-диффузионным методом

Тест-штамм	Контроль	Соединение 3	Соединение 4	Диоксидин
<i>Staphylococcus aureus</i> 906	0	++*	++*	++*
<i>Streptococcus pyogenes</i> 1238	0	++*	++*	++*
<i>Enterococcus faecalis</i> 2919 ATCC	0	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> M17 штамм	0	++*	++*	+
<i>Salmonella enteritidis</i> 5765 ATCC	0	+	+/-	++*
<i>Shigella sonnei</i> S-форма 20	0	+	+	++*
<i>Citrobacter freundii</i> 101/57	0	+	+	+++*
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 9172	0	++*	+	+++*
<i>Proteus vulgaris</i> 222	0	+	++*	+++*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 453	0	+	+	++*
<i>Bacillus cereus</i> 96	0	++*	+++*	+++*

Примечание: * - отличие от контроля статистически достоверно при $P < 0,05$;

Диаметр зоны задержки роста, мм

более 25

16-25

10-15

менее 10 и полное отсутствие

Степень активности вещества

высокая активность (+++)

активное (++)

малоактивное (+)

неактивное (+/-, 0)

В контрольном эксперименте диски пропитывали дистиллированной водой в 100 % случаев наблюдался сплошной рост исследуемых микроорганизмов.

Препарат сравнения диоксидин проявил высокую активность относительно тест-штаммов *C. freundii* 101/57, *K. pneumoniae* 9172, *P. vulgaris* 222 и *B. cereus* 96 ($P \leq 0,05$). Также чувствительны к препарату сравнения оказались *S. aureus* 906, *S. pyogenes* 1238, *S. enteritidis* 5765 ATCC, *S. sonnei* S-форма 20, *P. aeruginosa* 453 ($P \leq 0,05$). На фоне применения диоксидаина значимой задержки роста *E. coli* M17, *E. faecalis* 2919 ATCC не наблюдалось.

Соединение **3** оказалось активным относительно *S. aureus* 906, *S. pyogenes* 1238,

E. coli M17, *K. pneumoniae* 9172, *B. cereus* 96 ($P \leq 0,05$), соединение **4** – относительно *Streptococcus pyogenes* 1238, *Escherichia coli* M17, *Staphylococcus aureus* 906, *Proteus vulgaris* 222 ($P \leq 0,05$). Высокую чувствительность к соединению **4** показал *B. cereus* 96 ($P \leq 0,05$).

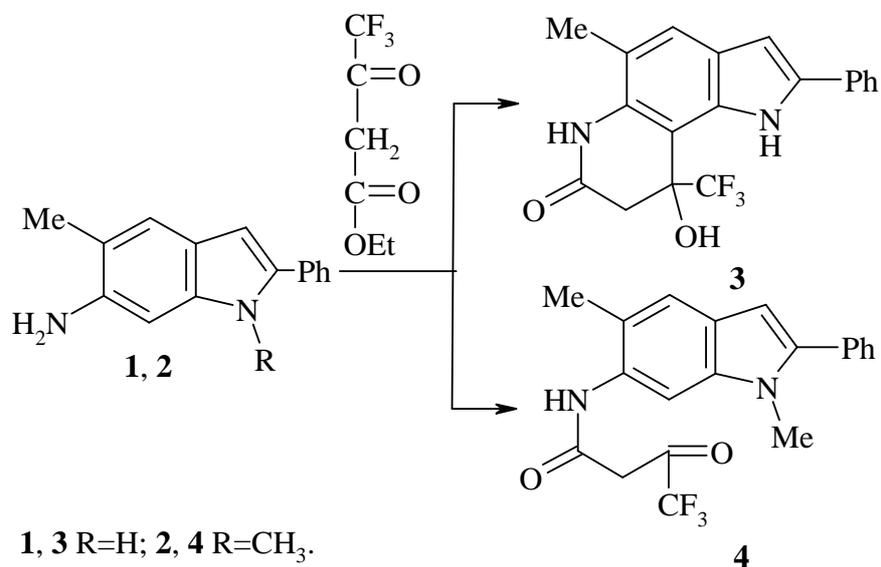
Однако амид **3** оказался малоактивен в отношении *E. faecalis* 2919 ATCC, *S. enteritidis* 5765 ATCC, *S. sonnei* S-форма 20, *C. freundii* 101/57, *P.s vulgaris* 222, *P. aeruginosa* 453, амид **4** – в отношении *S. sonnei* S-форма 20, *E. faecalis* 2919 ATCC, *C. freundii* 101/57, *P. aeruginosa* 453 и *K. pneumoniae* 9172.

Полученные данные свидетельствуют о наличии противомикробной активности амидов **3**, **4** в отношении тест-штаммов грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов.

Необходимо отметить, что исследованные нами амиды **3**, **4** были получены впервые и ранее не были описаны в литературе. Данные соединения синтезированы в ходе изучения реакций 6-амино-5-метил-2-фенил-, 6-амино-1,5-диметил-2-фенил-индолов (**1**, **2**) с этиловым эфиром трифторацетоксусной кислоты, при этом было установлено неоднозначное их протекание (схема 1).

Так 5-метил-2-фенил-6-аминоиндол при кипячении с кетоэфиром в абсолютном бензоле дает циклический амид **3**, в то время как 6-амино-1,5-диметил-2-фенилиндол в таких же условиях превращается в нециклический амид **4**.

Схема 1



В пользу структуры **3** свидетельствуют данные ЯМР ¹H. В алифатической части спектра структуры **3** появляются в виде синглета протоны метильной группы, два дублета неравноценных метиленовых протонов. Ароматические протоны (β-пиррольный, бензольного кольца) проявляются в виде двух синглетов, фенильной группы – в виде двух триплетов и дублета. В области слабых полей имеются сигналы двух N–H протонов. Масс-спектр подтверждает молекулярную массу (M=360) предположительной структуры **3**. Самым

интенсивным пиком в масс-спектральном распаде является сигнал фрагментного иона с m/z 291, соответствующий потере молекулярным ионом радикала CF_3 , приводящей к стабильной протонированной пирроло[2,3-f]хинолоновой системе, что так же подтверждает цикличность структуры **3**.

Однозначное протекание реакции конденсации за счет сложноэфирной группы β -кетоефира подтверждается отсутствием сигналов протонов этоксигруппы в спектрах ЯМР 1H , как для соединения **3**, так и **4**. К сожалению, картина спектра соединения **4** довольно сложна, что, по-видимому, объясняется наличием в растворе $DMSO-d_6$ минимум трех таутомерных форм. Теоретические спектры каждой из предполагаемых структур отличается друг от друга. Поэтому полученный экспериментально спектр можно считать суммарным для предполагаемых таутомерных форм. Масс-спектр содержит молекулярный пик с m/z 374 низкой интенсивности, что свидетельствует в пользу нециклической структуры амида **4**. Одним из основных направлений масс-спектрального распада является потеря M^+ молекулы трифторбутендиона с образованием интенсивного сигнала иона аминоиндола m/z 236/

Заключение

Изучение противомикробной активности 9-гидрокси-5-метил-2-фенил-9-(трифторметил)-1,6,8,9-тетрагидропирроло-[2,3-f]хинолин-7-она (**3**) и N-(1,5-диметил-2-фенил-1H-индол-6-ил)-4,4,4-трифторо-3-оксобутанамида (**4**) показало у них наличие противомикробного действия в отношении тест-штаммов грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов.

Исследованные амиды **3**, **4**, впервые получены соответственно из 6-амино-1,5-диметил-2-фенил-, 6-амино-5-метил-2-фенилиндолов в реакциях с этиловым эфиром трифторацетоуксусной кислоты. На основании спектральных характеристик, полученные соединения идентифицированы как амиды, то есть реакции реализуются за счет аминогруппы аминоиндолаиндола и сложноэфирной функции кетоефиров. При этом амиду **3** приписана циклическая структура. Невозможность образования циклического амида в случае амина **2** следует объяснить стерическими требованиями N-метильной группы. Пространственные требования *peri*-заместителей при образовании такого рода ангулярных структур наблюдалось и ранее [7].

Работа проводилась в рамках программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («УМНИК») при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (проект «Синтез азотсодержащих гетероциклических соединений и изучение возможности их применения в борьбе с инфекционными заболеваниями»).

Список литературы

1. Божкова, С. А. Профиль резистентности возбудителей как основа выбора эффективного антибиотика при стафилококковых инфекциях протезированных суставов / С. А. Божкова, Р. М. Тихилов, М. В. Краснова [и др.] // Клиническая микробиология антимикробная химиотерапия. – 2013. – Том 15. – № 2. – С. 115-123.
2. Давидовская, Е. И. Рациональная антибактериальная терапия тяжелых внебольничных пневмоний – выбор ориентиров / Е. И. Давидовская, Т. А. Зеленская, С. М. Шарилор // Медицинские новости. – 2009. – № 9. – С. 19-24.
3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890–04) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. – Т. 6. – №4. – С. 306-359.
4. Степаненко, И. С. Изучение противомикробной активности фторзамещенных пирролохинолинов / И. С. Степаненко, А. И. Котыкин, С. А. Ямашкин // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 8. Ч. 6. – С. 1406-1410.
5. Страчунский, Л. С. Состояние резистентности к антиинфекционным химиопрепаратам в России / Л. С. Страчунский, Т. М. Богданович // Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии; под ред: Л. С. Страчунского Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. – М.: НИИАХ СГМА. – 2002. – 586 с.
6. Ямашкин С. А. О возможности использования 6-амино-2,3-диметил-5-метокси (метил)- и 6-амино-5-метокси(метил)-1,2,3- триметилиндолов в синтезе пирроло[2,3 - f]хинолинов / С. А. Ямашкин, Е. А. Орешкина, И. С. Романова, М. А. Юровская // Химия гетероцикл. соед. – 2006. – № 1. – С. 97-103.
7. Ямашкин, С. А. Синтез некоторых нитро- и аминоиндолов / С. А. Ямашкин, М. А. Юровская // Химия гетероцикл. соед. – 1999. – № 12. – С. 1630-1636.

Рецензенты:

Инчина В. И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии Мордовского государственного университета имени Н. П. Огарева, г. Саранск;

Танасейчук Б. С., д.х.н., профессор, профессор кафедры органической химии Мордовского государственного университета имени Н. П. Огарева, г. Саранск.