

УДК 547.565.2

Г. А. КСЕНДЗОВА¹, О. И. ШАДЫРО^{1, 2}, В. Л. СОРОКИН²,
С. Н. САМОВИЧ¹, О. В. САВИНОВА³, Е. И. БОРЕКО³

АНТИВИРУСНЫЕ СВОЙСТВА ПРИРОДНЫХ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДНЫХ КОРИЧНОЙ КИСЛОТЫ

¹ *НИИ физико-химических проблем*

Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

² *Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь*

³ *РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь*

Изучены антивирусные свойства природных и синтетических производных коричной кислоты в отношении вируса герпеса простого I типа (ВПГ-I). Исследования проводили на культуре клеток рабдомиосаркомы человека методом оценки цитопатического эффекта вируса. Вычисляли концентрацию 50 % подавления размножения вируса (среднеэффективные концентрации, EC_{50}) и отношение максимально переносимых концентраций (МПК) к EC_{50} . Установлено, что 4-гидроксикоричная, феруловая и 3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеновая кислоты, а также метил-3-(3,4-дигидроксифенил)-2-пропеноат способны подавлять репликацию вируса герпеса. Показано, что в ряду кофейная, феруловая, 3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеновая кислоты последовательное метилирование фенольных гидроксильных групп приводит к возрастанию антивирусной активности. В ряду замещенных метиловых эфиров производных коричной кислоты наблюдается обратная закономерность: метил-3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеноат и метил-3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-2-пропеноат не подавляют репродукцию вируса. Только метил-3-(3,4-дигидроксифенил)-2-пропеноат проявляет слабую активность.

Antiviral properties of the natural and synthetic cinnamic acid derivatives were studied against herpes simplex type I virus (HSV-I) in cell culture experiments. The investigations were performed in the human rhabdomyosarcoma cell culture using the cytopathic effect evaluation method. Concentrations of the tested compounds providing suppression of the virus reproduction by 50 % (the average effective concentration, EC_{50}) were also calculated, as well as the ratios of maximum tolerated concentration (MTC) to EC_{50} . The ability of 4-hydroxycinnamic, ferulic and 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propenoic acids, as well as methyl-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoate to suppress the reproduction of herpes virus has been established. It was shown that in the set of caffeic, ferulic, 3-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propenoic acids the consecutive methylation of hydroxyl groups provided an increase in antiviral activity. In the range of substituted methyl esters of cinnamic acid derivatives we observed the opposite tendency, namely, methyl-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propenoat and methyl-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propenoat did not inhibit virus reproduction. Methyl-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoate only had a weak activity.

Ключевые слова: противовирусные свойства; производные коричной кислоты; природные фенолы.

Keywords: antiviral activity; cinnamic acid derivatives; natural phenols.

В фармацевтической практике широко распространены препараты на основе природных соединений, представляющие собой как индивидуальные вещества, так и их смеси, выделенные из растительного сырья. Это связано с широким спектром фармакологической активности и низкой токсичностью большинства фитопрепаратов [1, 2]. Химические соединения, выделенные из лекарственных растений, нередко служат моделями для промышленного синтеза аналогичных или еще более эффективных препаратов. Противовоспалительную, противовирусную, антимикробную, противораковую, цито- и гепатопротекторную активности фитопрепаратов связывают с содержанием в них производных коричной кислоты [1–8]. В силу малой изученности производные гидроксиарилкислот практически не используют в медицинской практике. Наше внимание к коричной кислоте и ее производным обусловлено разнообразными биологическими проявлениями [6–9] и широкими возможностями химической модификации природных молекул этой кислоты.

В работе был осуществлен направленный синтез ряда *O*-метилированных производных кофейной и феруловой кислот, а также проведены предварительные фармакологические испытания противогерпетической активности природных и синтетических производных коричной кислоты в модельных системах *in vitro*. Выявлена взаимосвязь между структурой и противовирусными свойствами исследуемых соединений.

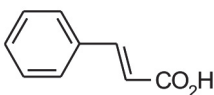
МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Коричную кислоту (**1**) и ее природные производные (**2–4**, **6**) (Sigma-Aldrich) использовали без дополнительной очистки. Методики синтеза соединений **5**, **7–9** и их физико-химические характеристики приведены в разделе «Результаты и их обсуждение».

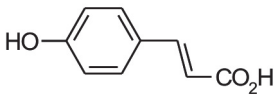
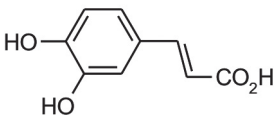
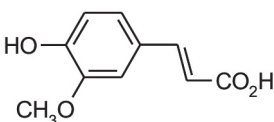
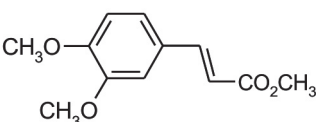
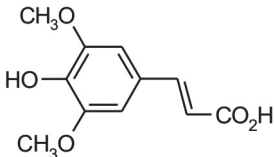
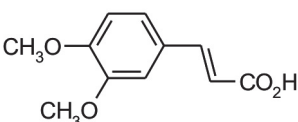
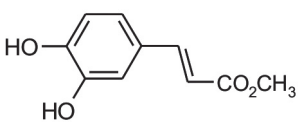
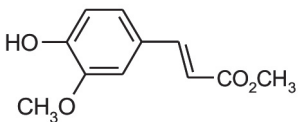
Структурные формулы и названия исследованных природных и синтетических производных коричной кислоты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Природные и синтетические производные коричной кислоты, исследованные в работе

№	Структурная формула соединения	Название соединения
1		Коричная кислота

Окончание табл. 1

№	Структурная формула соединения	Название соединения
2		4-Гидроксикоричная кислота
3		Кофейная кислота
4		Феруловая кислота
5		Метил-3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеноат
6		Синнаповая кислота
7		3-(3,4-Диметоксифенил)-2-пропеновая кислота
8		Метил-3-(3,4-дигидроксифенил)-2-пропеноат
9		Метил-3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-2-пропеноат

Для установления структуры синтезированных соединений были сняты ПМР и масс-спектры. Масс-спектры были получены на спектрометре Shimadzu QP-5000 с использованием техники прямого ввода образцов в ионный источник при температуре источника 200 °С и энергии ионизации 70 эВ. Спектры ПМР растворов веществ в CDCl_3 и $\text{DMCO}-d_6$ были сняты на спектрометре Bruker ARX-400 с рабочей частотой 400 МГц. Химические сдвиги (δ , м. д.) приведены относительно сигнала тетраметилсилана.

Испытания токсических свойств производных коричной кислоты проводили на монослойной культуре клеток рабдомиосаркомы человека (RD), которую выращивали с использованием среды DMEM (Sigma) с добавлением 10 % сыворотки крови эмбрионов крупного рогатого скота. После формирования сплошного монослоя клетки отмывали от ростовой среды и покрывали средой поддержки (среда DMEM), содержащей различные концентрации исследуемых веществ (двукратный шаг разведений). После 48–72 ч инкубации в термостате при 37 °С оценивали состояние монослоя клеток по морфологии при малом увеличении микроскопа ($\times 80$). Максимальную концентрацию веществ, в присутствии которой отсутствовали грубые изменения клеток, принимали как максимальную переносимую (толерантную).

Противовирусные свойства определяли в экспериментах на культуре клеток RD с вирусом герпеса простого I типа (ВГП-1). Исследования выполняли методом оценки цитопатического эффекта вируса, как описано ранее [10]. Изучаемые соединения предварительно растворяли в 10 % этаноле. Требуемые концентрации веществ получали путем последовательных разведений этого раствора на среде DMEM. Критерием противовирусного действия считали снижение титра вируса в присутствии соединений в сравнении с контролем. Вычисляли также концентрации 50 % (среднеэффективная концентрация, EC_{50}) и 90 % (EC_{90}) подавления размножения вируса и отношение максимальной переносимой концентрации (МПК) к EC_{50} и EC_{90} .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для решения поставленных в работе задач был синтезирован ряд производных кофейной и феруловой кислот.

Метил-3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеноат (**5**) получали обработкой феруловой кислоты (**4**) иодистым метилом в ацетонитриле в присутствии поташа (рис. 1).

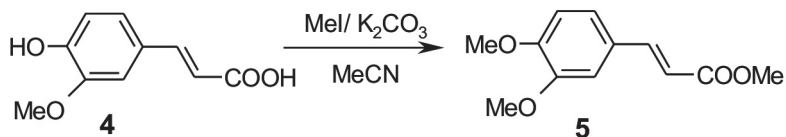


Рис. 1. Получение метил-3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеноата (**5**)

3-(3,4-Диметоксифенил)-2-пропеновую кислоту (**7**) получали обработкой метил-3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеноата (**5**) гидроксидом калия в метаноле (рис. 2).

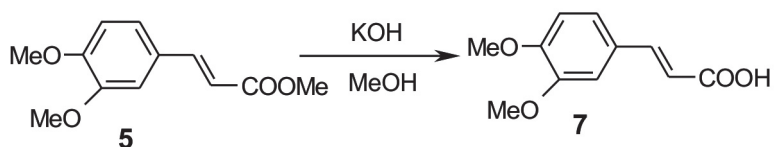


Рис. 2. Получение 3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеновой кислоты (**7**)

Метилвые эфиры кофейной и феруловой кислот **8** и **9** были получены в присутствии метанола, каталитических количеств хлористого тионила и серной кислоты соответственно (рис. 3).

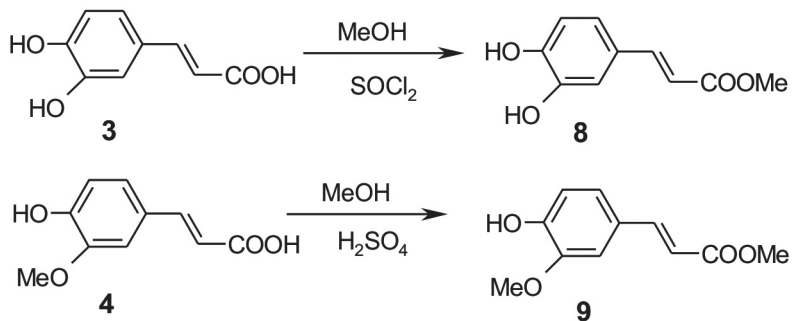


Рис. 3. Получение метил-3-(3,4-дигидроксифенил)-2-пропеноата (**8**) и метил-3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-2-пропеноата (**9**)

Контроль за ходом реакций и чистотой полученных соединений осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol UV-254 в системе этилацетат–гексан–этанол (13 : 4 : 0,5); пластинки проявляли в парах иода.

Метил-3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеноат (**5**)

Смесь феруловой кислоты (**4**) (1,0 г, 0,005 моль), карбоната калия (4,84 г, 0,035 моль) и метила иодистого (4,97 г, 0,035 моль) в сухом ацетонитриле (20 см³) кипятили в течение 5 ч. Раствор охлаждали и отфильтровывали. Фильтрат концентрировали в вакууме, остаток перекристаллизовывали из этанола. Выход: 0,77 г (69 %), т. пл. 70 °С. ПМР-спектр (CDCl₃), δ, м. д.: 7,66 д (1H, CH, *J* = 10,0 Гц), 7,15–6,87 м (3H, 3CH), 6,34 д (1H, CH, *J* = 10,0 Гц), 3,94 с (6H, 2CH₃), 3,82 с (3H, CH₃). Масс-спектр, *m/z*, (*I*_{отн}): 222 (100,0).

3-(3,4-Диметоксифенил)-2-пропеновая кислота (**7**)

К раствору метил-3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеноата (**5**) (0,23 г, 1,04 ммоль) в метаноле (10 см³) добавляли при перемешивании гидроксид

калия (0,058 г, 1,04 ммоль) в 5 см³ метанола и перемешивали в течение 2 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали в вакууме, к остатку добавляли воду (5 см³) и подкисляли концентрированной соляной кислотой до pH 1. Образовавшийся осадок отфильтровывали и промывали водой. Выход: 0,056 г (26,0 %), т. пл. 173–174 °С. ПМР-спектр (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 12,21 с (1Н, ОН), 7,52 д (1Н, СН, *J* = 10,0 Гц), 7,19–7,31 м (3Н, 3СН), 6,43 д (1Н, СН, *J* = 10,0 Гц), 3,80 с (3Н, СН₃). Масс-спектр, *m/z*, (*I*_{отн}): 208 (100,0).

Метил-3-(3,4-дигидроксифенил)-2-пропеноат (8)

Кофейную кислоту (3) (0,5 г, 2,78 ммоль) растворяли в метаноле (20 см³) и охлаждали до 0 °С. К полученному раствору добавляли по каплям тионил хлористый (0,5 г, 4,17 ммоль) при перемешивании и температуре 0 °С. Отогревали реакционную смесь до комнатной температуры и перемешивали в течение 16 ч. Реакционную смесь концентрировали в вакууме, остаток разбавляли 10 % раствором бикарбоната натрия для достижения pH 7 и экстрагировали этилацетатом (2 × 15 см³). Органические вытяжки объединяли, промывали водой и сушили безводным сульфатом натрия. Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме и перекристаллизовывали остаток из этанола. Выход: 0,46 г (85 %), т. пл. 158–160 °С. ПМР-спектр (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 9,05–9,65 уш м (2Н, 2ОН), 7,49 д (1Н, СН, *J* = 10,0 Гц), 6,79–7,06 м (3Н, 3СН), 6,27 д (1Н, СН, *J* = 10,0 Гц), 3,68 с (3Н, СН₃). Масс-спектр, *m/z*, (*I*_{отн}): 194 (98,6).

Метил-3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-2-пропеноат (9)

Феруловую кислоту (0,3 г, 1,54 ммоль) растворяли в 5 см³ метанола и добавляли каталитическое количество концентрированной H₂SO₄. Смесь кипятили в течение 24 ч. Раствор концентрировали в вакууме. К остатку добавляли 15 см³ насыщенного раствора NaHCO₃, экстрагировали хлороформом (2 × 15 см³) и сушили безводным сульфатом натрия. Осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме и очищали колоночной хроматографией на силикагеле (циклогексан : этилацетат 4 : 1). Выход: 0,352 г (73 %), т. пл. 68 °С. ПМР-спектр (ДМСО-*d*₆), δ, м. д.: 9,63 с (1Н, 2ОН), 6,46–7,58 м (5Н, 5СН), 3,81 с (3Н, СН₃), 3,70 с (3Н, СН₃). Масс-спектр, *m/z*, (*I*_{отн}): 208 (100,0).

Данные, полученные при исследовании противовирусных свойств природных и синтетических производных коричной кислоты, приведены в табл. 2.

В результате выполненных исследований установлено, что все исследованные вещества малотоксичны для линии клеток РД, значения МПК находятся в пределах 200–800 мкг/см³. Наименее токсичны коричная (1), 4-гидроксикоричная (2) и 3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеновая кислоты (7) (МПК 800 мкг/см³). Соединения 2 и 7 проявили наиболее выраженные противовирусные свойства в отношении репродукции вируса герпеса. Снижение титра вируса в присутствии 7 в МПК и 1/2 МПК (800 и 400 мкг/см³ соответственно) составило более 2,18 lg ТЦИД₅₀/см³ (более 151 раза), в концентрации 1/4 МПК — 1,07 lg ТЦИД₅₀/см³ (в 11,7 раза). При дальнейшем уменьшении исследуемой концентрации соединения различие в титре вируса с необработанным

Таблица 2

**Противовирусные свойства природных
и синтетических производных коричной кислоты**

Шифр вещества	Концентрация*, мкг/см ³	Титр вируса ± Sx, lg ТЦИД ₅₀ / см ³	Разность с контролем, lg ТЦИД ₅₀ / см ³	EC ₅₀ (I ₉₅) EC ₉₀ (I ₉₅), мкг/ см ³	Отношение МПК / EC ₅₀ МПК / EC ₉₀
1	800	7,00 ± 0,53	0,18	1057,4 (2021,2–553,2)	<1
	400–6,25	7,18 ± 0,26	0		
	0	7,18 ± 0,26	–	2422,2 (4630,1–1267,2)	<1
2	800	5,00 ± 0,53	1,18	78,0 (111,5–54,6) 314,3 (449,3–220,0)	10,2 2,5
	400	5,30 ± 0,29	0,88		
	200–100	5,37 ± 0,30	0,81		
	50	6,00 ± 0,53	0,18		
	25–6,25	6,18 ± 0,26	0		
	0	6,18 ± 0,26	–		
3	200	5,30 ± 0,26	0,88	92,3 (114,6–74,3) 167,5 (208,1–134,8)	2,2 1,2
	100	5,48 ± 0,34	0,7		
	50–6,25	6,18 ± 0,26	0		
	0	6,18 ± 0,26	–		
4	400–200	5,00 ± 0,53	1,18	100,8 (128,9–78,9) 212,0 (271,0–165,9)	4,0 1,9
	100	5,70 ± 0,43	0,48		
	50–6,25	6,18 ± 0,26	0		
	0	6,18 ± 0,26	–		
5	200–6,25	6,18 ± 0,26	0	>200	<1
	0	6,18 ± 0,26	–		
6	400	<5,0	>1,48	169,5 (202,9–141,5) 379,5 (454,5–317,0)	2,3 1,0
	200	6,23 ± 0,29	0,25		
	100	6,30 ± 0,32	0,18		
	50–6,25	6,48 ± 0,34	0		
	0	6,48 ± 0,34	–		

Окончание табл. 2

Шифр вещества	Концентрация*, мкг/см ³	Титр вируса ± Sx, lg ТЦИД ₅₀ /см ³	Разность с контролем, lg ТЦИД ₅₀ /см ³	ЕС ₅₀ (I ₉₅) ЕС ₉₀ (I ₉₅), мкг/см ³	Отношение МПК / ЕС ₅₀ МПК / ЕС ₉₀
7	800–400	<4,0	>2,18	150,0 (157,7–142,6) 204,0 (214,6–194,0)	5,3 3,9
	200	5,11 ± 0,52	1,07		
	100–6,25	6,18 ± 0,26	0		
	0	6,18 ± 0,26	–		
8	200–100	5,00 ± 0,53	1,18	76,1 (93,3–62,0) 128,4 (157,5–104,7)	2,6 1,6
	50–6,25	6,18 ± 0,26	0		
	0	6,18 ± 0,26	–		
9	200–6,25	6,18 ± 0,26	0	>200	<1
	0	6,18 ± 0,26	–		

* Максимальная концентрация соответствует МПК.

контролем не установлено. Вычисленные значения ЕС₅₀ и ЕС₉₀ составили 150 и 204 мкг/см³, отношения МПК/ЕС₅₀ и МПК/ЕС₉₀ – 5,3 и 3,9 соответственно.

Несколько менее активны соединения **4** и **8**. Снижение титра вируса в присутствии соединения **4** в МПК и 1/2 МПК (400 и 200 мкг/см³ соответственно) составило 1,18 lg ТЦИД₅₀/см³ (в 15,1 раза), в концентрации 1/4 МПК – 0,48 lg ТЦИД₅₀/см³ (в 3 раза). При дальнейшем уменьшении исследуемой концентрации соединения различие в титре вируса с необработанным контролем не установлено. Вычисленные значения ЕС₅₀ и ЕС₉₀ феруловой кислоты (**4**) составили 100,8 и 212,0 мкг/см³, отношения МПК/ЕС₅₀ и МПК/ЕС₉₀ – 4,0 и 1,9 соответственно.

Снижение титра вируса в присутствии соединения **8** в МПК и 1/2 МПК (200 и 100 мкг/см³ соответственно) составило также 1,18 lg ТЦИД₅₀/см³ (в 15,1 раза). При дальнейшем уменьшении исследуемой концентрации соединения различие в титре вируса с необработанным контролем не установлено. Вычисленные значения ЕС₅₀ и ЕС₉₀ соединения составили 100,8 и 212,0 мкг/см³, отношения МПК/ЕС₅₀ и МПК/ЕС₉₀ – 2,6 и 1,6 соответственно.

Незначительными противовирусными свойствами обладала кофейная кислота (**3**). Снижение титра вируса в присутствии **3** в МПК (200 мкг/см³) составило 0,88 lg ТЦИД₅₀/см³ (в 7,6 раза), в 1/2 МПК (100 мкг/см³) – 0,7 lg ТЦИД₅₀/см³ (в 5 раз). При дальнейшем уменьшении исследуемой концентрации соединения различие в титре вируса с необработанным контролем

не установлено. Вычисленные значения EC_{50} и EC_{90} соединения составили 92,3 и 167,5 мкг/см³, отношения МПК/ EC_{50} и МПК/ EC_{90} – 2,2 и 1,2 соответственно.

Снижение титра вируса герпеса в присутствии соединений **5** и **9** в МПК и более низких концентрациях не установлено.

Итоговая оценка степени противовирусной активности: соединения **2** и **7** – средняя активность, соединения **4** и **8** – слабая активность. Кофейная (**3**) и синнаповая (**6**) кислоты в данной модельной системе проявляли противовирусные свойства только в МПК.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что исследованные природные и синтетические производные коричной кислоты малотоксичны для линии клеток рабдомиосаркомы человека, значения максимально переносимых концентраций находятся в пределах 200–800 мкг/см³.

2. Наиболее выраженные противовирусные свойства в отношении репродукции вируса герпеса проявляют гидроксикоричная и 3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеновая кислоты.

3. В ряду кислот кофейная, феруловая, 3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеновая противогерпетическая активность усиливается по мере замены гидроксильных групп в бензольном кольце на метильные.

4. В ряду метиловых эфиров производных коричной кислоты противогерпетическая активность ослабевает по мере замены гидроксильных групп в бензольном кольце на метильные (эфиры феруловой и 3-(3,4-диметоксифенил)-2-пропеновой кислот не ингибировали репродукцию ВПГ-1, и лишь у эфира кофейной кислоты имелась противогерпетическая активность).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. *Barnes J., Anderson L. A., Phillipson J. D.* Herbal medicines, 3rd. ed., London – Chicago : Pharmaceutical Press, 2007.

2. *Куркин В. А.* Фармакогнозия. 2-е изд. Самара : Офорт : СамГМУ Росздрава, 2007.

3. *Nayaka H. M. A., Sathisha U. V., Dharmesh S. M.* [et al.]. Cytoprotective and antioxidant activity of free, conjugated and insoluble-bound phenolic acids from swallow root // *Food Chem.* 2010. Vol. 119, № 4. P. 1307–1312.

4. *Карпова Е. А., Полякова Т. А.* Содержание фенольных соединений и потенциал биологической активности сибирских и дальневосточных видов рода *Spigaea* L. (*Rosaceae* Juss.) // *Растительный мир Азиатской России.* 2009. Т. 4. № 2. С. 79–88.

5. *Barros M. P., Lemos M., Maistro E. L.* [et al.]. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found Brazilian Green Propolis // *J. Ethnopharmacol.* 2008. Vol. 120, № 3. P. 372–377.

6. *Yen G. C., Chen Y. L., Sun F. M.* [et al.]. A comparative study on the effectiveness of cis- and trans-form of cinnamic acid treatments for inhibiting invasive activity of human lung adenocarcinoma cells // *Eur. J. of Farm. Sciences*. 2011. Vol. 44, № 3. P. 281–287.

7. *Sudheer A. R., Muthukumaran S., Devipriya N.* [et al.]. Influence of ferulic acid on nicotine-induced lipid peroxidation, DNA damage and inflammation in experimental rats as compared to N-acetylcysteine // *Toxicology*. 2008. Vol. 243, № 3. P. 317–329.

8. *Serafim T. L., Marques M. P., Borges F. M.* [et al.]. Mitochondria as a target for novel chemotherapeutic agents based on phenolic acids // *J. Theor. Exp. Pharmacol.* 2010. Vol. 1, № 1. P. 3–13.

9. *Aziz N. H., Farag S. E., Mousa L. A.* [et al.]. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds // *Microbios*. 1998. Vol. 93, № 374. P. 43–54.

10. *Бореко Е. И., Павлова Н. И., Савинова О. В.* Сравнительная противовирусная активность нативных тритерпеноидов // *Здравоохранение*. 2014. № 10. С. 65–68.

Поступила в редакцию 06.03.2015