

## Спиропроизводные 1,10b-дигидро-5H-пиразоло[1,5-c][1,3]-бензоксазинов и их антимикробная, противовоспалительная и антиоксидантная активность

Лидия З. Мандзюк<sup>1</sup>, Василий С. Матийчук<sup>2</sup>, Тарас И. Чабан<sup>3</sup>,  
Олеся В. Боднарчук<sup>1</sup>, Юлия Э. Матийчук<sup>3</sup>, Мыкола Д. Обушак<sup>2\*</sup>

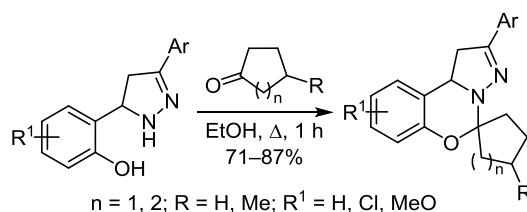
<sup>1</sup> Ивано-Франковский национальный медицинский университет,  
ул. Галицкая, 2, Ивано-Франковск 76018, Украина

<sup>2</sup> Львовский национальный университет им. Ивана Франко,  
ул. Кирилла и Мефодия, 6, Львов 79005, Украина; e-mail: mykola.obushak@lnu.edu.ua

<sup>3</sup> Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого,  
ул. Пекарская, 69, Львов 79010, Украина

Поступило 29.02.2020

Принято после доработки 20.05.2020



Взаимодействием 2-(3-арил-4,5-дигидро-1H-пиразоло-5-ил)фенолов с циклопентанонам, циклогексанонам или 4-метилциклогексанонам получены спиропроизводные 1,10b-дигидропиразоло[1,5-c][1,3]бензоксазинов. Исследована антимикробная, противовоспалительная и антиоксидантная активность этих соединений. Идентифицировано соединение с высокой антимикробной активностью относительно *S. aureus* ATCC 43300, а также соединения, по противовоспалительному эффекту превосходящие препарат сравнения диклофенак, и с высокой антиоксидантной активностью.

**Ключевые слова:** 1,3-бензоксазины, 1,3-оксазины, пиразолины, пиразоло[1,5-c][1,3]бензоксазины, халконы, антимикробная активность, антиоксидантная активность, противовоспалительная активность.

Конденсированные азотсодержащие гетероциклические соединения играют важную роль в органической и медицинской химии, поскольку обладают различными видами биологической активности и применяются в качестве фармацевтических препаратов.<sup>1</sup>

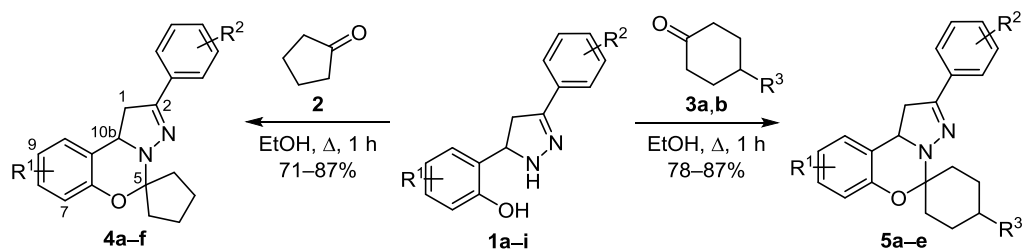
В развитие наших исследований<sup>2</sup> по синтезу и биологической активности конденсированных азотсодержащих гетероциклов в настоящей работе мы изучили подход к синтезу новых спиропроизводных 1,10b-дигидропиразоло[1,5-c][1,3]бензоксазинов и их биоактивность. Препаративным способом конструирования этой гетероциклической системы является взаимодействие 2-(3-арил-4,5-дигидро-1H-пиразоло-5-ил)фенолов с карбонильными соединениями.<sup>3–7</sup> Расширение сферы применения этого метода продолжает оставаться актуальным.

О биологической активности этого класса соединений известно мало. Показано, что они являются

эффективными антагонистами серотониновых рецепторов 5-HT<sub>2B</sub>.<sup>5</sup> Сообщается также о невысокой антимикробной активности производных пиразоло[1,5-c][1,3]бензоксазинов относительно *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes*.<sup>7</sup> В то же время они не проявляли противогрибковых свойств.

Нами исследовано взаимодействие пиразолинов **1a–i** с циклопентанонам (**2**), циклогексанонам (**3a**) и 4-метилциклогексанонам **3b**. Установлено, что при нагревании реагентов в EtOH в течение 1 ч происходит образование 1,3-оксазинового цикла, в результате чего были получены соединения **4a–f** и **5a–e** (схема 1). Полученные спиропроизводные пиразоло[1,5-c][1,3]бензоксазинов **4a–f** и **5a–e** хорошо растворимы при нагревании в ДМФА, ДМСО, диоксане, MeCN. В спектрах ЯМР <sup>1</sup>H протоны группы CH<sub>2</sub> пиразолооксазинового фрагмента проявляются в виде дублета при 3.24–

Схема 1



3a R<sup>3</sup> = H, b R<sup>3</sup> = Me

4 a R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = 3-MeO; b R<sup>1</sup> = 9-Cl, R<sup>2</sup> = 4-F; c R<sup>1</sup> = 9-Cl, R<sup>2</sup> = 4-MeO; d R<sup>1</sup> = 7-MeO, R<sup>2</sup> = 4-Cl;

e R<sup>1</sup> = 7-MeO, R<sup>2</sup> = 4-MeO; f R<sup>1</sup> = 7-MeO, R<sup>2</sup> = 3-MeO

5 a R<sup>1</sup> = R<sup>3</sup> = H, R<sup>2</sup> = 4-MeO; b R<sup>1</sup> = 9-MeO, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = H; c R<sup>1</sup> = 7-MeO, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = H;

d R<sup>1</sup> = 7-MeO, R<sup>2</sup> = 4-MeO, R<sup>3</sup> = H; e R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = 4-MeO, R<sup>3</sup> = Me

3.31 м. д. и дублета дублетов при 3.35–3.43 м. д., а протон 10b-H (CH) – в виде дублета при 5.05–5.16 м. д.

Мы исследовали антимикробную, противовоспалительную и антиоксидантную активность соединений **4a–f** и **5a–e**. В качестве тестовых микроорганизмов использовано пять штаммов бактерий из коллекции ATCC:<sup>8a</sup> *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, и двух штаммов грибов: *Candida albicans* ATCC 90028 и *Cryptococcus neoformans* ATCC 208821.

Антимикробную активность изучали, анализируя долю ингибирования роста клеток (GI)<sup>8b,c</sup>. Результаты исследований приведены в табл. 1. Установлено, что полученные соединения проявляют разноплановое действие на микроорганизмы. Выраженный антимикробный эффект наблюдали у соединений **4b** (GI 81.4%) и **4d** (GI 54.1%) относительно *S. aureus* ATCC 43300. Особенностью строения этих соединений является наличие атома галогена в арильном заместителе в положении 2 пиразолина. Соединение **4d** проявило умеренную активность по отношению к штаммам бактерий *E. coli* ATCC 25922 (GI 15.8%), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (GI 15.3%), *A. baumannii* ATCC 19606 (GI 19.3%) и штамма грибка *C. albicans* ATCC 90028 (GI 20.2%). Антибактериальным эффектом обладают

также соединения **4e** (*A. baumannii* ATCC 19606, GI 25.9%) и **5a** (*P. aeruginosa* ATCC 27853, GI 23.7%). Соединения **4a,c,f** и **5b–d** не обладают антимикробным эффектом.

Классическим примером острого воспаления считают экссудативное воспаление.<sup>9</sup> Изучение влияния синтезированных соединений на протекание экссудативной фазы воспаления проводилось на основе карагениновой модели воспалительного отека лап белых крыс.<sup>10</sup> В ходе экспериментальных исследований животные находились в обычных условиях, согласно нормам и принципам Директивы Совета ЕС по вопросам защиты позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных исследований. Для сравнения в аналогичных условиях изучали противовоспалительный эффект известного лекарственного средства диклофенак в дозе 20 мг.

Ингибирование воспалительного процесса (уменьшение объема отека лапы) выражено в процентах и рассчитано по следующей формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = 100\% - [(V_{\text{ол}} - V_{\text{зл}}) \times 100] / (V_{\text{ок}} - V_{\text{зк}}),$$

где  $V_{\text{ол}}$  – объем отека лапы в опыте;  $V_{\text{зл}}$  – объем здоровой лапы в опыте;  $V_{\text{ок}}$  – объем отека лапы в контроле;  $V_{\text{зк}}$  – объем здоровой лапы в контроле.

Как видно по табл. 2, синтезированные соединения проявляют различную противовоспалительную активность – от практически полного ее отсутствия до

Таблица 1. Антибактериальная и противогрибковая активность (GI, %) соединений **4a–f** и **5a–e**

Соединение	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>
<b>4a</b>	–3.2	1.4	2.8	1.4	–0.1	6.0	1.8
<b>4b</b>	<b>81.4</b>	4.9	6.6	–1.2	5.3	12.6	0.3
<b>4c</b>	–0.5	–2.6	10.4	–1.3	12.7	43.3	–31.7
<b>4d</b>	<b>54.1</b>	15.8	15.3	7.1	19.3	20.2	–39.5
<b>4e</b>	20.9	14.9	16.9	20.2	25.9	24.4	–91.5
<b>4f</b>	–5.1	–8.5	–4.0	–0.5	–7.8	4.8	–1.0
<b>5a</b>	2.7	4.7	14.7	23.7	21.7	17.2	–28.2
<b>5b</b>	–1.9	8.3	4.2	12.9	11.4	14.0	16.3
<b>5c</b>	12.5	3.6	11.3	8.9	3.8	20.0	–9.7
<b>5d</b>	6.8	5.2	7.7	18.0	7.9	19.0	–53.8
<b>5e</b>	–1.4	3.9	19.3	5.3	–16.2	17.4	–35.5

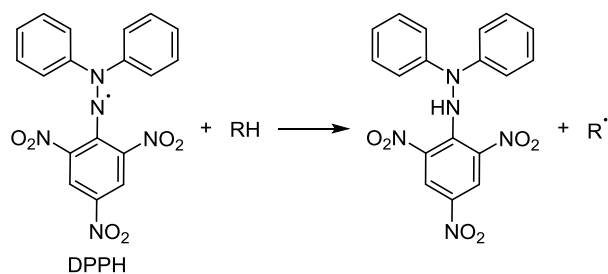
Таблица 2. Противовоспалительное действие соединений **4a,c–e** и **5a–e**

Соединение	Объем здоровой лапы, мл	Объем отечной лапы, мл	Разница между объемами отечной и здоровой лап после введения тестируемого соединения, мл	Уменьшение объема отечной лапы по сравнению с контролем, %	Активность относительно диклофенака, %
Контроль	1.15 ± 0.050	2.20 ± 0.050	1.05	–	–
<b>4a</b>	1.09 ± 0.045	2.10 ± 0.050	1.01	4.4	11.0
<b>4c</b>	0.81 ± 0.025	1.55 ± 0.040	0.74	29.5	73.6
<b>4d</b>	0.99 ± 0.030	1.91 ± 0.045	0.92	12.9	32.2
<b>4e</b>	1.03 ± 0.035	1.96 ± 0.045	0.93	11.1	27.7
<b>5a</b>	0.69 ± 0.020	1.32 ± 0.035	0.63	40.2	100.3
<b>5b</b>	1.00 ± 0.030	1.90 ± 0.045	0.90	13.9	34.7
<b>5c</b>	0.74 ± 0.025	1.41 ± 0.035	0.67	35.8	89.3
<b>5d</b>	1.05 ± 0.040	2.01 ± 0.045	0.96	8.7	21.7
<b>5e</b>	0.67 ± 0.020	1.29 ± 0.035	0.62	41.2	102.8
Диклофенак	0.69 ± 0.020	1.32 ± 0.035	0.63	40.1	100

выразительного противовоспалительного эффекта. В частности, для соединения **5a** ингибирование воспалительного процесса составляет 40.2%, а для соединения **5e** – 41.2%, что немного превышает активность диклофенака (40.1%). Ингибирование воспалительного процесса соединениями **4c** и **5c** приближается к уровню препарата сравнения и составляет 29.5 и 35.8% соответственно.

Антиоксидантную активность соединений исследовали *in vitro*, определяя уменьшение концентрации свободного радикала.<sup>11,12</sup> Для этого использовали относительно стабильный радикал – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ, DPPH). ДФПГ в растворе EtOH имеет интенсивно фиолетовую окраску с максимумом поглощения при 517 нм. Взаимодействуя с антиоксидантами, раствор ДФПГ постепенно теряет фиолетовую окраску (схема 2).

Схема 2



Сравнение оптической плотности раствора, содержащего исследуемое соединение и избыток радикала, с оптической плотностью раствора самого радикала позволяет определять антиоксидантную (радикал-поглощающую) активность (РПА) соединений (табл. 3). В качестве стандарта использовали аскорбиновую кислоту. Исходные растворы аскорбиновой кислоты и исследуемых соединений имели одинаковые молярные концентрации – 250 мкмоль/л.

Таблица 3. Антиоксидантная активность (РПА) соединений **4a–f** и **5a–e**

Соединение	Оптическая плотность раствора	РПА, %
Контроль	0.770 ± 0.035	–
<b>4a</b>	0.696 ± 0.25	9.6
<b>4b</b>	0.738 ± 0.030	4.2
<b>4c</b>	0.665 ± 0.020	13.6
<b>4d</b>	0.701 ± 0.025	9.0
<b>4e</b>	0.469 ± 0.015	39.1
<b>4f</b>	0.654 ± 0.020	15.1
<b>5a</b>	0.758 ± 0.035	1.6
<b>5b</b>	0.765 ± 0.035	0.6
<b>5c</b>	0.756 ± 0.035	1.8
<b>5d</b>	0.736 ± 0.030	4.4
<b>5e</b>	0.685 ± 0.025	11.0
Аскорбиновая кислота	0.580 ± 0.015	24.7

Как видно по табл. 3, пиразоло[1,5-с][1,3]бензоксазины **4a–f** и **5a–e** проявляют антиоксидантную активность. У большинства этих соединений она ниже, чем у аскорбиновой кислоты, а РПА соединения **4e** в полтора раза выше РПА аскорбиновой кислоты и составляет 39.1%. Еще два соединения **4c,f** проявили антиоксидантную активность среднего уровня – их РПА 13.6 и 15.1% соответственно.

Таким образом, реакцией 2-(3-арил-4,5-дигидро-1H-пиразол-5-ил)фенолов с циклическими кетонами получены новые спиропроизводные 1,10b-дигидро-5H-пиразоло[1,5-с][1,3]бензоксазинов. Среди них обнаружены соединения с антимикробной, противовоспалительной и антиоксидантной активностью.

## Экспериментальная часть

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  зарегистрированы на приборе Bruker Avance 500 (500 и 126 МГц соответственно) в ДМСО- $d_6$ , внутренний стандарт ТМС. Элементный анализ выполнен на приборе Carlo Erba 1106. Температуры плавления определены на аппарате Voetius.

Используемые соединения **1a–i** предоставлены компанией "Енамин".

**Синтез соединений 4a–f, 5a–e** (общая методика). Смесь 5 ммоль 2-(3-арил-4,5-дигидро-1H-пиразол-3-ил)-фенола **1a–i** и 5 ммоль кетона **2, 3a, b** в 15 мл EtOH кипятят в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждают, образовавшийся осадок отфильтровывают и перекристаллизовывают из EtOH. Получают соединения **4a–f** и **5a–e** в виде белых порошков.

**2-(3-Метоксифенил)-1,10b-дигидроспиropи[пиразоло-1,5-с][1,3]бензоксазин-5,1'-циклопентан] (4a)**. Выход 1.39 г (83%), т. пл. 151–152 °С. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): 1.70–1.88 (5H, м), 1.97–2.05 (1H, м), 2.25–2.32 (1H, м) и 2.51–2.55 (1H, м, 4CH<sub>2</sub>); 3.31 (1H, д,  $J = 16.1$ ) и 3.43 (1H, д, д,  $J = 16.1$ ,  $J = 8.5$ , 1-CH<sub>2</sub>); 3.75 (3H, с, CH<sub>3</sub>O); 5.16 (1H, д,  $J = 8.5$ , 10b-CH); 6.65 (1H, д,  $J = 7.9$ , H Ar); 6.88–6.95 (2H, м, H Ar); 7.06–7.30 (4H, м, H Ar); 7.27 (1H, т,  $J = 7.7$ , H Ar). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$ , м. д.: 23.9; 24.3; 36.3; 37.8; 41.1; 55.6; 57.7; 99.8; 111.3; 115.4; 117.1; 118.9; 121.6; 123.8; 127.7; 128.2; 130.1; 134.0; 152.4; 152.9; 159.8. Найдено, %: C 75.30; H 6.49; N 8.45. C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено, %: C 75.42; H 6.63; N 8.38.

**2-(4-Фторфенил)-9-хлор-1,10b-дигидроспиropи[пиразоло-1,5-с][1,3]бензоксазин-5,1'-циклопентан] (4b)**. Выход 1.56 г (87%), т. пл. 183–184 °С. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): 1.65–1.90 (5H, м), 1.92–2.04 (1H, м), 2.22–2.32 (1H, м) и 2.44–2.53 (1H, м, 4CH<sub>2</sub>); 3.29–3.47 (2H, м, 1-CH<sub>2</sub>); 5.12–5.21 (1H, м, 10b-CH); 6.68 (1H, д,  $J = 8.7$ , H Ar); 7.12 (1H, д,  $J = 8.6$ , H Ar); 7.20 (2H, т,  $J = 8.3$ , H Ar); 7.26 (1H, с, H Ar); 7.67 (2H, д, д,  $J = 8.3$ ,  $J = 5.8$ , H Ar). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): 24.0; 24.3; 36.3; 37.8; 41.0; 57.8; 100.3; 116.1 (д,  $J = 21.7$ ); 119.1; 125.1; 125.8; 127.5; 128.3; 128.7 (д,  $J = 7.8$ ); 129.2; 151.9; 152.2; 157.3 (д,  $J = 232.3$ ). Найдено, %: C 67.20; H 5.02; N 7.76. C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>ClFN<sub>2</sub>O. Вычислено, %: C 67.32; H 5.08; N 7.85.

**2-(4-Метоксифенил)-9-хлор-1,10b-дигидроспиropи[пиразоло-1,5-с][1,3]бензоксазин-5,1'-циклопентан] (4c)**. Выход 1.46 г (79%), т. пл. 154–155 °С. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): 1.68–1.88 (5H, м), 1.93–2.02 (1H, м, CH<sub>2</sub>), 2.23–2.30 (1H, м) и 2.44–2.50 (1H, м, 4CH<sub>2</sub>); 3.32–3.39 (2H, м, 1-CH<sub>2</sub>); 3.75 (3H, с, CH<sub>3</sub>O); 5.11 (1H, д,  $J = 8.2$ , 10b-CH); 6.67 (1H, д,  $J = 8.6$ , H Ar); 6.92 (2H, д,  $J = 8.3$ , H Ar); 7.10 (1H, д,  $J = 8.6$ , H Ar); 7.26 (1H, с, H Ar); 7.56 (2H, д,  $J = 8.3$ , H Ar). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$ , м. д.: 24.0; 24.3; 36.3; 37.9; 41.2; 55.7; 57.5; 100.4; 114.5; 119.0; 125.0; 125.2; 126.0; 127.5; 128.1; 128.2; 151.9; 152.7; 160.6. Найдено, %: C 68.25; H 5.62; N 7.51. C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено, %: C 68.38; H 5.74; N 7.59.

**7-Метокси-2-(4-хлорфенил)-1,10b-дигидроспиropи[пиразоло-1,5-с][1,3]бензоксазин-5,1'-циклопентан] (4d)**. Выход 1.38 г (75%), т. пл. 147–148 °С. Спектр

ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): 1.70–1.81 (4H, м, CH<sub>2</sub>); 1.82–1.90 (1H, м, CH<sub>2</sub>); 1.95–2.03 (1H, м, CH<sub>2</sub>); 2.26–2.33 (1H, м, CH<sub>2</sub>); 2.48–2.55 (1H, м, CH<sub>2</sub>); 3.27 (1H, д,  $J = 16.4$ ) и 3.43 (1H, д, д,  $J = 16.4$ ,  $J = 9.2$ , 1-CH<sub>2</sub>); 3.68 (3H, с, CH<sub>3</sub>O); 5.16 (1H, д,  $J = 9.2$ , 10b-CH); 6.73 (1H, д,  $J = 7.6$ , H Ar); 6.77 (1H, д,  $J = 7.9$ , H Ar); 6.85 (1H, т,  $J = 7.8$ , H Ar); 7.42 (2H, д,  $J = 8.3$ , H Ar); 7.61 (2H, д,  $J = 8.3$ , H Ar). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$ , м. д.: 24.1; 24.5; 36.4; 37.9; 41.0; 55.9; 57.9; 99.8; 110.9; 119.0; 121.1; 124.0; 128.1; 129.1; 131.6; 134.1; 142.5; 148.2; 151.6. Найдено, %: C 68.27; H 5.66; N 7.51. C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено, %: C 68.38; H 5.74; N 7.59.

**7-Метокси-2-(4-метоксифенил)-1,10b-дигидроспиropи[пиразоло-1,5-с][1,3]бензоксазин-5,1'-циклопентан] (4e)**. Выход 1.53 г (84%), т. пл. 149–150 °С. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): 1.65–1.91 (5H, м), 1.93–2.03 (1H, м), 2.23–2.35 (1H, м) и 2.42–2.52 (1H, м, 4CH<sub>2</sub>); 3.32–3.42 (2H, м, 1-CH<sub>2</sub>); 3.68 (3H, с, CH<sub>3</sub>O); 3.74 (3H, с, CH<sub>3</sub>O); 5.05–5.15 (1H, м, 10b-CH); 6.71 (1H, д,  $J = 7.3$ , H Ar); 6.75 (1H, д,  $J = 7.6$ , H Ar); 6.78–6.83 (1H, м, H Ar); 6.90 (2H, д,  $J = 8.3$ , H Ar); 7.54 (2H, д,  $J = 8.3$ , H Ar). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$ , м. д.: 24.1; 24.5; 36.4; 37.9; 41.3; 55.7; 55.8; 57.4; 99.9; 110.7; 114.4; 119.0; 120.9; 124.2; 125.4; 127.9; 142.5; 148.1; 152.2; 160.4. Найдено, %: C 72.55; H 6.50; N 7.58. C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Вычислено, %: C 72.51; H 6.64; N 7.69.

**7-Метокси-2-(3-метоксифенил)-1,10b-дигидроспиropи[пиразоло-1,5-с][1,3]бензоксазин-5,1'-циклопентан] (4f)**. Выход 1.29 г (71%), т. пл. 174–175 °С. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): 1.71–1.80 (4H, м), 1.82–1.90 (1H, м), 1.95–2.04 (1H, м), 2.26–2.33 (1H, м) и 2.51–2.56 (1H, м, 4CH<sub>2</sub>); 3.27 (1H, д) и 3.42 (1H, д, д,  $J = 16.4$ ,  $J = 9.3$ , 1-CH<sub>2</sub>); 3.68 (3H, с, CH<sub>3</sub>O); 3.75 (3H, с, CH<sub>3</sub>O); 5.14 (1H, д,  $J = 9.3$ , 10b-CH); 6.73 (1H, д,  $J = 7.7$ , H Ar); 6.76 (1H, д,  $J = 7.9$ , H Ar); 6.84 (1H, т,  $J = 7.9$ , H Ar); 6.91 (1H, д, д,  $J = 8.0$ ,  $J = 1.9$ , H Ar); 7.13 (1H, д,  $J = 1.9$ , H Ar); 7.17 (1H, д,  $J = 7.6$ , H Ar); 7.27 (1H, т,  $J = 7.9$ , H Ar). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$ , м. д.: 24.1; 24.5; 36.5; 37.9; 41.1; 55.6; 55.9; 57.7; 99.8; 110.8; 111.3; 115.5; 119.0; 121.0; 124.2; 128.1; 130.1; 134.1; 142.5; 148.1; 152.5; 159.8. Найдено, %: C 72.37; H 6.59; N 7.60. C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Вычислено, %: C 72.51; H 6.64; N 7.69.

**2-(4-Метоксифенил)-1,10b-дигидроспиropи[пиразоло-1,5-с][1,3]бензоксазин-5,1'-циклогексан] (5a)**. Выход 1.51 г (87%), т. пл. 150–151 °С. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. д. ( $J$ , Гц): 1.42–1.56 (4H, м), 1.64–1.77 (3H, м), 1.83–1.92 (1H, м), 2.17–2.25 (1H, м) и 2.28–2.35 (1H, м, 5CH<sub>2</sub>); 3.27 (1H, д,  $J = 16.2$ ) и 3.38 (1H, д, д,  $J = 16.2$ ,  $J = 9.2$ , 1-CH<sub>2</sub>); 3.72 (3H, с, CH<sub>3</sub>O); 5.07 (1H, д,  $J = 9.2$ , 10b-CH); 6.65 (1H, д,  $J = 7.9$ , H Ar); 6.86–6.93 (3H, м, H Ar); 7.07 (1H, т,  $J = 7.3$ , H Ar); 7.15 (1H, д,  $J = 7.4$ , H Ar); 7.55 (2H, д,  $J = 8.7$ , H Ar). Спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$ ,  $\delta$ , м. д.: 22.2; 22.4; 25.6; 33.1; 35.0; 40.9; 55.7; 56.2; 89.8; 114.4; 116.9; 121.3; 124.0; 125.6; 127.6; 127.9; 128.3; 151.4; 152.4; 160.4. Найдено, %: C 75.68; H 6.83; N 7.95. C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено, %: C 75.83; H 6.94; N 8.04.

**9-Метокси-2-фенил-1,10b-дигидроспиropи[пиразоло-1,5-с][1,3]бензоксазин-5,1'-циклогексан] (5b)**. Выход 1.36 г (78%), т. пл. 183–184 °С. Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ , м. д.

(*J*, Гц): 1.44–1.55 (4H, м), 1.65–1.75 (3H, м), 1.82–1.89 (1H, м, CH<sub>2</sub>), 2.17–2.26 (1H, м) и 2.28–2.36 (1H, м, 5CH<sub>2</sub>); 3.30–3.44 (2H, м, 1-CH<sub>2</sub>); 3.69 (3H, с, CH<sub>3</sub>O); 5.07 (1H, д, *J* = 7.7, 10b-CH); 6.60 (1H, д, *J* = 8.8, H Ar); 6.67–6.70 (1H, м, H Ar); 6.73 (1H, с, H Ar); 7.30–7.38 (3H, м, H Ar); 7.62 (2H, д, *J* = 7.3, H Ph). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C, δ, м. д.: 22.2; 22.3; 25.6; 32.9; 35.0; 40.6; 55.7; 56.7; 89.4; 111.8; 114.6; 117.6; 124.4; 126.3; 129.0; 129.4; 132.9; 145.9; 151.5; 153.8. Найдено, %: С 75.89; Н 6.78; N 7.93. C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено, %: С 75.83; Н 6.94; N 8.04.

**7-Метокси-2-фенил-1,10b-дигидроспиро[пирозоло[1,5-с][1,3]бензоксазин-5,1'-циклогексан] (5c).** Выход 1.43 г (82%), т. пл. 159–160 °С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м. д. (*J*, Гц): 1.41–1.59 (4H, м), 1.61–1.78 (3H, м), 1.85–1.94 (1H, м), 2.15–2.25 (1H, м) и 2.33–2.43 (1H, м, 5CH<sub>2</sub>); 3.28 (1H, д, *J* = 16.4) и 3.42 (1H, д, *J* = 16.4, *J* = 9.2, 1-CH<sub>2</sub>); 3.68 (3H, с, CH<sub>3</sub>O); 5.09 (1H, д, *J* = 9.2, 10b-CH); 6.70–6.85 (3H, м, H Ar); 7.30–7.39 (3H, м, H Ar); 7.60 (2H, д, *J* = 7.0, H Ph). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C, δ, м. д.: 22.2; 22.5; 25.6; 33.0; 35.0; 40.7; 55.9; 56.3; 89.8; 110.9; 118.8; 120.6; 124.0; 126.3; 129.0; 129.4; 132.8; 141.9; 148.0; 151.6. Найдено, %: С 75.75; Н 6.79; N 8.07. C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено, %: С 75.83; Н 6.94; N 8.04.

**7-Метокси-2-(4-метоксифенил)-1,10b-дигидроспиро[пирозоло[1,5-с][1,3]бензоксазин-5,1'-циклогексан] (5d).**<sup>13</sup> Выход 1.61 г (85%), т. пл. 128–129 °С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м. д. (*J*, Гц): 1.43–1.57 (4H, м), 1.62–1.75 (3H, м), 1.84–1.93 (1H, м), 2.15–2.23 (1H, м) и 2.33–2.42 (1H, м, 5CH<sub>2</sub>); 3.24 (1H, д, *J* = 16.3) и 3.38 (1H, д, *J* = 16.3, *J* = 8.9, 1-CH<sub>2</sub>); 3.56 (3H, с, CH<sub>3</sub>O); 3.68 (3H, с, CH<sub>3</sub>O); 5.05 (1H, д, *J* = 8.9, 10b-CH); 6.72 (1H, д, *J* = 7.4, H Ar); 6.76 (1H, д, *J* = 7.8, H Ar); 6.79–6.84 (1H, м, H Ar); 6.91 (2H, д, *J* = 7.9, H Ar); 7.54 (2H, д, *J* = 7.9, H Ar). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C, δ, м. д.: 22.3; 22.5; 25.6; 33.0; 35.0; 40.9; 55.6; 55.9; 56.1; 89.9; 110.8; 114.4; 118.8; 120.5; 124.1; 125.5; 127.8; 141.9; 148.0; 151.3; 160.3. Найдено, %: С 73.12; Н 7.04; N 7.43. C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Вычислено, %: С 72.99; Н 6.92; N 7.40.

**4'-Метил-2-(4-метоксифенил)-1,10b-дигидроспиро[пирозоло[1,5-с][1,3]бензоксазин-5,1'-циклогексан] (5e).** Выход 1.56 г (86%), т. пл. 162–163 °С. Спектр ЯМР <sup>1</sup>H, δ, м. д. (*J*, Гц): 0.93 (3H, д, *J* = 5.9, CH<sub>3</sub>); 1.03–1.11 (1H, м), 1.39–1.55 (3H, м), 1.60–1.74 (2H, м), 1.79–1.88 (1H, м), 2.01–2.07 (1H, м) и 2.73–2.78 (1H, м, CH, 4CH<sub>2</sub>); 3.27 (1H, д, *J* = 16.1) и 3.35 (1H, д, *J* = 16.1, *J* = 9.1, 1-CH<sub>2</sub>); 3.74 (3H, с, CH<sub>3</sub>O); 5.07 (1H, д, *J* = 9.1, 10b-CH); 6.67 (1H, д, *J* = 8.0, H Ar); 6.88–6.94 (3H, м, H Ar); 7.08 (1H, т, *J* = 7.5, H Ar); 7.15 (1H, д, *J* = 7.5, H Ar); 7.55 (2H, д, *J* = 8.5, H Ar). Спектр ЯМР <sup>13</sup>C, δ, м. д.: 22.3; 30.0; 30.3; 31.6; 31.7; 34.7; 40.6; 55.7; 56.6; 88.9; 114.4; 117.0; 121.4; 124.1; 125.6; 127.6; 127.9; 128.3; 151.4; 152.3; 160.4. Найдено, %: С 76.08; Н 7.19; N 7.61. C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Вычислено, %: С 76.21; Н 7.23; N 7.73.

**Определение антибактериальной активности.** Тест-штаммы бактерий выращивают в течение 4 ч в питательном бульоне Мюллера–Хинтона при температуре 37 °С. Образец каждой культуры разбавляют в 40 раз свежим бульоном и инкубируют при 37 °С в течение 1.5–3 ч. Полученные культуры середины логариф-

мической фазы роста разбавляют и добавляют в лунки планшетов с образцами соединений, создавая концентрацию 5·10<sup>5</sup> колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл при общем объеме 50 мкл. Все планшеты инкубируют при 37 °С в течение 18 ч без встряхивания. Ингибирование роста бактерий определяют измерением поглощения при 600 нм (OD600), используя автоматизированный монохроматор/спектрограф Tecan M1000 Pro для считывания планшетов. Значение GI рассчитывают для каждой ячейки микротитрационного планшета, используя отрицательный контроль (только среда) и положительный контроль (бактерии без ингибиторов) на том же планшете.

**Определение противогрибковой активности.** Штаммы грибов культивируют в течение 3 сут на бульоне YPD при 30 °С. Суспензии в концентрациях от 1·10<sup>6</sup> до 5·10<sup>6</sup> КОЕ/мл готовят из пяти колоний. Затем суспензии разбавляют и добавляют в лунки планшетов с образцами соединений, создавая концентрацию 2.5·10<sup>3</sup> КОЕ/мл при общем объеме 50 мкл. Все планшеты инкубируют при 35 °С в течение 36 ч без встряхивания. Ингибирование роста *C. albicans* определяют измерением поглощения при 530 нм (OD530), а ингибирование роста *C. neoformans* определяют, измеряя разницу поглощения между 600 и 570 нм (OD600–570) после добавления резазурина (0.001% конечной концентрации) и дополнительной инкубации при 35 °С в течение 2 ч. Поглощение измеряют с помощью спектрофотометра для считывания планшетов Biotek Synergy HTX. Значение GI рассчитывают для каждой ячейки микротитрационного планшета, используя отрицательный контроль (только среда) и положительный контроль (грибковая среда без ингибиторов) на том же планшете.

Колистин и ванкомицин применяют в качестве стандартов для грамотрицательных и грамположительных бактерий соответственно, а флуконазол – в качестве стандарта для культур *C. albicans* и для *C. neoformans*. Они использованы в четырех концентрациях, две из которых превышали минимальную подавляющую концентрацию (МПК), а две были ниже этого значения. Контроль качества анализов определяют с помощью Z-фактора (с использованием положительного и отрицательного контролей).<sup>14</sup> Считают, что каждый планшет удовлетворяет критериям качества, если Z-фактор был выше 0.4, а образцы стандартных препаратов полностью ингибируют рост в наиболее высокой концентрации и не ингибируют при самой низкой концентрации. Образцы, для которых GI ≥ 80% принято считать высокоактивными, а соединения со значениями GI от 50 до 80% – умеренно активными.

**Определение противовоспалительной активности.** Изучение влияния полученных соединений на протекающие экссудативной фазы воспаления проводят на основе карагениновой модели воспалительного отека лап белых крыс линии Вистар разного пола весом 180–200 г. Животных разделяют на 13 групп по пять крыс в группе. Одну группу оставляют в качестве контроля, а остальные 12 групп (тестовые группы) используют для

определения противовоспалительной активности диклофенака и тестируемых соединений. Перед экспериментом крысы содержат в приюте для животных в стандартных условиях освещенности и температуры на стандартной диете. Стандартное лекарственное средство диклофенак и испытуемые соединения растворяют в ДМСО и вводят животным внутривенно. Животным контрольной группы внутривенно вводят ДМСО. Через 30 мин 0.1 мл 2% раствора карагенина в физиологическом растворе вводят под подошвенную область правой задней лапы каждой крысы. Через 4 ч после введения карагенина объем отека лапы (в мл) измеряют с помощью водяного плетизмометра и сравнивают уменьшение объема отека между контрольной группой и испытуемыми группами.

#### Определение антиоксидантной активности.

Растворы тестируемых соединений в ЕтОН (0.3 мл, 20 мкмоль/л) добавляют к спиртовому раствору ДФПГ (2.7 мл, 150 мкмоль/л). Смесь перемешивают и оставляют на 2 ч. Затем раствор вносят в кювету фотоколориметра и определяют оптическую плотность ( $\lambda$  517 нм). РПА вычисляют по формуле:

$$\text{РПА} = [(A_{\text{ДФПГ}} - A_S)/A_{\text{ДФПГ}}] \times 100\%,$$

где  $A_{\text{ДФПГ}}$  – оптическая плотность раствора свободного радикала ДФПГ (135 мкмоль/л),  $A_S$  – оптическая плотность раствора ДФПГ с испытуемым соединением. В качестве стандарта используют аскорбиновую кислоту. Измерения проводят трижды с независимыми аликвотами. Относительные отклонение не превышают 7%.

Работа поддержана Национальным фондом исследований Украины (проект 2020.01/0166).

Исследования антимикробной активности синтезированных соединений проведены Сообществом для поиска препаратов с антимикробной активностью (CO-ADD), при финансировании фондом Wellcome Trust (Великобритания) в университете Квинсленда (Австралия).

#### Список литературы

- (a) Машковский, М. Д. *Лекарственные средства*; Новая волна: Москва, 2019. (b) *Bioactive Heterocycles: Synthesis and Biological Evaluation*; Ameta, K. L.; Pawar, R. P.; Domb, A. J., Eds.; Nova Science Publishers Inc.: New York, 2013.
- (a) Pokhodylo, N. T.; Matyichuk, V. S.; Obushak, M. D. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2678. (b) Zubkov, F. I.; Ershova, J. D.;

- Zaytsev, V. P.; Obushak, M. D.; Matyichuk, V. S.; Sokolova, E. A.; Khrustalev, V. N.; Varlamov, A. V. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6822. (c) Gorak, Yu. I.; Obushak, N. D.; Matyichuk, V. S.; Lytvyn, R. Z. *Russ. J. Org. Chem.* **2009**, *45*, 541. [*Журн. орган. химии* **2009**, *45*, 555.] (d) Matyichuk, V. S.; Potopnyk, M. A.; Obushak, M. D. *Russ. J. Org. Chem.* **2008**, *44*, 1352. [*Журн. орган. химии* **2008**, *44*, 1368.] (e) Batsyts, S.; Shehedyn, M.; Goreshnik, E. A.; Obushak, M. D.; Schmidt, A.; Ostapiuk, Y. V. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, 7842. (f) Pokhodylo, N. T.; Shuyka, O. Ya.; Tupyachak, M. A.; Obushak, M. D. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2018**, *54*, 209. [*Химия гетероцикл. соединений* **2018**, *54*, 209.] (g) Pokhodylo, N. T.; Savka, R. D.; Matyichuk, V. S.; Obushak, N. D. *Russ. J. Gen. Chem.* **2009**, *79*, 309. [*Журн. общ. химии* **2009**, *79*, 320.] (h) Rusnak, O. V.; Lytvyn, R. Z.; Skripskaya, O. V.; Blinder, O. O.; Pitkovych, Kh. E.; Yagodinets, P. I.; Obushak, M. D. *Pharm. Chem. J.* **2019**, *53*, 797. [*Хим.-фарм. журн.* **2019**, *53*(9), 20.]
- Desenko, S. M.; Getmanskii, N. V.; Chernenko, V. N.; Zemlin, I. M.; Shishkin, O. V.; Orlov, V. D. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1999**, *35*, 716. [*Химия гетероцикл. соединений* **1999**, 805.]
- Orlov, V. D.; Getmanskii, N. V.; Oksnich, I. A.; Iksanova, S. V. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1991**, *27*, 910. [*Химия гетероцикл. соединений* **1991**, 1131.]
- Bienaymé, H.; Chêne, L.; Grisoni, S.; Grondin, A.; Kaloun, El-B.; Poigny, S.; Rahali, H.; Tam, E. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4830.
- Svetlik, J.; Pronayova, N.; Kubista, J. *J. Heterocycl. Chem.* **2005**, *42*, 1143.
- Borad, M. A.; Bhoi, M. N.; Rajani, D. P.; Rajani, S. D.; Patel, H. D. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *3*, 805.
- (a) *American Type Culture Collection (ATCC)*. <https://www.lgcstandards-atcc.org>. (b) Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibensouda, S. K. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6*, 71. (c) *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*; Schwalbe, R.; Steele-Moore, L.; Goodwin, A. C., Eds; CRC Press: Boca Raton, 2007.
- Pillai, A. D.; Rathod, P. D.; Franklin, P. X.; Padh, H.; Vasu, K. K.; Sudarsanam, V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *317*, 1067.
- Atta-ur-Rahman; Choudhary, M. I.; Thomsen, W. J. *Bioassay Techniques for Drug Development*; CRC Press: Boca Raton, 2001, p. 88.
- Blois, M. S. *Nature* **1958**, *181*, 1199.
- Molyneux, P. J. *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* **2004**, *26*, 211.
- Edge, A.; Jeon S.-J.; Seyb, K.; Glicksman, M.; Qiao, L.; Cuny, G. D. US Patent 10406163 B2.
- Iglewicz, B.; Hoaglin, D. C. *How to Detect and Handle Outliers (The ASQC Basic Reference in Quality Control: Statistical Techniques. Volume 16)*; Quality Press: Milwaukee, 1993.