

УДК 547.597:547.362.057

Синтез и биологическая активность новых ацетиленовых производных бетулоновой кислоты

А. И. ГОВДИ¹, И. В. СОРОКИНА², Т. Г. ТОЛСТИКОВА², С. Ф. ВАСИЛЕВСКИЙ¹, Г. А. ТОЛСТИКОВ²¹Институт химической кинетики и горения Сибирского отделения РАН, ул. Институтская, 3, Новосибирск 630090 (Россия)E-mail: vasilev@kinetics.nsc.ru²Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск 630090 (Россия)E-mail: sorokina@nioch.nsc.ru

Аннотация

Синтезированы ацетиленовые производные амида бетулоновой кислоты. Исследована их гепатопротекторная и противовоспалительная активность. В ряду производных бетулоновой кислоты обнаружены два соединения со значительным гепатопротекторным и противовоспалительным эффектами.

Ключевые слова: тритерпеноиды, бетулоновая кислота, арилацетилены, гепатопротекторная активность, противовоспалительная активность

ВВЕДЕНИЕ

Синтетические трансформации тритерпеноидов – одно из наиболее интенсивно развивающихся направлений органической химии, что связано с высокой востребованностью соединений этого ряда в качестве лекарственных препаратов широкого спектра действия. Известно, что амиды бетулоновой кислоты проявляют разнообразную биологическую активность: противовирусную, антибластомную, иммуностимулирующую [1] и антиоксидантную [2].

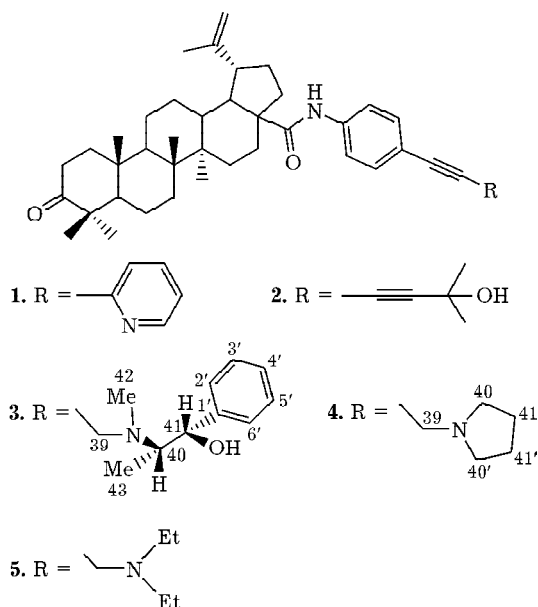
Направленная синтетическая модификация тритерпеноидов позволяет существенно усилить, а в ряде случаев и изменить их биологическую активность.

Ранее нами была показана перспективность модификации тритерпеноидов путем введения в их структуру ацетиленовых остатков. Получение подобных производных и их фармакологические свойства в литературе до сих пор не обсуждались. Среди синтезированных нами ацетиленовых производных амидов бетулоновой кислоты [3] обнаружены эффективные противовоспалительные и гепатопротекторные агенты.

В настоящей работе серия полученных ранее амидов ацетиленилбетулоновой кислоты была дополнена новыми производными **1–5** с

разнохарактерными заместителями в *para*-положении бензольного кольца.

Эти заместители включают: 2-этинилпиридил **1**, 1-[5-гидрокси-5-метилбутадиин-1,3-ил] **2**, *N*-метил-*N*-[(1*S*,2*S*)-2-(метиламино)-1-фенил-1-гидроксипропил]пропаргин-1-ил **3**, *N*-пирролидинопропаргин-1-ил **4** и его открытую форму *N,N*-диэтиламинопропарг-1-ил **5**.



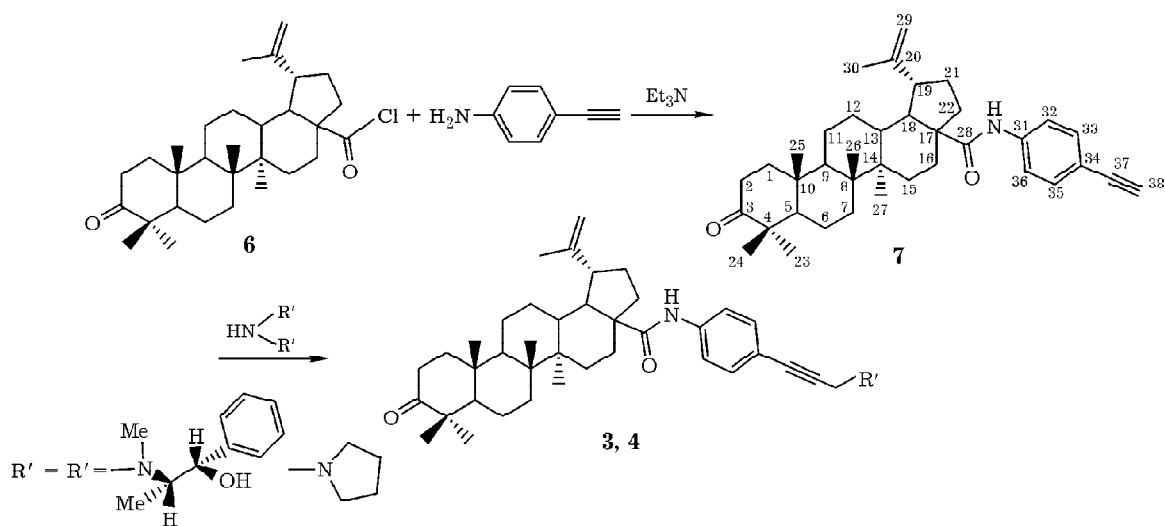


Схема 1.

Ацетиленовые производные **1**, **2** и **5** синтезированы по описанным нами ранее методикам [4]. Аминоацетилены **3** и **4** получены аминоалкилированием амида этинилбетулоновой кислоты **7**, синтезированной из хлорангидрида бетулоновой кислоты **6** и 4-аминофенилацетилену в присутствии триэтиламина [4] (схема 1).

Исходный амидацетилен **7** вводили в реакцию с (+)-псевдоэфедрином и пирролидином и параформом в присутствии CuCl, что приводило к образованию соответствующих оснований Манниха **3** и **4** с выходом 82 и 72 % соответственно. Строение вновь полученных соединений подтверждено аналитическими и спектральными данными.

Фармакологические свойства соединений **1–5** изучали на беспородных мышах путем определения гепатопротекторной, антиоксидантной и противовоспалительной активности согласно методическим рекомендациям [6]. В качестве препаратов сравнения использовали антиоксидант дигидрокверцетин (чистота 99.9 %) и нестероидный противовоспалительный препарат индометацин (субстанция Fluka, BioChemika).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

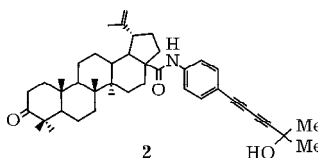
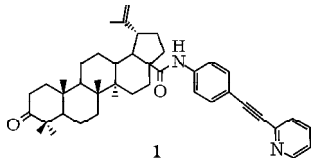
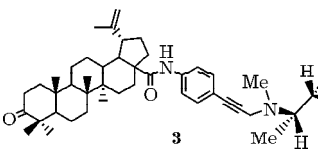
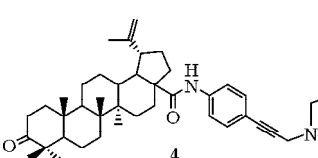
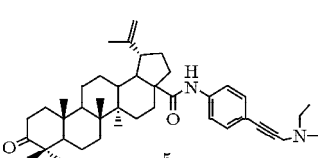
Гепатопротекторный эффект определяли по снижению в сыворотке крови маркеров цитолиза и холестаза – аланинаминотранс-

феразы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ). Антиоксидантные свойства оценивали по уменьшению концентрации продуктов пероксидного окисления (ТБКРС), определяемых по реакции с тиобарбитуровой кислотой [7].

Биохимический анализ сыворотки крови (табл. 1) показал, что в ряду протестированных соединений выделяются два агента, обладающие значимым гепатопротекторным эффектом. Так, соединение **3** снижает активность обеих трансаминаз в 1.4 раза ($p < 0.05$) относительно контроля, а агент **5** уменьшает аналогичным образом активность АСТ. Оба соединения не уступают дигидрокверцетину по выраженности гепатопротекторного эффекта, а агент **3** его даже превосходит, так как достоверно снижает АЛТ – маркер цитолиза гепатоцитов. В условиях данного эксперимента ни одно из тестируемых соединений не снизило активность ЩФ, что свидетельствует об отсутствии у них антихолестазных свойств. Помимо антицитолитического, агент **5** проявляет также антиоксидантное действие, уменьшая концентрацию ТБАРС в крови в 1.4 раза по сравнению с контролем ($p < 0.05$). Наибольший антиоксидантный эффект в ряду производных бетулоновой кислоты отмечен для соединения **1**: уровень ТБАРС снизился в 1.6 раза по сравнению с контролем, в то время как референс понизил его в 1.4 раза.

ТАБЛИЦА 1

Влияние производных бетулоновой кислоты на биохимические показатели сыворотки крови мышей с CCl_4 -гепатитом

Группа	Доза, мг/кг	ЩФ, Ед/л	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л	ТБАРС, мкмоль/л
Контроль	–	897.44±105.63	144±13.63	142.13±10.88	2.59±0.32
	50	(1429.38±83.7)*	149.33±21.22	154.89±8.48	2.08±0.16
	50	1208.29±69.72	139.89±14.88	141.78±12.74	(1.58±0.15)*
	50	920±55.99	(103.13±12.83)*#	(101.5±11.48)*	(2.34±0.15)#
	50	(1060.33±77.17)#	131.67±15.57	114.63±8.76	(2.51±0.22)#
	50	856.44±68.78	141.89±17.79	(104.63±11.76)*	(1.79±0.18)*
Дигидрокверцетин	100	892.11±58.69	139.11±7.53	(98.25±6.79)*	(1.81±0.16)*

* $p < 0.05$ относительно контроля.

$p < 0.05$ относительно дигидрокверцетина.

Исследование противовоспалительного действия на модели гистаминового отека лапы показало, что в ряду синтезированных соединений три агента обладают статистически достоверным эффектом (табл. 2). Максимальная выраженность эффекта отмечена для группы мышей, получавших агент **3**, что привело к более заметному снижению отека по сравнению с таковым для контрольной группы мышей и группы, получавшей индометацин (в 1.9 и 1.4 раза соответственно). Значительную активность также проявил агент **5**, вызвавший уменьшение отека в 1.6 раза относительно контроля, в то время как в случае индометацина

аналогичное снижение составило 1.4 раза. Показано, что агент **2** по противовоспалительной активности не уступал индометацину.

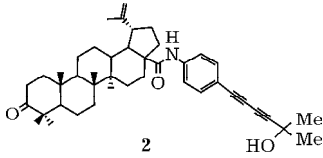
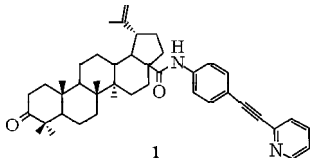
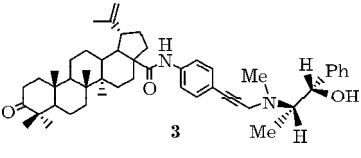
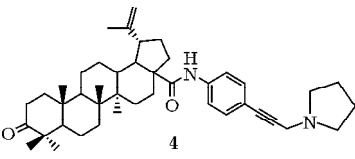
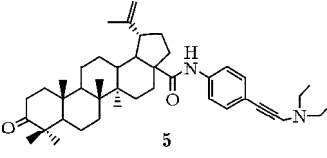
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Химия

Температуры плавления определяли на аппарате Kofler. ИК-спектры записывали на спектрометре Vector 22 в таблетках с KBr. Масс-спектры высокого разрешения получали на приборе DFS (Thermo Electron Corporation). Элементный анализ выполняли

ТАБЛИЦА 2

Влияние соединений на индексы отека лапы мышей, вызванного субпланарным введением гистамина

Агент	Доза, мг/кг	Индекс воспаления, %	Величина отека относительно контроля, %
Контроль	–	22.1±2.6	100
	20	(15.9±1.1)*	71.9
	20	19.7±1.9	89.1
	20	(11.8±1.4)*#	53.4
	20	18.1±1.9	81.9
	20	(13.7±1.4)*	62.0
Индометацин	20	16.8±0.9	76.0

* $p < 0.05$ относительно контроля.# $p < 0.05$ относительно индометацина.

на СНN-анализаторе (модель 1106, фирма Carlo Erba, Италия). Спектры ЯМР записывали на приборе Bruker AV-300 (300.13 (^1H) и 75.47 МГц (^{13}C)), Bruker AV-400 (400.13 (^1H) и 100.61 МГц (^{13}C)) для растворов веществ в CDCl_3 . Химические сдвиги измеряли относительно остаточных сигналов растворителя: CHCl_3 (δ_{H} 7.24 м.д. и δ_{C} 76.90 м.д.). Мультиплетность сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C определяли в режиме J -модуляции (JMOD). Отнесение сигналов в спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C для полициклического остова соединений **3**, **4** осуществлено сопоставлением с соответствующими спектрами бетулоновой кислоты как клю-

чевого соединения [5]. Вследствие сложности отнесения всех сигналов в спектрах ЯМР ^1H для указанных соединений приведены данные характерных сигналов. Основная часть протонов тритерпеноидного скелета резонирует в интервале 2.7–0.8 м.д.

N-(3-оксо-20(29)-лупен-28-оил)-4-{N-метил-N-[(1S,2S)-2-(метиламино)-1-фенил-1-гидроксипропил]пропаргин-1-ил}анилин 3. К 184 мг (1.1 ммоль) (+)-псевдоэфедрина добавили 33 мг (1.1 ммоль) параформа в 5 мл диоксиана при комнатной температуре. Смесь перемешивали при 70 °С в течение 2–2.5 ч до полного растворения параформа.

Смесь 300 мг (0.54 ммоль) ацетилена **7**, 184 мг (0.54 ммоль) ди(*N*-(1*S*,2*S*)-2-(метиламино)-1-фенил-1-гидроксипропил)метана, 15 мг (0.15 ммоль) CuCl в 10 мл диоксана перемешивали в токе аргона 3.5 ч при 80–85 °С. По окончании синтеза реакцию массу промыли водным аммиаком. Органический слой сушили Na_2SO_4 , отфильтровали через слой Al_2O_3 (1×1.5 см). Растворитель удалили в вакууме, остаток растирали с гексаном, затем отфильтровали, получили 300 мг (82 %) соединения **3**, т. пл. 110–112 °С (бензол). Масс-спектр высокого разрешения, найдено: m/z 729.499 [$M - \text{H}^+$]. $\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_2$. Вычислено: $M = 729.4977$. ЯМР ^1H , δ , м.д. (J , Гц): 0.85 (3H, м, Me-43), 0.90 (3H, с, Me-25), 0.95 (3H, с, Me-24), 0.99 (6H, с, Me-26, 27), 1.04 (3H, с, Me-23), 1.68 (3H, с, Me-30), 2.41 (3H, с, Me-42), 2.87 (1H, м, 40), 3.14 (1H, дт, 19, $J_1 = 4$, $J_2 = 11$), 3.59 (2H, м, CH_2 -39), 4.23 (1H, д, 41), 4.59 (1H, с, 29), 4.73 (1H, с, 29), 7.25–7.45 (9H, м, 32, 36, 33, 35, 2', 3', 4', 5', 6'); ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 8.17 (C-43), 14.43 (C-27), 15.80 (C-26), 15.85 (C-25), 19.38 (C-30), 19.48 (C-6), 20.91 (C-24), 21.31 (C-11), 25.47 (C-12), 26.42 (C-23), 29.45 (C-21), 30.62 (C-15), 33.55 (C-16), 33.69 (C-7), 34.03 (C-2), 35.21 (C-42), 36.80 (C-22), 37.49 (C-13), 37.95 (C-10), 39.51 (C-1), 40.57 (C-8), 42.47 (C-14), 44.69 (C-39), 46.30 (C-19), 47.22 (C-4), 49.89 (C-9), 50.06 (C-18), 54.92 (C-5), 56.47 (C-17), 64.62 (C-40), 74.82 (C-41), 84.36 (C-38), 85.28 (C-37), 109.49 (C-29), 118.23 (C-34), 119.47 (C-32, 36), 123.28 (C-2', 6'), 127.65 (C-4'), 128.13 (C-3', 5'), 132.15 (C-33, 35), 138.08 (C-31), 141.68 (C-1'), 150.43 (C-20), 174.33 (C-28), 218.03 (C-3). ИК-спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 1703 (C=O); 2227 (C≡C). Найдено, %: C 80.76, H 9.21, N 4.51. $\text{C}_{49}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_3$. Вычислено, %: C 80.50, H 9.10, N 3.83.

N-(3-оксо-20(29)-лупен-28-оил)-4-(**N**-пирролидинопропаргил-1-ин)анилин **4**. К 4.00 г (56 ммоль) пирролидина добавили 1.68 г (56 ммоль) параформа в 15 мл диоксана при комнатной температуре. Смесь перемешивали при 70 °С в течение 2–2.5 ч до полного растворения параформа.

Смесь 287 мг (0.52 ммоль) ацетилена **7**, 82 мг (0.53 ммоль) ди(*N*-пирролидино)метана, 14 мг (0.14 ммоль) CuCl в 10 мл диоксана перемешивали в токе аргона при 80–85 °С в течение 1 ч. По окончании синтеза реакцию

массу промыли водным аммиаком. Органический слой сушили Na_2SO_4 , отфильтровали через слой Al_2O_3 (1×1.5 см). Растворитель удалили в вакууме, а остаток растирали с гексаном. Отфильтровали осадок, получили 230 мг (72 %) основания Манниха **4**, т. пл. 135–137 °С (бензол). Масс-спектр высокого разрешения, найдено: m/z 636.4636 [M] $^+$. $\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_2$. Вычислено: $M = 636.4649$. ЯМР ^1H , δ , м.д. (J , Гц): 0.90 (3H, с, Me-25), 0.95 (3H, с, Me-24), 0.98 (6H, с, Me-26, 27), 1.04 (3H, с, Me-23), 1.67 (3H, с, Me-30), 1.81 (4H, м, 40, 40'), 2.66 (4H, м, 41, 41'), 3.13 (1H, дт, 19, $J_1 = 4$, $J_2 = 11$), 3.59 (2H, с, CH_2 -39), 4.59 (1H, с, 29), 4.73 (1H, с, 29), 7.37 (4H, м, 32, 36, 33, 35); ЯМР ^{13}C , δ , м.д.: 14.11 (C-27), 15.49 (C-26), 15.51 (C-25), 19.05 (C-30), 19.15 (C-6), 20.59 (C-24), 20.98 (C-11), 23.33 (C-41, 41'), 25.14 (C-12), 26.09 (C-23), 29.12 (C-21), 30.29 (C-15), 33.21 (C-16), 33.38 (C-7), 33.72 (C-2), 36.47 (C-22), 37.15 (C-13), 37.65 (C-10), 39.19 (C-1), 40.23 (C-8), 42.14 (C-14), 43.47 (C-39), 45.98 (C-19), 46.91 (C-4), 49.56 (C-9), 49.72 (C-18), 52.33 (C-40, 40'), 54.58 (C-5), 56.13 (C-17), 83.54 (C-38), 84.41 (C-37), 109.18 (C-29), 118.17 (C-34), 119.08 (C-32, 36), 131.96 (C-33, 35), 137.55 (C-31), 150.12 (C-20), 173.98 (C-28), 217.79 (C-3). ИК-спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 1697 (C=O); 2211 (C≡C). Найдено, %: C 80.95, H 9.57, N 4.26. $\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{N}_2\text{O}_2$. Вычислено, %: C 81.08, H 9.49, N 4.40.

Биология

В экспериментах использовали самцов беспородных мышей с массой тела 22–25 г, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО РАН. Во время опытов животные содержались в стандартных условиях, получали гранулированный корм и воду *ad libitum*, все манипуляции проводились в соответствии с Конвенцией о гуманном обращении с лабораторными животными.

Модель CCl_4 -гепатита. Острый токсический гепатит вызывали путем однократного введения в желудок мышам 25 % раствора CCl_4 в подсолнечном масле [6]. Тестируемые агенты вводили внутривентрикулярно в виде водно-твиновой взвеси за 1 ч до воспроизведения гепатита в дозах 50 мг/кг. Референсное соединение – антиоксидант дигидрохверце-

тин [(2*R*,3*R*)-3,5,7,3',4'-пентагидроксифлаванон] (99 % чистоты) – вводили в желудок в эффективной дозе 100 мг/кг. Животные контрольной группы получали водно-твиновую взвесь в эквивалентном объеме. В каждой группе было не менее 10 особей. Через 1 сут в сыворотке крови мышей определяли активность ЩФ, АЛТ, АСТ, используя стандартные наборы реактивов (Bioson, Olvex Diagnosticum). Уровень ТБК-реактивных соединений (ТБАРС) определяли общепринятым методом [7].

Модель воспаления, индуцированного гистамином. Воспалительный отек вызывали у 72 мышей введением в апоневроз задней лапы 0.1 % водного раствора гистамина в количестве 0.05 мл. Тестируемые соединения вводили внутрижелудочно в виде водно-твиновой взвеси в дозе 20 мг/кг за 1 ч до введения флогогена. Аналогично вводили референсный препарат индометацин (Fluka) в той же дозе. Животным контрольной группы вводили эквивалентное количество воды с твином. Через 5 ч после введения флогогена животных умерщвляли путем краниоцервикальной дислокации, отсекали задние лапы ниже голеностопного сустава и определяли массу каждой. На основе этих значений рассчитывали индекс воспаления как отношение разности масс здоровой и воспаленной лапы к массе здоровой. Противовоспалительный эффект оценивали по уменьшению индекса отека у животных опытных групп по сравнению с контролем.

Результаты обрабатывали статистически с помощью пакета программ Statistica 6.0. Различия считали достоверными с вероятностью $p < 0.05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ряду ацетиленовых производных бегулоновой кислоты обнаружены два соединения с комплексным действием: соединение **3**, обладающее выраженным гепатопротекторным и противовоспалительным действием, и агент **5**, проявляющий значительный антиоксидантный, гепатопротекторный и противовоспалительный эффекты. Кроме того, выявлены перспективные соединения с высокой противовоспалительной (агент **2**) и антиоксидантной (агент **1**) активностью.

Работа поддержана Интеграционным грантом СО РАН № 93 (2009–2011), грантом РАН 5.9.3 (2009–2011), грантом РФФИ 10-03-00257-а (2010–2012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Покровский А. Г., Плясунова О. А., Ильичева Т. Н., Борисова О. А., Федюк Н. В., Петренко Н. И., Петухова В. З., Шульц Э. Э., Толстиков Г. А. // *Химия уст. разв.* 2001. Т. 9. С. 485.
- 2 Сорокина И. В., Толстикова Т. Г., Жукова Н. А., Петренко Н. И., Шульц Э. Э., Узенкова Н. В., Грек О. Р., Позднякова С. В., Толстиков Г. А. // *Докл. РАН.* 2004. Т. 399. С. 274.
- 3 Vasilevsky S., Govdi A., Shults E., Shakirov M., Sorokina I., Tolstikova T., Baev D., Tolstikov G., Akabugin I. // *Bioorgan. Med. Chem.* 2009. Vol. 17. P. 5164.
- 4 Василевский С. Ф., Говди А. И., Шульц Э. Э., Шакиров М. М., Алабугин И. В., Толстиков Г. А. // *Докл. РАН.* 2009. Т. 424, № 5. С. 631.
- 5 Kuroyanagi M., Shiotsu M., Ebihara T., Kawai H., Ueno A., Fukushima S. // *Chem. Pharm. Bull.* 1986. Vol. 34. P. 4012.
- 6 Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. С. 832.
- 7 Камышников В. С. Справочник по клинико-химической лабораторной диагностике. Минск: Беларусь, 2000. Т. 2. С. 207.