

УДК 615.277.3.074

## Производные метилламбертианата – перспективные корректоры цитостатиков с гепатопротекторной и гемостимулирующей активностью

И. В. СОРОКИНА, Т. Г. ТОЛСТИКОВА, Д. С. БАЕВ, Н. А. ЖУКОВА, Ю. В. ХАРИТОНОВ

Новосибирский институт органической химии им. Н. Н. Ворожцова Сибирского отделения РАН, проспект Академика Лаврентьева, 9, Новосибирск 630090 (Россия)

E-mail: sorokina@nioch.nsc.ru

### Аннотация

Представлены результаты разработки трех оригинальных лабдановых антиоксидантов на основе метилового эфира ламбертиановой кислоты – доступного растительного метаболита кедрового сибирского *Pinus sibirica* R. Maug. В результате скрининга на модели токсического  $CCl_4$ -гепатита, индуцированного у мышей, выявлены агенты, превосходящие по антицитолитическому и антихолестазному действию известный флавоноид дигидрохверцетин. Показано, что в условиях гемодепрессии, вызванной введением крысам цитостатического препарата циклофосфана, соединения значительно уменьшают лейкопению, повышая количество гранулоцитов и моноцитов в крови. На фоне циклофосфана производные метилламбертианата проявляют более высокую по сравнению с дигидрохверцетином антиоксидантную активность. При этом азлактон демонстрирует выраженные антихолестазные свойства. Фармакологические свойства, обнаруженные у новых производных ламбертиановой кислоты, позволяют рассматривать их в качестве потенциальных корректоров химиотерапевтических препаратов.

**Ключевые слова:** метилламбертианат, гепатопротекторная, антиоксидантная, гемостимулирующая активность

### ВВЕДЕНИЕ

Вторичные растительные метаболиты, регулирующие жизненно важные функции целого растения и отдельных его клеток, – ценный источник практически важных синтонов при разработке оригинальных лекарственных препаратов. Данные соединения, как правило, хорошо переносятся животным организмом и обладают значимой биологической активностью (антиоксидантной, противовоспалительной гепатопротекторной, противовирусной, иммуномодулирующей и др.). Используя их в качестве исходных продуктов в процессе синтетической трансформации, можно получать агенты с дополнительными полезными свойствами. Перспективным, но относительно малоизученным классом растительных метаболитов являются лабданоиды. Известно, что терпеноиды лабданового ряда обладают цитотоксической активностью [1], ингибируют биосинтез холестерина [2] и агрегацию тромбоцитов [3], проявляют антилипоксигеназную активность [4]. На основе

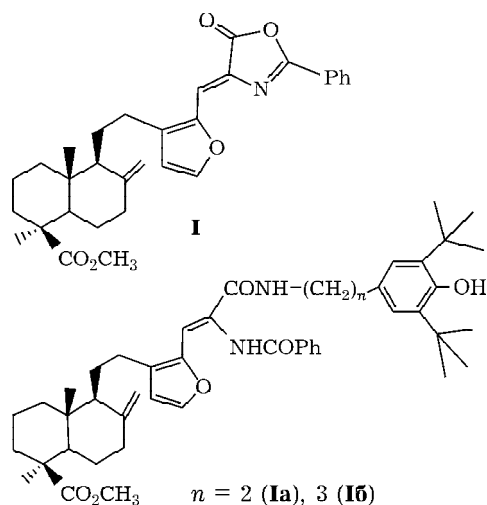
растительного лабданоида форсколина создан препарат для лечения глаукомы [5]. Одним из представителей этого класса соединений является ламбертиановая кислота, продуцируемая кедром сибирским *Pinus sibirica* R. Maug и легко выделяемая из живицы и хвои кедрового сибирского с выходом 3.0 и 0.92 % от массы исходного сырья соответственно.

Ранее на основе ламбертиановой кислоты и ее метилового эфира были получены ЦНС-активные производные с ноотропным, антидепрессивным и антипсихотическим действием [6–8]. Представляло интерес определить возможность получения из ламбертианата соединений с антиоксидантными, гепатопротекторными и гемостимулирующими свойствами, которые могли бы использоваться для коррекции расстройств, вызванных вредным воздействием токсических и лекарственных факторов. Необходимость в таких агентах-корректорах особенно высока в онкологической практике, где они применяются как средства дополнительной терапии для снижения побочных эффектов высокотоксичных противоопухолевых препаратов [9].

Недавно из метилламбертианата были синтезированы новые производные: азлактон лабданового типа и его производные, содержащие экранированные фенольные заместители в боковой цепи с различной длиной метиленового мостика. Целью работы было исследование их антиоксидантной, гепатопротекторной и гемостимулирующей активности на животных моделях.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

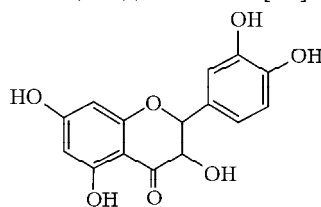
Исследованы следующие соединения: азлактон лабданового типа – *Z*-метил-16-(5-оксо-2-фенил-оксазол-4-илиденметил)-15,16-эпокси-8(17),13(16),14-лабдатриен-18-оат **I** и два его карбамоилвинилбензамидных производных – соединения **Ia** и **Ib**.



Синтез и физико-химические свойства соединений рассмотрены в работе [10].

Эксперименты проводили на самцах неинбредных мышей массой 20–25 г и самках крыс линии Вистар массой 180–200 г, предоставленных лабораторией разведения животных Института цитологии и генетики СО РАН. Во время опытов животные содержались в пластиковых клетках на стандартном гранулированном корме. Все манипуляции проводились в соответствии с Европейской конвенцией о гуманном обращении с лабораторными животными 1986 г. В качестве референсного агента в работе использовали дигидрокверцетин [(2*R*,3*R*)-3,5,7,3',4'-пентагидроксифлаванон] (99 % чистоты) **II**, обладающий антиоксидант-

ным, гепатопротекторным и капилляроукрепляющим действием [10].



**II**

Антиоксидантную и гепатопротекторную активность синтезированных соединений определяли на стандартной модели токсического  $\text{CCl}_4$ -гепатита у мышей. Модель воспроизводилась согласно методическим рекомендациям [12]. Раствор  $\text{CCl}_4$  в растительном масле (25 %) вводился внутривентрикулярно всем мышам. Исследуемые соединения **I**, **Ia**, **Ib** и референсный агент вводили тем же путем в дозе 100 мг/кг в виде водно-твиновой взвеси за 1 ч до гепатотоксина. Животные контрольной группы получали водно-твиновую взвесь. В каждой группе было по 10 животных. Через 1 сут в сыворотке крови мышей определяли активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) с помощью стандартных наборов реактивов (“Ольвекс”, Германия) и концентрацию малонового диальдегида (МДА) по общепринятому методу [13].

Изучение протекторного действия производных метилламбертианата **I**, **Ia**, **Ib** в условиях поражения циклофосфаном (ЦФ) проводили на самках крыс. Циклофосфан (препарат для инъекций, “Лэнс”, Москва) вводился однократно внутривентрикулярно в дозе 125 мг/кг в растворе 0.9 % NaCl всем животным. Изучаемые соединения в виде водно-твиновой взвеси вводили внутривентрикулярно группе крыс в дозе 50 мг/кг в течение 3 сут после введения ЦФ. Референсной группе вводили дигидрокверцетин (ДКВ) в той же дозе аналогичным образом, контрольной группе – только ЦФ. В каждой группе было по 10–12 особей. В конце опыта с помощью гемоанализатора (MEDONIC) определяли состав периферической крови. Лейкоцитарную формулу подсчитывали под световым микроскопом в мазках крови, окрашенных гематоксилин-эозином. В сыворотке крови с помощью стандартных наборов реактивов определяли активность АЛТ, АСТ, ЩФ, концентрацию общего белка, глюкозы и

МДА по методике, описанной в работе [13]. Результаты обрабатывали статистически с помощью пакета программ Statistica 6.0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование антиоксидантного и гепатопротекторного действия на модели токсического гепатита показало, что азлактон **I** оказывает антицитолитический эффект, достоверно снижая активность трансаминаз в крови в 1.3–1.5 раза по сравнению с контролем (табл. 1).

По антицитолитическому действию агент **I** не уступает ДКВ, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых различий в показателях между соответствующими группами. Его производные с пространственно-затрудненным фенильным заместителем **Ia** и **Iб** также проявляют достоверный антицитолитический эффект. Агент **Ia** снижает активность трансаминаз в крови в 1.3 раза, агент **Iб** – в 1.7–1.9 раза по сравнению с контролем. Оба агента не уступают ДКВ по влиянию на уровень АЛТ (различия между груп-

пами не достоверны), а агент **Iб** превосходит референс-соединение в 1.7 раза по влиянию на активность АСТ. Все тестируемые производные метилламбертианата достоверно уменьшают активность ЩФ, что свидетельствует об их антихолестазажном действии. Азлактон **I** понижает уровень ЩФ в 1.9 раза, а его производные **Ia** и **Iб** – в 1.5 и 2 раза соответственно по отношению к контролю. По выраженности антихолестазажного эффекта агенты **I** и **Iб** превосходят референс в 1.4–1.5 раза, а соединение **Ia** не уступает ДКВ.

Все производные метилламбертианата, так же как и ДКВ, в условиях данного опыта не проявили антиоксидантного эффекта, поскольку концентрация МДА в соответствующих группах не имела достоверных различий с контролем (см. табл. 1).

На модели циклофосфанового поражения установлено, что азлактон **I** достоверно уменьшает активность ЩФ относительно контроля и референс-соединения. Отмеченный антихолестазажный эффект в 1.7 раз по сравнению с ДКВ. Напротив, его производные **Ia** и **Iб** антихолестазажного действия не оказывают (табл. 2).

ТАБЛИЦА 1

Влияние производных метилламбертианата на биохимические показатели сыворотки крови мышей с индуцированным  $CCl_4$ -гепатитом

Группа	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л	ЩФ, Ед/л	МДА, мкмоль/л
Контроль	880.80±37.12	554.00±48.34	174.6±15.6	3.56±0.35
<b>I</b>	701.50±61.29*	373.16± 49.00*	94.2±12.6**#	4.55±0.46#
<b>Ia</b>	655.80±55.46**	411.07±43.58*	119.4±7.2*	3.75±0.12#
<b>Iб</b>	515.58± 60.41***	290.14±46.17***	84.6±9.6***#	3.07±0.24
Дигидрокверцетин	577.24±25.81***	480.47±41.14	130.8±8.4*	3.28±0.11

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  относительно контроля.

# $p < 0.05$  относительно дигидрокверцетина.

ТАБЛИЦА 2

Влияние производных метилламбертианата на средние значения биохимических показателей сыворотки крови крыс на фоне интоксикации циклофосфаном

Группа	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л	ЩФ, Ед/л	МДА, мкмоль/л	Общий белок, г/л	Глюкоза, ммоль/л
Контроль	54.3±6.8	73.9±7.9#	129.0±9.5	1.93±0.09#	63.1±2.34	16.43±1.02
<b>I</b>	62.6±2.9	81.4±7.1#	87.1±14.2*#	1.92±0.07#	60.26±4.17	14.93±0.64
<b>Ia</b>	67.3±3.8	69.5±4.7#	122.8±15.1	1.98±0.05	59.89±2.32	3.53±0.55*
<b>Iб</b>	65.3±4.3	86.4±9.2#	146.2±16.7	1.86±0.17	58.73±2.92	14.64±0.36
Дигидрокверцетин	55.2±5.2	53.7±3.9*	146.3±13.6	2.57±0.09*	63.14±1.52	14.19±0.70

\* $p < 0.05$  относительно контроля.

# $p < 0.05$  относительно дигидрокверцетина.

ТАБЛИЦА 3

Влияние производных метилламбертианата на средние значения показателей периферической крови крыс

Группа	RBC	HCT	WBC	HGB	PLT	MCV	RDW%	MPV
Контроль	5.06±0.21	28.0±1.2	0.9±0.1	15.5±0.8	93.9±8.4	55.3±1.0	10.2±0.4	8.8±0.01
<b>I</b>	5.34±0.20	30.2±1.0	1.5±0.1*	16.6±0.7	107.9±9.6	55.0±0.5	10.8±0.6	8.7±0.04
<b>Ia</b>	5.25±0.31	28.4±1.2	1.1±0.2	16.3±0.3	97.4±8.8	53.9±0.8	10.7±0.6	8.6±0.05*
<b>Iб</b>	4.33±0.24*	23.7±1.4*	1.7±0.3*	14.2±0.6	101.1±17.2	58.5±1.9	10.6±0.3	8.5±0.1*
ДКВ	4.19±0.20*	22.6±0.9*	1.4±0.2	14.2±0.6	88.3±8.9	55.3±0.8	10.2±0.6	9.3±0.1*
Норма	6.87±0.14	38.7±0.7	17.0±0.9	19.7±0.6	257.0±21.2	57.1±0.9	13.3±0.7	9.0±0.1

\* $p < 0.05$  относительно контроля.

*Примечание.* ДКВ – дигидрокверцетин, RBC – количество эритроцитов, HCT – гематокрит, WBC – боциты, MCV – средний объем эритроцитов, RDW% – процент распределения по абсолютной массе красной среднее содержание гемоглобина в эритроците, MCHC – средняя концентрация гемоглобина.

Все синтезированные соединения (**I**, **Ia** и **Iб**) не вызвали существенных изменений в концентрации МДА в крови по сравнению с контролем. Вместе с тем, они понизили уровень МДА в 1.3–1.4 раза относительно ДКВ, который в условиях данного опыта усилил интенсивность пероксидного окисления. На фоне ЦФ производные метилламбертианата не оказали влияния на активность трансаминаз, тогда как ДКВ достоверно снизил активность одной из них – АСТ. Значимых различий между агентами и референс-соединением по влиянию на показатели общего обмена (общий белок, глюкозу) не обнаружено.

В результате изучения влияния метилламбертианатов на картину периферической крови установлено, что азлактон **I** проявляет гемостимулирующий эффект, достоверно повышая количество лейкоцитов в периферической крови в 1.7 раза относительно контроля (табл. 3). Соответствующий эффект ДКВ оказался менее выраженным (в 1.5 раза).

В отношении остальных показателей крови отмечена тенденция к их нормализации под действием соединения **I**, положительный эффект которого превышает эффект ДКВ. Так, под влиянием азлактона **I** количество эритроцитов и тромбоцитов увеличивается в 1.3 и 1.2 раза соответственно; уровень гематокрита и гемоглобина повышается в 1.3–1.2 раза по сравнению с таковым при введении ДКВ. (Отмечено, что в группе с введением ДКВ среднее содержание и концентрация гемоглобина в эритроците достоверно выше по сравнению с контролем). На фоне гемодепрессии, вызванной ЦФ, у одного из производных азлактона **Iб** отмечены однонаправленные с ДКВ сдвиги в показателях периферической крови. Этот же агент (**Iб**) достоверно снижает лейкопению, повышая в 1.9 раза количество лейкоцитов в крови относительно контроля, что превышает аналогичный эффект ДКВ (1.6 раза). Кроме того, для агента **Iб** выявлено небольшое (в 1.2 раза) снижение количества

ТАБЛИЦА 4

Влияние производных метилламбертианата на средние значения показателей лейкоцитарной формулы крови крыс на фоне интоксикации циклофосфаном

Группа	Эозинофилы	Нитрофилы		Моноциты	Лимфоциты
		П/ядерные	С/ядерные		
Контроль	0	0	1.43±0.48	2.43±0.81	96.14±0.51
<b>I</b>	0	0	1.14±0.51	3.71±0.42	95.14±0.40
<b>Ia</b>	0.29±0.18	0	3.43±0.84	4.57±0.57	91.86±0.99
<b>Iб</b>	0.43±0.20	0	1.29±0.68	5.71±1.04	92.57±1.64
ДКВ	0	0	0.71±0.29	4.71±0.47	94.57±0.48
Норма	0.86±0.46	0	19.29±1.44	7.14 ±1.06	72.61±1.44

на фоне интоксикации циклофосфаном

МСН	МСНС
30.6±0.6	55.5±0.6
31.??±0.3	56.4±0.6
31.1±0.6	57.7±0.5*
33.0±0.8*	57.4±0.3*
33.9±0.3*	61.3±0.8*
29.7±0.5	52.0±0.4

количество лейкоцитов, HGB – гемоглобин, PLT – тромбоциты, MPV – объем тромбоцитов, МСН –

эритроцитов по сравнению с контролем, которое коррелирует с таким же снижением показателя гематокрита. Относительное уменьшение эритроцитарной массы у животных этой группы компенсируется небольшим достоверным повышением количественных показателей гемоглобина в эритроцитах (МСН, МСНС). Соединение **Ia** не вызвало достоверных изменений в показателях периферической крови и, таким образом, не оказало гемостимулирующего действия.

На фоне нейтропении, вызванной ЦФ, наблюдалась тенденция к увеличению количества гранулоцитарных клеток под действием всех изучаемых соединений **I**, **Ia** и **Ib**. В этих же группах в крови животных выявлено относительное повышение количества моноцитов. Отмеченная тенденция к стимуляции клеток лейкоцитарного ряда оказалась более выраженной для соединения **Ib** по сравнению с ДКВ (табл. 4).

Таким образом, показано, что производные метилламбертианата **I** и **Ib** при внутрижелудочном введении в дозе 50 мг/кг на фоне гемодепрессии, вызванной введением ЦФ, уменьшают лейкопению и превосходят ДКВ по стимулирующему влиянию на лейкоцитарный росток крови. Агент **Ia** в тех же условиях не проявляет значимого гемостимулирующего эффекта.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Производные ламбертианата **I**, **Ia**, **Ib** при внутрижелудочном введении оказывают гепа-

топротекторное действие, снижая выраженность цитолитических и холестатических процессов на фоне токсического ССІ<sub>4</sub>-гепатита. В условиях поражения циклофосфаном азлактон **I** превосходит ДКВ по антихолестатическому и антиоксидантному эффекту; у его производных **Ia** и **Ib** антицитолитический эффект ниже, а антиоксидантный – выше по сравнению с ДКВ.

На фоне гемодепрессии, вызванной циклофосфаном, азлактон проявляет гемостимулирующий эффект, который выражается в повышении количества лейкоцитов с тенденцией к нормализации других показателей периферической крови. Соединение **Ib** уменьшает лейкопению и превосходит ДКВ по стимулирующему влиянию на лейкоцитарный росток крови. Агент **Ia** в тех же условиях не проявляет значимого гемостимулирующего эффекта.

Сделано заключение о том, что введение ди-*трет*-бутилфеноксикарбонилвинильного заместителя в молекулу метилового эфира ламбертиановой кислоты приводит к снижению протекторных свойств, при этом имеет значение длина метиленового мостика перед экранированным фенильным заместителем. С увеличением длины линкера, соединяющего лабдановый и фенольный заместитель, активность соединения возрастает. Представленные результаты свидетельствуют о перспективности метилламбертианата как синтона для получения потенциальных корректоров цитостатических препаратов [14, 15].

Работа выполнена при финансовой поддержке Междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 93 (“Развитие исследований в области медицинской химии и фармакологии как научной основы разработки отечественных лекарственных препаратов”).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Shan Y., Wang X., Zhou X. // Chem. Pharm. Bull. 2007. Vol. 55, No. 2. P. 376.
- 2 Tanabe M., Chen Y. D., Saito K., Kano Y. // Chem. Pharm. Bull. 1993. Vol. 41, No. 4. P. 710.
- 3 Wang E., Luo B., Mak T. // Tetrahedron Lett. 1994. Vol. 35, No. 40. P. 7401.
- 4 Herlem D., Khung-Huu F., Kande A. // Tetrahedron Lett. 1993. Vol. 34, No. 35. P. 5587.
- 5 Forscolin-Irs Chemical, Biological and Medical Potential. / N. de Souza, A. Dohadwalla, R. Rupp (Eds). Bombay, Hechst India, 1986.

- 6 Толстикова Т. Г., Сорокина И. В., Воевода Т. В., Шульц Э. Э., Толстиков Г. А. // Докл. РАН. 2001. Т. 376, № 2. С. 271.
- 7 Толстикова Т. Г., Воевода Т. В., Долгих М. П., Сорокина И. В. // Эксперим. и клин. фармакология. 2002. Т. 5, № 2. С. 9.
- 8 Tolstikova T. G., Sorokina I. V., Dolgikh M. P., Kharitonov Yu. V., Chernov S. V., Shults E. E., Tolstikov G. A. // Pharm. Chem. J. 2004. Vol. 38, No. 10. P. 532.
- 9 Гольдберг Е. Д., Зуева Е. П. Препараты из растений в комплексной терапии злокачественных новообразований. Томск: Изд-во Томск. ун-та, 2000. 125 С.
- 10 Харитонов Ю. В., Шульц Э. Э., Шакиров М. М., Толстиков Г. А. // ЖОрХ. 2007. Т. 43, № 6. С. 843.
- 11 Плотников М. Б., Тюкавкина Н. А., Плотникова Т. М. Лекарственные препараты на основе диквертина. Томск: Изд-во Томск. ун-та, 2005. 228 с.
- 12 Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. 832 с.
- 13 Камышников В. С. Справочник по клинико-химической лабораторной диагностике. Т. 2, Минск, Беларусь, 2000. с. 207.
- 14 Пат. РФ 2346940, 2009.
- 15 Пат. РФ 2353620, 2009.