

Е. Н. Кудинова¹, Н. Ф. Салахутдинов², В. В. Фоменко², Н. Н. Вольский³,
О. М. Перминова³, О. Н. Хоценко¹, Я. Ш. Шварц¹, М. И. Душкин¹

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДНОГО РЕЗОРЦИНА КАРИОФИЛЛЕНА НА БИОСИНТЕЗ ХОЛЕСТЕРИНА И НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

¹ ГУ НИИ терапии СО РАМН, Новосибирск;

² Новосибирский НИИ органической химии СО РАН;

³ ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск

Описан синтез водорастворимого соединения из группы терпеноидов – динатриевой соли резорцинового производного кариофиллена – и изучены его биологические свойства в сравнении с природными терпеноидами и аторвастатином. Синтезированный терпеноид (5 мг/мышь) снижает скорость биосинтеза ХС в печени мыши. Аналогичные эффекты обнаружены у аторвастатина (0,2 мг/мышь) и природных терпеноидов (8,5 мг/мышь), за исключением периллового спирта. Последний обладает стимулирующим эффектом. Кроме того, резорциновое производное кариофиллена дозозависимо ингибирует пролиферативный ответ спленоцитов мыши на митогенную стимуляцию *in vitro*. Его эффективность в данной реакции сравнима с эффективностью периллового спирта и α -терпинеола, но уступает эффективности дипентена и аторвастатина.

Синтетические конкурентные ингибиторы оксиметилглутарил-КоА-редуктазы (ОМГ-КоА-редуктаза), известные под названием статинов, подавляют синтез эндогенного холестерина (ХС) и в последние годы широко применяются как антиатерогенные средства. Так как помимо ХС продуктами “мевалонатного пути”, ключевую реакцию которого катализирует ОМГ-КоА-редуктаза, являются нециклические изопреноиды, выполняющие в клетках сигнальные функции, статины обладают также другими эффектами, не связанными с синтезом ХС и его производных. В частности, в экспериментах на животных показано, что статины могут оказывать противовоспалительное действие, ингибируя экспрессию провоспалительных цитокинов [1, 2].

Широко представленные в растениях терпеноиды (терпены и их производные), хотя и оказывают более мягкое воздействие на синтез ХС, но значительно менее токсичны, чем статины [3, 4]. Экспериментальные работы свидетельствуют, что эти соединения проявляют противовоспалительные, бактерицидные и противоопухолевые свойства [5–7]. На основании этого

можно предполагать, что синтетические аналоги природных терпеноидов будут обладать полезными фармакологическими свойствами. Целью данной работы был синтез динатриевой соли резорцинового производного кариофиллена (РПК) и изучение его биологической активности в сравнении со свойствами природных терпеноидов и аторвастатина (препарата из группы статинов).

Экспериментальная химическая часть

РПК и его соль синтезировали следующим образом: к суспензии в хлористом метиле 150 мг твердого катализатора НВ-2 (цеолит НВ-2 типа бета { $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 40$, размер пор 0,7–0,8 нм, весовое содержание оксидов Na_2O — 0,04 %, Al_2O_3 – 5,14 %, SiO_2 – 81,57 %} производства НИЦ “Цеосит” (г. Новосибирск), полученный по методике [8]), прокаленного перед использованием в течение 2 ч при 500 °С, добавляли по каплям при перемешивании суспензию 218 мг кариофиллена и 118 мг резорцина в 10 мл хлористого метилена. Реакционную смесь выдерживали при перемешивании 20 ч при комнатной температуре, отфильтровывали на пористом стеклянном фильтре, промывали диэтиловым эфиром, упаривали на ротационном испарителе, выдерживали при 60 °С под вакуумом (10 мм рт.ст.) в течение 20 мин. Полученную реакционную массу делили на колонке с SiO_2 (ЧР, 40–100 мкм), элюируя вещества раствором, содержащим 1–10 % диэтилового эфира в гексане. Получили 193 мг продукта (выход 57 %, $[\alpha]_{580}^{20} + 33,8$, с 2,5 г/100 мл).

Строение РПК представлено на рис. 1. 4-(4,4,8-триметилтрицикло[6.3.1.0^{2,5}]додец-1-ил)фенил-1,3-диол, m/e для $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2$; спектр ^1H ЯМР (δ , м. д., J, Гц): 0,77 (с, C^{14}H_3), 0,86 (дд, H^3 , $\text{J}_{3,3'}$ 10, $\text{J}_{3,2}$ 10), 0,91 (с, C^{15}H_3), 1,08 (м, H^{9a}), 1,11 (д, H^{12a} , $\text{J}_{12a,12c}$ 13), 1,14 (м, 2 H^7), 1,47

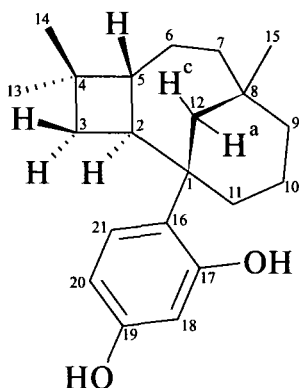


Рис. 1. Структурная формула резорцинового производного кариофиллена

(м, Н^{9c}), 1,64 (дд, Н³, J 10, J_{3,2} 8), 1,90 (дм, Н^{10c}, J_{10c,10a} 13), 2,12 (шд, Н^{12c}, J 13), 2,40 (ддд, Н², J_{2,5} 12, J 10, 8), 6,11 (д, Н¹⁸, J_{18,20} 2,2), 6,13 (дд, Н²⁰, J_{20,21} 8, J 2.2), 6,86 (д, Н²¹, J 8), 6,98 шс и 7,11 шс (2ОН).

Динатриевая соль РПК была получена добавлением к раствору очищенного колоночной хроматографией РПК в абсолютном метаноле эквимолярного количества метилата натрия.

Экспериментальная биологическая часть

Опыты проводили на мышах-самцах линии С57В1 и гибридных самцах (СВА × С57В1)F₁ в возрасте 3–4 мес. РПК вводили животным внутрибрюшинно в дозе 5 мг/мышь, препараты сравнения: природные терпеноиды (перилловый спирт, дипентен (лимонен), α-терпинеол, 1,8-цинеол) — в дозе 8,5 мг/мышь и аторвастатин (липримар, “Pfizer”, Германия) — в дозе 0,2 мг/мышь.

Влияние исследуемых препаратов на стимулированную митогеном (конканавалином А) пролиферацию спленоцитов мышей оценивали стандартным методом по интенсивности включения [³H]-тимидина в делящиеся клетки. Спленоциты культивировали в течение 72 ч. Результаты выражали в условных единицах (имп/мин).

Выраженность воспалительной реакции на внутрибрюшинное введение зимозана (0,75 мг/мышь) оценивали по количеству клеток в перитонеальном экссудате через 48 ч после стимуляции.

Для определения влияния исследуемых веществ на скорость биосинтеза ХС в печени использовали модель повышения синтеза ХС при остром асептическом воспалении, вызванном зимозаном [9]. Для этого исследуемые соединения вводили внутрибрюшинно мышам-самцам линии С57В1 трижды: за сутки до введения зимозана, в день введения зимозана (внутрибрюшинно, в дозе 0,75 мг/мышь) и на следующие сутки. Животных забивали через 48 ч после введения зимозана. За 2 ч до забоя мышам внутрибрюшинно вводили [1,2-¹⁴C]-ацетат натрия в дозе 60 мкКи на 100 г массы тела. Липиды из гомогената печени экстрагировали смесью хлороформа и метанола, после чего фракцию ХС выделяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol [10]. После проведения хроматографии липидное пятно, соответствующее ХС, вырезали, помещали в сцинтилляционные флаконы и измеряли уровень радиоактивности в жидкостном сцинтилляционном счетчике.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica 6.0. Достоверность отличий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Везде в тексте и в таблице даны значения средних величин и их стандартных ошибок ($M \pm m$).

Результаты и их обсуждение

Известно, что развитие воспалительных реакций сопровождается экспрессией ОМГ-КоА-редуктазы и

стимуляцией синтеза холестерина в печени [11, 12]. В наших экспериментах асептическое воспаление вызывалось внутрибрюшинным введением зимозана, дрожжевого полисахарида, и приводило к двукратному увеличению скорости включения меченого ацетата в холестерин печени мышей (рис. 2). На этом фоне введение мышам соли РПК приводит к существенно уменьшению скорости биосинтеза холестерина, которая снижается до уровня, наблюдаемого у интактных животных. Аналогичные эффекты обнаружены также у аторвастатина и природных терпеноидов, за исключением периллового спирта.

Выраженность воспалительной реакции в ответ на внутрибрюшинное введение зимозана является интегральным показателем функциональной активности иммунокомпетентных клеток, отражая соотношение секретируемых ими про- и противовоспалительных цито-

Влияние резорцинового производного кариофиллена (РПК) и природных терпеноидов на уровень стимулированной конканавалином А пролиферации спленоцитов интактных мышей *in vitro*.

Соединение	Концентрация, мкМ	Уровень пролиферации, % от контроля
Контроль ¹	—	100 ± 5
РПК	100	95 ± 6
	200	81 ± 5**
	300	67 ± 5**
	400	59 ± 4**
	500	53 ± 2**
	600	47 ± 3**
Перилловый спирт	25	110 ± 4
	50	114 ± 11
	100	106 ± 11
	200	48 ± 10**
Дипентен	6	86 ± 6
	12,5	80 ± 5**
	25	73 ± 5**
	50	52 ± 7**
	100	12 ± 5**
α-Терпинеол	200	1 ± 0,4**
	50	96 ± 5
	100	99 ± 5
	200	72 ± 8*
	300	26 ± 3**
1,8-Цинеол	400	4 ± 0,7**
	100	98 ± 4
	200	95 ± 6
	300	106 ± 3
Аторвастатин	400	102 ± 5
	500	73 ± 7*
	0,32	75 ± 18
	0,64	29 ± 8*
	1,6	12 ± 0,3*
	3,2	1 ± 0,07*

¹ 100 % соответствуют 34 × 10³ имп / мин (для РПК) и 18 × 10³ имп / мин (для природных терпеноидов и аторвастатина)

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем

** $p < 0,01$ по сравнению с контролем

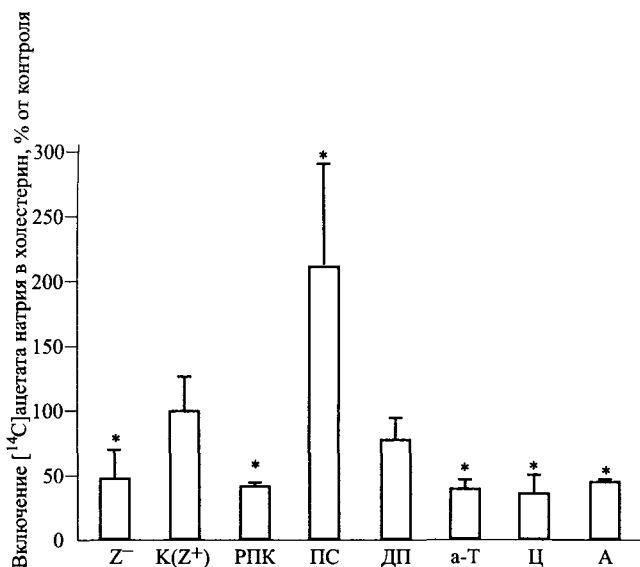


Рис. 2. Влияние резорцинового производного кариофиллена на биосинтез холестерина в печени мышей. Z⁻ — без зимозана, K(Z⁺) — контроль с зимозаном, РПК — резорциновое производное кариофиллена, ПС — перилловый спирт, ДП — дипентен, а-Т — α-терпинеол, Ц — 1,8-цинеол, А — аторвастатин. 100 % соответствуют 237 имп/мин. * p < 0,05 по сравнению с контролем

кинов, хемокинов и других биоактивных молекул, а также способность клеток отвечать на эти регуляторные воздействия. Как видно из результатов, представленных на рис. 3, соль РПК и большинство исследованных природных терпеноидов обладают слабо выраженной способностью подавлять накопление клеток в воспалительном экссудате. Из этой группы веществ только у периллового спирта обнаружен существенный супрессивный эффект. Аторвастатин, согласно результатам наших экспериментов, обладает значимой противовоспалительной активностью, как это уже отмечалось ранее другими авторами [13, 14].

Данные о влиянии РПК, природных терпеноидов и аторвастатина на пролиферацию спленоцитов представлены в таблице. Видно, что РПК дозозависимо ингибирует пролиферативный ответ спленоцитов мыши на митогенную стимуляцию. При этом уровень 50-процентной супрессии этой реакции достигается при концентрации синтетического терпеноида в культуре, равной 500 – 600 мкМ. Наиболее эффективным среди природных терпеноидов оказался дипентен, достоверно подавляющий пролиферативный ответ спленоцитов на митоген в концентрации 12,5 мкМ и выше, хотя и его минимальная действующая концентрация существенно превышала таковую аторвастатина (0,32 мкМ). Перилловый спирт и α-терпинеол достоверно подавляют клеточную пролиферацию в концентрациях, превышающих 100 – 200 мкМ. В то же время 1,8-цинеол в тех же концентрациях не оказывает значимого влияния на пролиферацию лимфоцитов в культуре *in vitro*. Таким образом, эффективность РПК в данной реакции сравнима с эффективностью периллового спирта и α-терпинеола, но уступает эффективности дипентена.

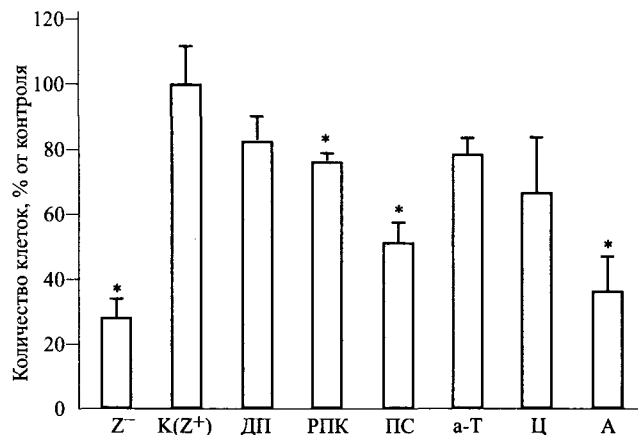


Рис. 3. Влияние резорцинового производного кариофиллена на количество клеток в перитонеальном экссудате мыши в модели асептического воспаления. Z⁻ — без зимозана, K(Z⁺) — контроль (с зимозаном — 0,75 мг/мышь), ДП — дипентен, РПК — резорциновое производное кариофиллена, ПС — перилловый спирт, а-Т — α-терпинеол, Ц — 1,8-цинеол, А — аторвастатин; 100% соответствуют 36,1 млн. клеток воспалительного экссудата в контроле. * p < 0,05 по сравнению с контролем

Имеющиеся на сегодня литературные данные о влиянии терпеноидов на пролиферативную активность лимфоцитов немногочисленны и неоднозначны. Обнаружено, что пероральное введение лимонена способно усиливать стимулированную конканавалином А пролиферацию спленоцитов крысы [15]. В то же время в другой работе показано, что лимонен и перилловый спирт в концентрациях 5 мМ и 1,25 мМ, соответственно, значительно подавляют пролиферацию лимфоцитов в ответ на другой Т-клеточный митоген — фитогемагглютинин [16].

По предварительным данным, РПК является малотоксичным и после дальнейшего доклинического изучения он может рассматриваться как перспективное средство, обладающее гипохолестеринемическим и противовоспалительным действием.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Kleemann, H. M. Princen, J. W. Jukema, et al., *Circulation*, **108**(11), 1368 – 1374 (2003).
2. G. K. Sukhova, J. K. Williams, and P. Libby, *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.*, **22**(9), 1452 – 1458 (2002).
3. W. S. Kim, M. M. Kim, H. J. Choi, et al., *Invest. New Drugs*, **19**(1), 81 – 83 (2001).
4. S. Morgan-Meadows, S. Dubey, M. Gould, et al., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **52**(5), 361 – 366 (2003).
5. U. R. Juergens, T. Engelen, K. Racke, et al., *Pulm. Pharmacol. Ther.*, **17**(5), 281 – 287 (2004).
6. A. Raman, U. Weir, and S. F. Bloomfield, *Lett. Appl. Microbiol.*, **21**(4), 242 – 245 (1995).
7. P. L. Crowell, A. S. Ayoubi, and Y. D. Burke, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **401**, 131 – 136 (1996).
8. R. L. Wadlinger, G. T. Kerr, and E. J. Rosinski, *Mobil Oil Corp.*, № US 3308069, заявл. 01.05.1964, опубл. 07.03.1967.
9. М. И. Душкин, Е. А. Корнюш, Л. М. Поляков и др., *Биохимия*, **57**(8), 1181 – 1191 (1992).
10. Ю. Кирхнер, *Тонкослойная хроматография*, Т. 2, Мир, Москва (1981), сс. 52 – 106.
11. K. R. Feingold, I. Hardardottir, R. Memon, et al., *J. Lipid Res.*, **34**(12), 2147 – 2158 (1993).

12. Я. С. Шварц, М. И. Душкин, *Биохимия*, **67**(7), 747 – 752 (2002).
13. I. Inoue, S. Goto, K. Mizotani, et al., *Life Sci.*, **67**(3), 863 – 876 (2000).
14. O. Grip, S. Janciauskiene, and S. Lindgren, *Inflamm. Res.*, **51**(2), 58 – 62 (2002).
15. M. Hamada, K. Uezu, J. Matsushita, et al., *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **48**(2), 155 – 160 (2002).
16. S. Schulz, F. Buhling, and S. Ansorge, *Eur. J. Immunol.*, **24**(2), 301 – 307 (1994).

Поступила 30.08.05

EFFECT OF SYNTHETIC CARYOPHYLLENE RESORCINOL DERIVATIVE ON CHOLESTEROL BIOSYNTHESIS AND THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF IMMUNE SYSTEM CELLS

E. N. Kudinova¹, N. F. Salakhutdinov², V. V. Fomenko², N. N. Vol'skii³, O. M. Perminova³, O. N. Khoshchenko¹, Y. Ch. Shwarts¹, and M. I. Dushkin¹

¹ Institute of Internal Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia;

² Vorozhtsov Institute of Organic Chemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;

³ Institute of Clinical Immunology, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia

The synthesis of a water-soluble compound from terpenoid group, a disodium salt of resorcinol derivative of caryophyllene, was described. The biological properties of this compound were studied in mice in comparison to the native terpenoids and atorvastatin. The synthesized terpenoid (5 mg/mouse) decreases the rate of cholesterol biosynthesis in murine liver. Similar effects were observed for atorvastatin (0.2 mg/mouse) and native terpenoids (8.5 mg/mouse), except for perillic alcohol, which produced a stimulating action. In addition, the obtained resorcinol derivative of caryophyllene inhibits mitogen-stimulated murine splenic cell proliferation *in vitro* in a dose-dependent manner. The drug efficacy in this reaction is comparable with that of perillic alcohol and α -terpineol, while being less pronounced than the effect of dipentene and atorvastatin.