

© Коллектив авторов, 2017

М. Б. Плотников¹, О. И. Алиев¹, А. В. Сидехменова¹, Е. В. Попова¹,
О. И. Острикова¹, А. В. Кучин², И. Ю. Чукичева², М. А. Торлопов²

СИНТЕЗ, АНТИРАДИКАЛЬНАЯ И ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ 2,6-ДИИЗОБОРНИЛ-4-МЕТИЛФЕНОЛА И ПОЛИСАХАРИДОВ

¹ ФГБНУ "НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е. Д. Гольдберга", Томский НИМЦ, СО РАМН, Россия, 634028, Томск, пр. Ленина, 3; e-mail: mbp2001@mail.ru

² Институт химии Коми НЦ УрО РАН, Россия, 167982, Сыктывкар, ул. Первомайская, 48.

В экспериментах *in vitro* исследованы антирадикальная и гемореологическая активности производных, синтезированных на основе 2,6-дизоборнил-4-метилфенола (дизорнола) и полисахаридов (инулин, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксиэтилированный крахмал). Среди представленных соединений наибольшую антирадикальную активность в системе с водорастворимым стабильным радикалом АВТС** проявил полимер-конъюгат дизорнол-гидроксиэтилированный крахмал. На модели гипервязкости крови *in vitro* полимер-конъюгат дизорнол-гидроксиэтилированный крахмал в конечной концентрации 10^{-5} г/мл крови достоверно ограничивал повышение вязкости крови.

Ключевые слова: дизорнол; инулин; карбоксиметилцеллюлоза; крахмал.

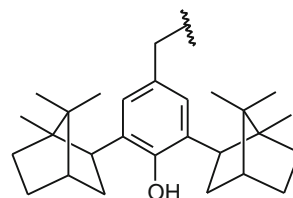
Активация свободнорадикальных процессов и нарушение реологических свойств крови играют значимую роль в патогенезе острых нарушений мозгового и коронарного кровообращения, острых кровопотерях, отравлениях, травмах различных органов и тканей [1 – 4]. В настоящее время в терапии неотложных состояний, развивающихся при этих патологиях, не используются средства, направленные на коррекцию данных сдвигов. Одной из причин этого является отсутствие препаратов для парентерального введения с антиоксидантной и гемореологической активностью.

Проведенные ранее нами исследования показали, что вещества полифенольной структуры способны ограничивать нарушение реологических свойств крови и проявлять антиоксидантные свойства при недостаточности кровообращения различного генеза (ишемия головного мозга, инфаркт миокарда) [5 – 7], однако низкая растворимость в воде ограничивает их применение в острой стадии инсульта и коронарного синдрома. Одним из подходов к решению данной проблемы может являться создание гибридных макромолекулярных соединений, синтезированных на основе гидрофильных полимеров и соединений с высокой антиоксидантной активностью [8].

Целью настоящей работы является исследование антирадикальной и гемореологической активности водорастворимых гибридных макромолекулярных соединений, синтезированных на основе 2,6-дизоборнил-4-метилфенола (А, дизорнол) и полисахаридов (инулин, карбоксиметилцеллюлоза, гидроксиэтилированный крахмал (ГЭК)) (рисунок).

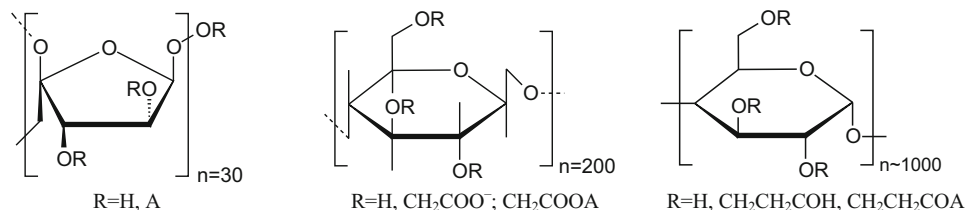
Экспериментальная химическая часть

Запись ЯМР спектров полученных полимер-конъюгатов проведена на спектрометре Bruker Avance II 300 (300 МГц) в дейтерированном диметилсульфоксиде (ДМСО) — ДМСО- d_6 при комнатной температуре по стандартной методике. В качестве внутреннего стандарта использованы сигналы ДМСО (δ_H 2,52 м.д.). ИК-спектры образцов записаны на спектрометре "Prestige-21" в таблетках КВг в области 700 – 4000 cm^{-1} . Определение массовой доли действующего вещества (терпенофенольного фрагмента) проведено методом УФ-спектроскопии сравнением интенсивности поглощения в области 280 нм. Для проведения анализа использован спектрофотометр ПЭ-5400УФ (Россия), бидистиллированная вода и предварительно перегнанный этиловый спирт.



Инулин (MP Biomedicals, LLS, ММ_{ср} (средняя молекулярная масса) 5×10^3); карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ, ММ_{ср} 68000, степень карбоксиметилирования 1,0); гидроксиэтилкрахмал ("Зерумверк Бернбург АГ", Германия, ГЭК, ММ_{ср} 200 000, степень гидроксиэтилирования 0,45 – 0,55).

Полимер-конъюгат дизорнола и инулина (I). Синтез полимер-конъюгата I проводили по ранее описанной методике [9]. Спектральные характеристики опытного образца соответствуют литературным дан-



Структурные формулы исследуемых соединений. А — диборнол; I — полимер-конъюгат диборнол-инулин; II — полимер-конъюгат диборнол-КМЦ; III — полимер-конъюгат диборнол-ГЭК.

ным. ИК-спектр (KBr, ν_{\max} , см^{-1}): 3323 (νOH), 2930 (νCH_3 , CH_2), 1573 ($\nu\text{ar C-C}$), 1410 (δCH_3 , CH_2), 1031 ($\nu\text{C-O-C}$). ЯМР ^{13}C (75 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 155,6 (C12), 131,5 (C11, C13), 129,1 (C15), 125,8 (C14, C16), 104,0 (C2'), 83,16 – 82,12 (C5'), 78,9 – 77,6 (C3'), 75,7 – 70,88 (C4'), 63,2 – 60,9 (C1', C6'), 50,7 (C1), 48,8 (C7), 46,0 (C4), 45,6 (C2), 34,4 (C3), 28,2 (C5), 22,3 (C8), 21,0 (C9), 13,4 (C10).

Полимер-конъюгат диборнола и натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (II). В колбе объемом 500 мл, содержащей 50 мл воды растворяют 2,5 г натриевой соли КМЦ и добавляют при перемешивании и охлаждении 100 мл 10 об. % предварительно приготовленного раствора соляной кислоты в этаноле. По истечении 2 ч КМЦ в форме свободной кислоты осаждают прибавлением 100 мл этанола, осадок отфильтровывают и промывают 50 % водным этанолом до нейтральной реакции промывных вод, затем промывают 96 % этанолом (100 мл) и ацетоном (100 мл), сушат на воздухе.

Полученную кислотную форму КМЦ диспергируют в 50 мл воды, нейтрализуют до $\text{pH} = 7,8$ раствором гидроксида тетрабутиламмония; полученный раствор лиофилизируют.

Высушенную соль КМЦ растворяют в 20 мл ДМСО в атмосфере азота. После перемешивания в течение 1 ч при температуре 25 °С и полного растворения КМЦ вносят 2,6-диизоборнил-4-бромометилфенол (0,56 г). Реакцию ведут при перемешивании в течение 6 ч при температуре (25 ± 2) °С, затем 6 ч при (35 ± 2) °С. После чего к реакционной смеси прибавляют водный раствор хлорида натрия (5 г NaCl растворяют в 100 мл воды) реакционную смесь очищают методом диализа против дистиллированной воды (до нейтральной реакции вод на галогенид-ион). Диализат упаривают до объема 100 мл и осаждают полимер прибавлением 500 мл этанола. Осажденный полимер отделяют центрифугированием, промывают этанолом 2 × 100 мл ацетоном 100 мл и сушат в вакууме при температуре 60 °С. Выход продукта (II) 2 г. Содержащие терпенофенола 2,0 масс. %.

ИК-спектр (KBr, ν_{\max} , см^{-1}): 3383 (νOH), 2924 (νCH_3 , CH_2), 1726 (νCOC сложные эфиры), 1600 ($\nu\text{-COO}^-$), 1417, 1323 (δCH_3 , CH_2), 1062 ($\nu\text{C-O-C}$ простые эфиры). Спектр ЯМР ^{13}C (75 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 177,4 (COO^-), 155,1 (Ar), 101,9 (C1'), 85,6 – 71 (C2'–C5'), 60,4 (C6'– CH_2COO^-), 30,84 (C3), 27,6 (C5), 23,8 (C8), 19,2 (C9), 13,44 (C10).

O-(((4-Гидрокси-3,5-ди(1,7,7-триметилбицикло[2.2.1]гепт-экс-2-ил)бензил)окси)этил)-O-(2-гидроксиэтил)-(1→4)- α -D-глюкан (III) — полимер-конъюгат А и ГЭК. Реакцию проводят в круглодонной трёхгорлой колбе объемом 1 л, снабженной мешалкой и термометром. ГЭК 50,0 г растворяют в 0,5 л ДМСО в атмосфере азота. К полученному раствору прибавляют мелко растёртый Na_2CO_3 (0,83 г) и продувают реакционный объём азотом. После перемешивания смеси в течение 10 мин при температуре 35 °С в токе азота 3 порциями с промежутком в 15 мин, вносят 2,6-диизоборнил-4-бромометилфенол (8,2 г). Реакцию ведут при перемешивании в течение 3 ч при температуре (35 ± 1) °С, затем 4 ч при (45 ± 1) °С. После чего реакционную смесь остужают, фильтруют через стеклянный фильтр

Влияние соединений в конечной концентрации 10^{-6} и 10^{-5} г/мл крови на вязкость крови крыс на модели гипервязкости крови *in vitro*

Группа	Вязкость крови, мПа · с	
	10 c^{-1}	300 c^{-1}
Диборнол-ГЭК (III) 10^{-6} г/мл крови		
Исходное значение	5,9 ± 0,1	4,1 ± 0,1
Контроль	6,9 ± 0,1	4,7 ± 0,1
Опыт	6,6 ± 0,5	4,5 ± 0,2
Диборнол-ГЭК (III) 10^{-5} г/мл крови		
Исходное значение	5,9 ± 0,1	4,1 ± 0,1
Контроль	6,9 ± 0,1	4,7 ± 0,1
Опыт	6,4 ± 0,1 ⁺	4,4 ± 0,2
Диборнол-инулин (I) 10^{-6} г/мл крови		
Исходное значение	6,1 ± 0,1	4,3 ± 0,1
Контроль	6,9 ± 0,1	4,7 ± 0,1
Опыт	6,9 ± 0,1	4,6 ± 0,1
Диборнол-инулин (I) 10^{-5} г/мл крови		
Исходное значение	6,2 ± 0,1	4,3 ± 0,1
Контроль	7,0 ± 0,1	4,8 ± 0,1
Опыт	6,9 ± 0,1	4,7 ± 0,1
Диборнол-КМЦ (II) 10^{-6} г/мл крови		
Исходное значение	6,1 ± 0,1	4,1 ± 0,1
Контроль	6,8 ± 0,1	4,5 ± 0,1
Опыт	6,7 ± 0,1	4,4 ± 0,1
Диборнол-КМЦ (II) 10^{-5} г/мл крови		
Исходное значение	6,0 ± 0,1	4,3 ± 0,1
Контроль	7,1 ± 0,1	4,8 ± 0,1
Опыт	7,1 ± 0,1	4,8 ± 0,1

⁺ Достоверные различия ($p < 0,05$) с контролем.

от нерастворимых примесей. Отфильтрованный раствор вносят в 2,5 л изопропилового спирта при перемешивании в течение 30 мин. Отделяют полимер, выпадающий в виде белого хлопьевидного осадка, и промывают горячим изопропиловым спиртом 2 раза по 0,5 л.

Для окончательной очистки раствор полимера диализуют против воды (диализные мешки CelluSep), затем лиофильно высушивают. Получен конъюгат III — 47,0 г (83 % от теоретического выхода).

Полимер-конъюгат III представляет собой порошок белого цвета (возможен бежевый оттенок) с включением легко рассыпающихся пластинок или комков, очень легкий, электризуется, без запаха, с содержанием терпенофенольного фрагмента 6,7 масс. %. Хорошо растворим в воде, водных растворах хлорида натрия умеренной концентрации и ДМСО; при нагревании — в N,N-диметилформамиде. Растворы прозрачные. Не растворим в спиртах, ацетоне, бензоле, хлороформе и диэтиловом эфире.

УФ-спектр раствора полимер-конъюгата III в водно-этанольной среде имеет максимум поглощения 280–284 нм, характерный для ароматической компоненты.

ИК-спектр диборнол – ГЭК (KBr, ν_{\max} , см^{-1}): 3404 (ОН), 2931 (СН, CH_2), 1456–1365 (CH_3 , CH_2), 1033 (С-О-С), 933 (С-О).

В спектрах ЯМР ^1H и ^{13}C присутствуют сигналы, соотносимые с ароматической и алифатической составляющими терпенофенола и с полисахаридной частью соединения.

ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), м.д.: 0,74, 0,81, 0,85 (с, 18H, CH_3 -9, CH_3 -9'; CH_3 -8, CH_3 -8'; CH_3 -10, CH_3 -10'); 1,20–1,38, 1,40–1,70, 1,70–1,95, 2,10–2,35 (м, 14H, терпеновый фрагмент); 2,80–4,30 (м, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ГЭК); 4,35–6,10 (м, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ ГЭК); 7,07 и 7,50 (м, 2H, H аром.). ЯМР ^{13}C (75 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д.): 155,1 (C12) 131,0 (C11, C13), 125,3 (C14, C16), 100,60 (C1'), 96,96 (C1' гидроксида этилированное звено), 79,69 (C4'), 73,64 (C3'), 72,74–70,39 (C2', C5', $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$), 60,95 (C6'), 50,18 (C1), 48,11 (C7), 45,52 (C4), 45,11 (C2), 33,90 (C3), 27,60 (C5), 21,80 (C8), 20,50 (C9), 12,80 (C10).

Экспериментальная биологическая часть

Антирадикальную активность оценивали спектрофотометрическим методом по взаимодействию со стабильным водорастворимым радикал-катионом 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) диаммониевой соли (ABTS $^{*+}$) [10]. Соединения растворяли в фосфатном буфере pH 7,4. Измерения проводили на UV-Vis спектрофотометре “Cary 50” (Varian, Australia) в кювете из кварцевого стекла с длиной оптического пути 1 см. Спектр записывали в интервале 700–800 нм. Строили линейные зависимости процента ингибирования ABTS $^{*+}$ от концентрации образца в растворе. На основании полученных уравнений линейной регрессии рассчитывали IC_{50} — концен-

трацию антиоксиданта, при которой нейтрализуется 50 % свободных радикалов.

Эксперименты по изучению гемореологической активности соединений на основе диборнола и полисахаридов проводили на 18 крысах-самцах сток SD массой 340–380 г. Животные получены из отдела экспериментальных биологических моделей “НИИФирМ им. Е. Д. Гольдберга” СО РАМН, Томск. Животных содержали при свободном доступе к воде и корму. Условия содержания и манипуляции с животными соответствуют стандартам, указанными в нормативных документах, регламентирующих работу с лабораторными животными [11].

Исследование гемореологической активности соединений проводили на модели гипервязкости крови *in vitro* [12]. Забор проб крови проводили под эфирным наркозом из общей сонной артерии через катетер. Кровь стабилизировали 3,8 % цитратом натрия в соотношении 9:1. Активность соединений исследовали в конечных концентрациях 10^{-5} и 10^{-6} г/мл крови. Соединения растворяли в физиологическом растворе и вносили в пробы крови в объеме 20 мкл на 1 мл крови. В контрольные пробы добавляли эквивалентное количество физиологического раствора. Вязкость крови измеряли на ротационном гемовискозиметре АКР-2 до и после инкубации проб крови при температуре $(43,0 \pm 0,4)^\circ\text{C}$ в течение 60 мин на скоростях сдвига 10 и 300 с^{-1} .

Обработку полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ “Statistica 6.0”. Для определения IC_{50} рассчитывали уравнения линейной регрессии. Рассчитывали среднее значение, стандартную ошибку среднего значения. Достоверность межгрупповых различий оценивали с помощью Mann – Whitney *U*-test.

Среди представленных соединений наиболее выраженную антирадикальную активность проявил полимер-конъюгат III. IC_{50} определяли по регрессионной кривой, построенной по значениям антирадикальной активности в диапазоне концентраций $1,3 \cdot 10^{-5}$ – $6,4 \cdot 10^{-5}$ г/мл. Рассчитанный по этим данным IC_{50} составил $5,36 \cdot 10^{-5}$ г/мл. Полимер-конъюгат I показал антирадикальную активность в диапазоне концентраций $3,75 \cdot 10^{-5}$ – $18,75 \cdot 10^{-5}$ г/мл, при этом IC_{50} составил $10,6 \cdot 10^{-5}$ г/мл. У полимер-конъюгата II процент ингибирования в диапазоне концентраций от $5 \cdot 10^{-5}$ до $25 \cdot 10^{-5}$ составил 2,9–5,9 %.

Таким образом, в условиях модельной системы с радикал-катионом ABTS $^{*+}$ наибольшую антирадикальную активность проявил полимер-конъюгат III.

У контрольных животных инкубирование крови в течение 60 мин при температуре $(43,0 \pm 0,4)^\circ\text{C}$ приводило к повышению вязкости крови относительно исходных значений при скорости сдвига 10 с^{-1} на 11–17 % и при скорости сдвига 300 с^{-1} на 9–15 % (таблица). Инкубирование проб крови с полимер-конъюгатом III в конечной концентрации 10^{-5} г/мл крови достоверно ограничивало повышение вязкости крови при скорости сдвига 10 с^{-1} по сравнению с кон-

тролем (таблица). На скорости сдвига 300 с^{-1} статистически значимых различий по сравнению с контролем не выявлено. В конечной концентрации 10^{-6} г/мл полимер-конъюгат III не проявил гемореологической активности на модели гипервязкости крови *in vitro*. Изменения вязкости крови при добавлении полимер-конъюгатов I и II в конечных концентрациях как 10^{-6} г/мл крови, так и 10^{-5} г/мл крови не были статистически достоверны.

Выраженный антирадикальный и гемореологический эффект в сочетании с водорастворимостью полимер-конъюгата III обосновывает его дальнейшее углубленное исследование с целью разработки и создания на его основе лекарственных средств для терапии неотложных состояний, сопровождающихся нарушением реологических свойств крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. I. A. Tikhomirova, A. O. Oslyakova, S. G. Mikhailova, *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **49**(1 – 4), 295 – 395 (2011).
2. M. Leschke, *Detsch. Med. Wochenschr.*, **133**(8), 270 – 273 (2008).
3. И. А. Шперлинг, Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий и др., *Патология эритроцита при экзогенной интоксикации*, Изд-во Том. ун-та, Томск (2006).
4. J. Tatarishvili, N. Momtselidze, G. McHedlishvili, *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, **30**(3 – 4), 407 – 410 (2004).
5. М. Б. Плотников, В. И. Смольякова, И. С. Иванов и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **6**, 660 – 662 (2010).
6. М. Б. Плотников, Г. А. Чернышева, В. И. Смольякова и др., *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, **5**, 23 – 25 (2010).
7. Т. М. Плотникова, Г. А. Чернышева, В. И. Смольякова и др., *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **2**, 173 – 176 (2014).
8. П. С. Власов, О. Ю. Сергеева, Н. С. Домнина и др., *Химия природ. соедин.*, **4**, 481 – 484 (2012).
9. М. А. Торлопов, И. Ю. Чукичева, А. В. Кучин, *Химия природ. соедин.*, **47**(6), 761 – 763 (2011).
10. И. Р. Ильясов, В. Л. Белобородов, Н. А. Тюкавкина и др., *Фарм. химия и фармакогноз.*, **6**, 15 – 18 (2008).
11. А. Н. Миронов, *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, часть 1, Министерство здравоохранения и социального развития РФ, ФГБУ “Научный центр экспертизы средств медицинского применения”, Москва (2012).
12. М. Б. Плотников, А. А. Колтунов, О. И. Алиев, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **59**(6), 57 – 58 (1996).

Поступила 10.09.14

STUDY BIOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS SYNTHESIZED ON THE BASE OF 2,6-DIISOBORNYL-4-METHYLPHENOL AND POLYSACCHARIDES

M. B. Plotnikov¹, O. I. Alev¹, A. V. Sidekhmenova¹, E. V. Popova¹, O. I. Ostrikova¹, A. V. Kuchin², I. Yu. Chukicheva², and M. A. Torlopov²

¹ “E. D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk NRMС”, Tomsk, 634028 Russia

² Institute of Chemistry, Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Komi Republic, 167982 Russia

Hemorheological and antiradical activities of derivatives synthesized on the basis of 2,6-diisobornyl-4-methylphenol (dibornol) and polysaccharides (inulin, carboxymethyl cellulose, hydroxyethylated starch) were experimentally studied *in vitro*. Among the compounds tested, the highest antiradical activity in the system with water-soluble stable ABTS+ radical was observed for dibornol – hydroxyethylated starch polymer-conjugate. On a model of blood hyperviscosity *in vitro*, this polymer-conjugate reliably reduced blood viscosity at a concentration of 10^{-5} g/mL.

Keywords: dibornol; inulin; carboxymethyl cellulose; hydroxyethylated starch; hemorheological activity; antiradical activity.