

УДК 547.426.2.057

СИНТЕЗ, ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КАТИОННЫХ ГЛИЦЕРОЛИПИДОВ АЛКИЛЬНОГО ТИПА

С.Г. Романова, аспирант, Г.А. Серебренникова, профессор,

*А.А. Штиль, профессор

кафедра Химии и технологии биологически активных соединений

им. Н.А. Преображенского МИТХТ им. М.В. Ломоносова

* Государственное учреждение Российский онкологический научный центр

им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

e-mail: romfill@mail.ru**С**

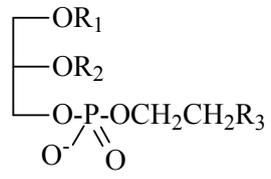
интезированы новые катионные глицеролипиды с простой эфирной связью – бесфосфорные аналоги эдельфозина. Изучены их цитотоксические свойства и гемолитическая активность.

Ключевые слова: глицеролипиды с простой эфирной связью, катионные глицеролипиды, биологическая активность.

Среди фосфорсодержащих глицеролипидов с простой эфирной связью, долгие годы удерживающих первенство по созданию лекарственных препаратов на их основе, наиболее известным является 1-*O*-октадецил-2-*O*-метил-*rac*-глицеро-3-фосфохолин (Edelfosine, ET-18-OMe) [1]. Изучение биологической активности эдельфозина показало, что соединение обладает противоопухолевыми свойствами *in vivo*. В основе механизма действия препарата лежит его селективность по отношению к неопластическим клеткам [2]. Такую специфику, или избирательность воздействия, учёные объясняют недостатком *O*-алкил-расщепляющего фермента в опухолевых клетках, что способствует накоплению

препарата прежде всего в них. При достижении определённой критической концентрации клетка погибает за счёт снижения её резистентности под цитотоксическим действием эдельфозина. Однако, сама структура механизма гибели клеток пока не установлена, известно только, что алкильные липиды способны накапливаться в определённых компартментах живых клеток. Они способны влиять на транспортную систему клетки, активацию образования цитокинов, индукцию апоптоза, а также взаимодействовать со многими клеточными ферментами, большинство из которых включено в процесс липидного метаболизма и/или сигнальный клеточный механизм [3].

Таблица 1. Противоопухолевая активность синтетических аналогов эдельфозина [4].

	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ , S180 ммоль/мл	IC ₅₀ , MM46 ммоль/мл
	C ₁₈ H ₃₇	CH ₃	N ⁺ (CH ₃) ₃	4.0	4.7
	C ₁₉ H ₃₉	CH ₃	N ⁺ (CH ₃) ₃	8.1	11.0
	C ₂₂ H ₄₅	CH ₃	N ⁺ (CH ₃) ₃	24.6	38.2
	C ₁₈ H ₃₇	CH ₃	N(CH ₃) ₂	>50.0	>50.0
	C ₁₈ H ₃₇	CH ₃	NHCH ₃	48.3	46.5

С целью выявления закономерности строения вещества – проявляемые свойства проводился синтез структурных аналогов эдельфозина. Все полученные соединения отличались от ET-18-OMe длиной цепи алкильного остатка в положении С(1) глицеринового скелета и *N*-замещёнными аминоэтилфосфорильными остатками в положении С(3). Исследования проводили *in vitro* и *in vivo* на опухолевых клетках мышей

S180 и MM46 (табл. 1) [4].

В настоящее время активно продолжают работу, связанные с химическим синтезом и биологическими исследованиями новых агентов для химиотерапии опухолей. Прежде всего, это связано с желанием отойти от классических цитостатических и цитотоксических лекарственных средств, используемых в клинической практике, из-за недостаточной селективности последних.

Коммерческий препарат эдельфозин в качестве базовой основы представляет собой удобную модель для разработки химических модификаций, ведущих к усовершенствованию структуры и свойств соединения. Известно, что в клетках лейкоза человека он запускает сложный каскад реакций, приводящий к апоптозу, механизм действия которого пока до конца не изучен.

В последнее время все больше внимания привлекают бесфосфорные аналоги эдельфозина, что обусловлено разнообразием типов биологической активности, проявляемой этими липидами на фоне более доступных способов их получения. Среди этих соединений были обнаружены антагонисты фактора активации тромбоцитов, а также липиды с анти-ВИЧ-1 и противоопухолевым действием [5, 6]. Катионные глицеролипиды разнообразны по структуре, по типу радикалов, находящихся в положении С(1) и С(2), но общим для них является наличие положительно заряженной «головки», внутри-

молекулярно нескомпенсированной отрицательно заряженной группы и одного или нескольких длинноцепных заместителей в гидрофобной части молекулы.

Данная статья посвящена синтезу и изучению биологических свойств новых аналогов эдельфозина, принадлежащих к классу бесфосфорных катионных алкильных глицеролипидов. Ранее в нашей лаборатории были получены структурные гомологи липидов с простой эфирной связью, содержащие в качестве катионной «головки» пиридиниевое основание, присоединенное к глицериновому скелету через спейсерные группы различной длины [7]. В данной работе были синтезированы алифатические алкильные катионные глицеролипиды, также отличающиеся длиной спейсерного фрагмента, но содержащие остатки *N,N*-диметилэтанолamina (DMAE) и *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамина (TMEDA) в полярном домене (схема 1, табл.2).

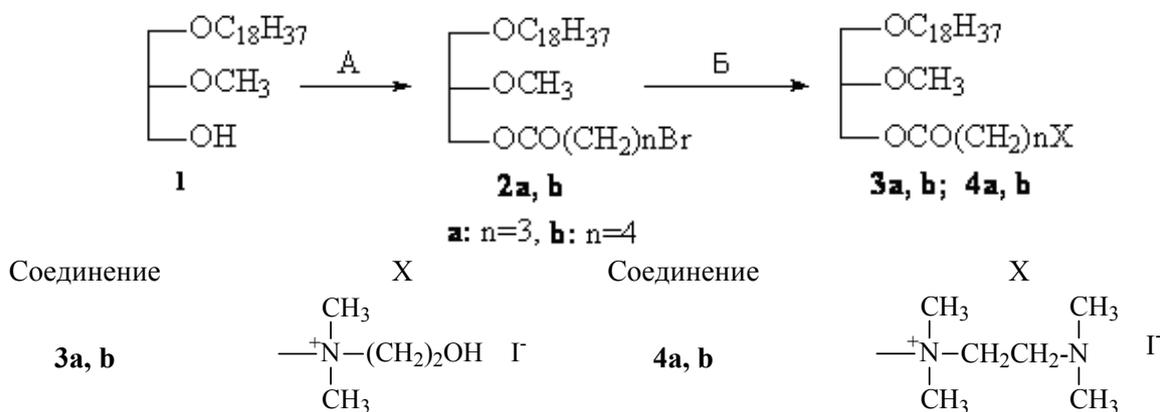


Схема 1. Синтез катионных глицеролипидов со спейсерами различной длины и разными катионными «головками»

Таблица 2. Реагенты и условия проведения реакций.

Стадия	Соединение	Реагенты	T, °C	Время, ч	Выход, %
А	2a/2b	Br(CH ₂) _n COCl, Py/CHCl ₃	20	0.5	91.2 / 90.6
Б	3a/3b	DMAE, NaI/ ДМСО	55	4.5	64.2 / 62.9
Б	4a/4b	TMEDA, NaI/ ДМСО	50	5.0	80.1 / 78.2

Данные ¹H-ЯМР-спектроскопии и элементного анализа (см. Эксперимент. часть) подтвердили структуру полученных глицеролипидов.

Для изучения структурно-функциональной зависимости синтезированных соединений были определены их цитотоксические

свойства. Исследование биологической активности проводили при помощи МТТ-теста¹ на линии клеток K562 (лейкоз человека). Данные по цитотоксичности соединений представлены в виде дозозависимых кривых на рис. 1, а также в табл. 3.

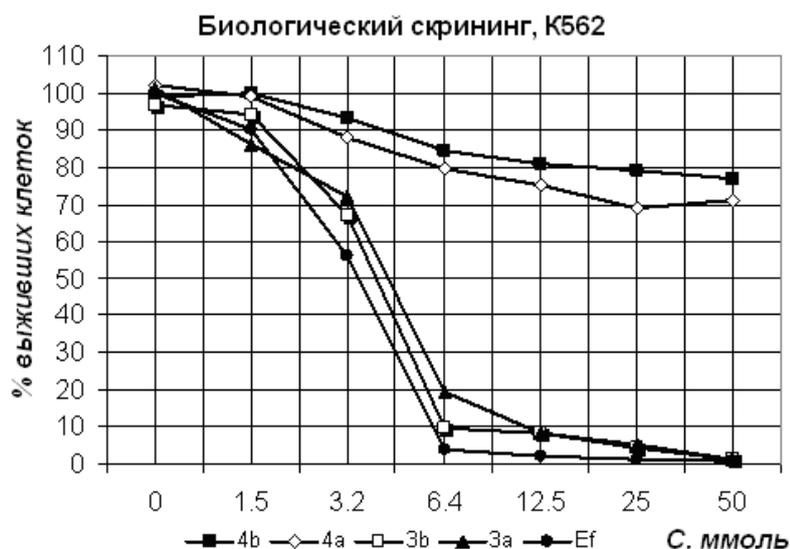


Рис. 1. Цитотоксичность алкильных глицеролипидов, контроль – эдельфозин. Время инкубации клеток с липидами – 72 ч.

Таблица 3. Значение IC_{50} синтезированных соединений.

липид	R при C(2)	спейсер	полярный домен	IC_{50} , мМоль
Коммерческий препарат эдельфозин				3.2 ± 1.0
3a	OCH ₃	OCO(CH ₂) ₃	⁺ N(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₂ OH	3.9 ± 1.2
3b	OCH ₃	OCO(CH ₂) ₄	⁺ N(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₂ OH	3.6 ± 1.0
4a	OCH ₃	OCO(CH ₂) ₃	⁺ N(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	>50.0
4b	OCH ₃	OCO(CH ₂) ₄	⁺ N(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	>50.0

¹Водорастворимый витальный краситель – 3-(4,5-диметил-тиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) – под действием митохондриальной дегидрогеназы живых клеток превращается в темно-синий формазан, растворимый только в органических растворителях. Фотометрическое измерение оптической плотности окрашенного раствора формазана позволяет определить количество живых клеток после инкубации с препаратом. Этот тест учитывает позднюю (конечную) стадию клеточной гибели, к которой сводится многообразие отдельных механизмов смерти [8].

Исходя из полученных данных (рис. 1, табл. 3) можно заключить, что наиболее токсичными для клеток лейкоза оказались липиды **3a** и **3b** (IC_{50} 3.9 ± 1.2 ; 3.6 ± 1.0 мкМ). Соединения **4a** и **4b** оказались не активными. На основе представленных экспериментальных данных было показано, что строение

катионной «головки» оказывает существенное влияние на биологическую активность изучаемых соединений.

Для расширения представлений о свойствах синтезированных соединений была проведена оценка их гемолитической активности (рис. 2).

Диаграмма гемолитической активности соединений

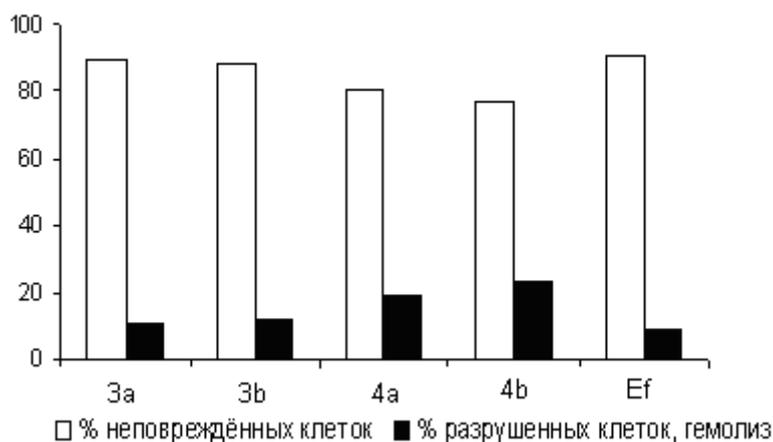


Рис. 2. Гемолитическая активность катионных глицеролипидов.

Обладая высоким цитотоксическим эффектом наряду с эдельфозином полученные соединения характеризуются низкой гемолитической активностью. В среднем доля повреждённых клеток крови при обработке катионными липидами для глицеролипидов **3a** и **3b** сопоставима с показателем для контрольного соединения и не превышает 10% барьера, что соответствует допустимым нормам при оценке гемолитической активности соединений [9]. Это позволяет считать рассматриваемые липиды перспективными для дальнейшего изучения соединениями с целью применения в медицинской практике.

Экспериментальная часть

Приборное оборудование и реактивы

В работе использовали перегнанные растворители и реагенты отечественного (Химмед, Акрус) и зарубежного (Merck, Германия) производства. Хроматографическое выделение и очистка веществ проводились на силикагеле Kieselgel 60 (40–63 мкм, Merck).

Идентификацию веществ осуществляли при помощи тонкослойной хроматографии на пластинках Kieselgel 60 (Merck, Германия) в системе хлороформ–метанол, 4:1. Вещества обнаруживали при помощи раствора фосфорномолибденовой кислоты с последующим прокаливанием.

¹H-ЯМР спектры регистрировали на импульсном Фурье-спектрометре «Bruker MSL-200» (200 МГц) в дейтерохлороформе (CDCl₃); внутренний стандарт – тетраметил-силан.

Измерения оптической плотности растворов проб при исследовании образцов на гемолитическую активность проводили на фотоколориметре КФК-3.

Клеточную линию K562 (клетки лейкоза человека) культивировали в условиях, описанных ранее [7].

Методики и протоколы

Химический синтез

Получение хлорангидридов 5-бромвалериановой и 4-броммасляной кислоты и синтез бромпроизводных **2a** и **2b** описаны в работе [7].

rac-N-{5-[(2-Метокси-3-октадецилокси)-проп-1-ил]-оксипентаноил}-N,N-диметил-N-(β-гидроксиэтил)аммониййодид (3b). К раствору 0.379 г (0.7274 ммоль) *rac*-1-О-октадецил-2-О-метил-3-О-(5-пентаноил)глицерина (**2b**) в 1.6 мл ДМСО добавили 0.33 г (2.18 ммоль) NaI и 0.09 мл (0.078 г; 0.873 ммоль) *N,N*-диметилэтанолamina. Реакционную массу выдерживали при 55 °С в течение 4.5 ч при периодическом перемешивании. Затем к охлаждённой реакционной массе добавили 20

мл хлороформа, промывали 1% раствором соляной кислоты (2x25 мл) до pH <7, водой (5x30 мл). Водный слой экстрагировали 15 мл хлороформа. Органическую фазу сушили Na₂SO₄, упаривали. Остаток хроматографировали на силикагеле, элюент хлороформ–метанол, 6 : 1. Выход **3b**: 0.30 г (62.9%). *R_f* 0.56. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.): 0.83 (3H, т, *J* = 6.8 Гц, (CH₂)₁₅CH₃); 1.24 (30H, уш.с, (CH₂)₁₅CH₃); 1.49–1.56 (2H, м, OCH₂CH₂); 1.78–1.84 (4H, м, (CH₂)₂CH₂N⁺); 2.44 (2H, т, *J* = 6.9 Гц, OCOCH₂); 3.38 (6H, с, N⁺(CH₂)₃); 3.43–3.47 (4H, м, CH₂OCH₂CH₂); 3.58–3.69 (3H, м, N⁺CH₂CH₂OH; CH₂OCH₃); 3.75–3.81 (2H, м, (CH₂)₃CH₂N⁺); 4.09 (1H, дд, *J* = 5.9 Гц, *J* = 11.8 Гц, CHH_aOCO); 4.13–4.22 (2H, м, N⁺CH₂CH₂OH); 4.26 (1H, дд, *J* = 4.2 Гц, *J* = 11.8 Гц, CHH_bO-CO). Найдено, %: С 53.5; Н 8.76; N 2.26; C₃₁H₆₄O₅NI. Вычислено, %: С 53.71; Н 8.73; N 2.21.

rac-N-{4-[(2-Метокси-3-октадецилокси)-проп-1-ил]-оксибутаноил}-N,N-диметил-N-(β-гидроксиэтил)аммониййодид (3a).

Соединение **3a** получали как описано для соединения **3b**, исходя из раствора 0.365 г (0.7198 ммоль) *rac*-1-О-октадецил-2-О-метил-3-О-(4-бромбутаноил)глицерина (**2a**) в 1.5 мл ДМСО и 0.32 г (2.16 ммоль) NaI, 0.09 мл (0.077 г; 0.8647 ммоль) *N,N*-диметилэтанолamina. Выход **3a**: 0.382 г (64.2%). *R_f* 0.58. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.): 0.85 (3H, т, *J* = 6.8 Гц, (CH₂)₁₅CH₃); 1.26 (30H, уш.с, (CH₂)₁₅CH₃); 1.51–1.55 (2H, м, OCH₂CH₂); 1.81 (2H, м, CH₂CH₂N⁺); 2.41 (2H, т, *J* = 6.9 Гц, OCOCH₂); 3.36 (6H, с, N⁺(CH₂)₃); 3.43–3.47 (4H, м, CH₂OCH₂CH₂); 3.56–3.62 (3H, м, N⁺CH₂CH₂OH; CH₂OCH₃); 3.78–3.82 (2H, м, CH₂CH₂N⁺); 4.11 (1H, дд, *J* = 5.9 Гц, *J* = 11.8 Гц, CHH_aOCO); 4.12–4.23 (2H, м, N⁺CH₂OH); 4.26 (1H, дд, *J* = 4.2 Гц, *J* = 11.8 Гц, CHH_bO-CO). Найдено, %: С 55.91; Н 9.75; N 2.17; C₃₀H₆₂O₅NI. Вычислено, %: С 55.97; Н 9.70; N 2.24.

rac-N-{5-[(2-Метокси-3-октадецилокси)-проп-1-ил]-оксипентаноил}-N,N-диметил-N-[2-(N,N-диметиламино)этил]аммониййодид (4b).

Соединение **4b** получали как описано для соединения **3b**, исходя из раствора 0.230 г (0.4410 ммоль) *rac*-1-О-октадецил-2-О-метил-3-О-(5-бромпентаноил)глицерина (**2b**) в 0.6 мл ДМСО и 0.20 г (1.324 ммоль) NaI; 0.08 мл (0.06 г; 0.529 ммоль) *N,N,N',N'*-тетраметилэтилендиамина. Выход **4b**: 0.142 г (78.2%). *R_f* 0.56. Спектр ¹H-ЯМР (δ, м.д.): 0.89 (3H, т, *J* = 6.8 Гц, (CH₂)₁₅CH₃); 1.22 (30H, уш.с, (CH₂)₁₅CH₃); 1.52–1.56 (2H, м, OCH₂CH₂); 2.24 (4H, м, (CH₂)₂CH₂N⁺); 2.29 (6H, с, N(CH₃)₂); 2.36–2.38 (2H, м, OCOCH₂);

2.73 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$); 3.21 (6H, с, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$); 3.32 (3H, с, CH_2OCH_3); 3.91 (1H, дд, $J = 5.9$ Гц, $J = 11.8$ Гц, CH_2OCH_2); 4.15–4.25 (6H, м, CH_2OCH_2 , $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$); 4.28 (1H, дд, $J = 4.2$ Гц, $J = 11.8$ Гц, CH_2OCH_2). Найдено, %: С 59.34; Н 10.32; N 2.11; $\text{C}_{33}\text{H}_{69}\text{O}_4\text{N}_2\text{I}$. Вычислено, %: С 59.37; Н 10.34; N 2.10.

rac-N-{4-[(2-Метокси-3-октадецилокси)-проп-1-ил]-оксибутаноил}-N,N-диметил-N-[2-(N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин)этил]аммоний-иодид (4a). Соединение **4a** получали как описано для соединения **3b**, исходя из раствора 0.186 г (0.357 ммоль) *rac*-1-О-октадецил-2-О-метил-3-О-(4-бромбутаноил)-глицерина (**2a**) в 0.4 мл ДМСО и 0.16 г (1.0707 ммоль) NaI; 0.10 мл (0.0490 г; 0.4282 ммоль) *N,N,N,N*-тетраметилэтилендиамина. Выход **4a**: 0.104 г (80.1%). R_f 0.59. Спектр ^1H -ЯМР (δ , м.д.): 0.87 (3H, т, $J = 6.8$ Гц, $(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$); 1.25 (30H, уш.с, $(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$); 1.52–1.56 (2H, м, OCH_2CH_2); 2.26 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$); 2.31 (6H, с, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$); 2.35–2.39 (2H, м, OCH_2CH_2); 2.71 (2H, м, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+$); 3.23 (6H, с, $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$); 3.34 (3H, с, CH_2OCH_3); 3.93 (1H, дд, $J = 5.9$ Гц, $J = 11.8$ Гц, CH_2OCH_2); 4.12–4.23 (6H, м, CH_2OCH_2 , $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2$); 4.26 (1H, дд, $J = 4.2$ Гц, $J = 11.8$ Гц, CH_2OCH_2). Найдено, %: С 58.82; Н 10.24; N 2.17; $\text{C}_{33}\text{H}_{67}\text{O}_4\text{N}_2\text{I}$. Вычислено, %: С 58.90; Н 10.28; N 2.15.

Биологические испытания

Цитотоксичность соединений оценивали с помощью МТТ-теста [7, 8].

При исследовании на гемолитическую активность контрольные и опытные пробы инкубировали в течение 5 мин при 37 °С. Каждая опытная проба содержала 5 мл 0.154 М раствора хлорида натрия (рН 7.2), 20 мкл исследуемого вещества, растворенного в ДМСО, и 20 мкл цельной крови. Контрольная проба не содержала исследуемого вещества. После окончания инкубации пробы центрифугировали в режиме 600 g 10 мин и измеряли оптическую плотность надосадочной жидкости при λ 540 нм (общий максимум для гемоглобина) и толщине поглощающего слоя 1 см (D1). Затем пробы подвергали полному гемолизу с помощью добавления тритона X-100 (20% водный раствор) в количестве 0.1 мл для каждой пробы и тщательного перемешивания. Проводили измерение оптической плотности надосадочной жидкости проб при той же длине волны (D2). Степень гемолиза выражали в % погибших клеток к общему количеству (% гемолизированных клеток = $(D1/D2) \cdot 100\%$).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (№ 07-03-00632-а).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Gajate, C. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospects of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells / C. Gajate, F. Mollinedo // *Curr. Drug Metab.* – 2002. – Vol.3. – P. 491–525.
2. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH₃ (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L) / F. Mollinedo, J.L. Fernandez-Luna, C. Gajate, B. Martin-Martin, A. Benito, R. Martinez-Dalmau, M. Modolell // *Cancer Res.* – 1997. – Vol. 57. – P. 1320–1328.
3. Mollinedo, F. Early and selective induction of apoptosis in human leukemic cells by the alkyllysophospholipid ET-18-OCH₃ / F. Mollinedo, R. Martinez-Dalmau, M. Modolell // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – Vol. 192. – P. 603–609.
4. Civoli, F. Differentiation of HL-60 cells distinguishes between cytostatic and cytotoxic effects of the alkylphospholipid ET-18-OCH₃ / F. Civoli, S. B. Pauig, L. W. Daniel // *Cancer Chemother. Pharmacol.* – 1996. – Vol. 38. – P. 269–273.
5. Berdel, W. E. Synthetic alkyl-phospholipid analogs: a new class of antitumor agents / in *Phospholipids and Cellular Regulation* / W. E. Berdel, R. Anderesen, P. G. Murder. – Plenum Publishing Corporation, 1989. – P. 42–73.
6. Novel membrane-interactive ether lipid analogs that inhibit infectious HIV-1 production and induce defective virus formation / L. S. Kucera, N. Iyer, E. Leake, A. Raben, E. J. Modest, L. W. Daniel, C. Piantadosi // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 1990. – Vol. 6, № 4. – P. 491–496.
7. Синтез бесфосфорных пиридинсодержащих глицеролипидов с простой эфирной связью / С. Г. Романова, В. Г. Романов, Н. В. Плявник, Г. А. Серебренникова, А. А. Штиль // *Вестник МИТХТ.* – 2008. – Вып. 3, № 4. – С.53–57.
8. Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation / T. Mossman // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – Vol. 89. – P. 271–277.
9. Ермохин, В. А. Синтез и гемолитическая активность N-адамантоилзамещённых гетероциклических аминов и анилинов / В. А. Ермохин, П. П. Пурыгин, Н. А. Кленова // *Вестник СамГУ.* – 2004. – Вып. 4, № 34. – С. 138–144.