

РАЗВИТИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В ОБЛАСТИ СИНТЕЗА ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛУШАНОВЫХ ТРИТЕРПЕНОИДОВ



В.В. Гришко,
кандидат химических наук,
заведующая лабораторией
биологически активных
соединений,
Институт технической
химии УрО РАН



Ю.Б. Вихарев,
кандидат биологических наук,
научный сотрудник,
Институт технической
химии УрО РАН

В статье рассмотрены вопросы современного состояния исследований в области химических превращений пентациклического тритерпеноида растительного происхождения бетулина в фармакологически значимые производные. При этом основное внимание уделено противоопухолевой активности тритерпеновых производных и механизмам реализации их цитотоксического действия. Отражено состояние синтетических работ по трансформации бетулина и перспективы развития исследований *in vitro* цитотоксической активности продуктов органического синтеза на базе Института технической химии УрО РАН.

Природные соединения на протяжении тысячелетий используются человеком в лечебных целях и играют важную роль при разработке современных лекарственных средств. Более 60 % фармацевтических препаратов, разрешенных в течение последних десятилетий для клинического использования в США, созданы с применением знаний о природных соединениях: из 868 новых субстанций лекарств – 130 природных веществ, 210 – их полусинтетические производные, 227 – получены полным синтезом с использованием информации о природных фармакофорах [Стоник, 2004]. Наиболее значительные результаты химии природных соединений наблюдаются в области создания современных противоопухолевых препаратов [Fulda, 2008].

Следует отметить, что традиционно

применяемые в терапии рака лекарственные средства, воздействуя на быстроделющиеся опухолевые клетки, проявляют побочное цитотоксическое действие в отношении нормальных быстропролиферирующих клеток. С точки зрения современных представлений о молекулярных механизмах канцерогенеза, один из наиболее важных этапов в развитии нормальной дифференцирующейся клетки – процесс ее запрограммированной гибели (или апоптоз) [Sanmartín et al., 2005]. Так, нормальные клетки человека (за исключением стволовых), как правило, погибают в лабораторных условиях после 30–50 делений. В некоторых условиях нормальные клетки теряют способность к апоптозу и в результате неограниченного деления дают иммортализованные («бессмертные») клетки. На этапе малигнизации

* Статья подготовлена при частичной финансовой поддержке гранта МК-117.2009.3.

ции (злокачественное перерождение) раковые клетки перестают реагировать на контакты со своими соседями, в отличие от нормальных клеток, которые прекращают расти и делиться, заполнив предназначенное для них пространство [Киселев, Боринская, http://www.rfbr.ru/default.asp?doc_id=28924]. В связи с этим способность некоторых природных соединений индуцировать апоптоз раковых клеток приобретает ключевое значение при создании высокоэффективных противоопухолевых препаратов.

Среди соединений растительного происхождения противоопухолевой активностью, обусловленной направленной индукцией апоптоза раковых клеток, отличаются пентациклические тритерпеновые производные лупанового ряда. При этом бетулин (рис. 1, а) – наиболее доступный представитель этой группы соединений, легко и в больших количествах выделяемый из бересты, характеризуется относительно невысокой цитотоксической активностью, в то время как продукт его химического окисления – бетулиновая кислота (рис. 1, б), продуцируемая растениями в небольших количествах, признана наиболее перспективным и высокоспецифичным противоопухолевым агентом в отношении клеток меланом.

В настоящее время антимеланомный препарат на основе бетулиновой кислоты включен в Программу RAID Национального института рака США и проходит стадию клинических испытаний [Pichette et al., 2004]. Отличительная особенность бетулиновой кислоты и многих ее производных – направленное цитотоксическое воздействие в отношении опухолевых (а не нормальных) клеток, индукция апопто-

за которых происходит в основном двумя путями: внешним – с вовлечением рецепторов смерти CD95/CD95L или внутренним – путем активации каспазного каскада с последующим изменением митохондриальной проницаемости [Fulda, 2008; Толстикова и др., 2006].

Многочисленные научные статьи и обзорные публикации свидетельствуют, что работы в области трансформации бетулина и бетулиновой кислоты посвящены превращениям, затрагивающим преимущественно С-3, С-28 или С-30 углеродные атомы [Alakurti et al., 2006; Fulda, 2008; Толстикова и др., 2006, а; 2006, б; Толстиков и др., 2005]. Использование достаточно простых методов модификации углеродного скелета бетулиновой и бетулоновой (рис. 1, б, в) кислот позволило получить полусинтетические производные с высокой противоопухолевой активностью, в ряде случаев с мультимедикаментозным спектром действия (противоопухолевым, противовирусным, в т.ч. ВИЧ-1 ингибирующим, иммуностимулирующим и противовоспалительным), – соответствующие амиды, дипептиды и ацилаты.

Несмотря на снижение или даже потерю специфичной активности производных бетулиновой кислоты в отношении клеток меланомы, некоторые из них активно ингибируют развитие опухолевых клеток других линий. При этом высокий уровень цитотоксической активности отмечен в случае лупановых производных, структура которых включает несколько кислородсодержащих заместителей. Так, С-2 замещенные производные дигидробетулоновой кислоты – диосфенолы (рис. 2) проявили специфическую активность в

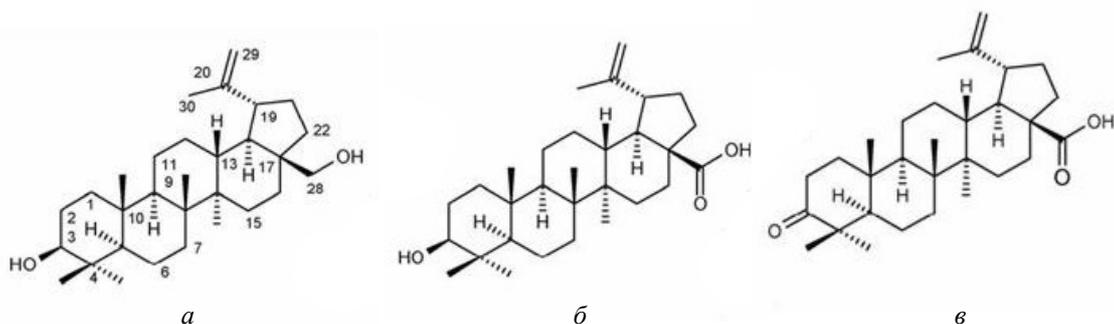


Рис. 1. Бетулин (а), бетулиновая (б) и бетулоновая (в) кислоты

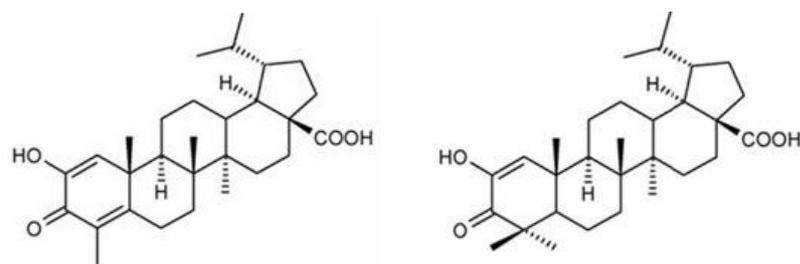


Рис.2. C-2 замещенные производные дигидробетулоновой кислоты – диосфенолы

отношении клеток рака яичников и лейкемии на уровне наномолярных концентраций [Alakurtti et. al., 2006].

В Институте технической химии УрО РАН исследования, касающиеся химической трансформации бетулина, проводятся на базе лаборатории биологически активных соединений. Сотрудниками лаборатории на основе бетулина получен широкий спектр полусинтетических *O*-, *N*- и *S*-содержащих производных, в том числе с противовоспалительной и иммуностропной активностью [Толмачева и др., 2005; 2008, а; 2008, б]. Интерес представляют тритерпеновые 2,3-секо-1-цианопроизводные, синтез которых на основе бетулина, аллобетуллона и бетулоновой кислоты предложен недавно [Толмачева и др., 2008, в].

Благодаря активному сотрудничеству со специалистами Российского онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина (г. Москва), НИИ эпидемиологии и микробиологии Минздрава РБ (г. Минск) и ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ «Пермское НПО «Биомед» (г. Пермь), установлено, что 2,3-секопроизводные перспективны в качестве иммуностропных [Аникина и др., 2010], противовирусных и противоопухолевых агентов. Так, 2,3-секопроизводные бетулоновой кислоты эффективно подавляют репликацию вируса герпеса простого I типа и вируса гриппа А [Толмачева и др., 2009], среди азотсодержащих конъюгатов А-секотритерпеноидов выявлены соединения с высокой ингибирующей активностью в отношении вируса визигулярного стоматита [Галайко и др., 2009] и производные, цитотоксичные в отношении клеток меланомы человека [Толмачева и др., 2010]. О перспективности лупановых 2,3-секопро-

изводных в качестве противоопухолевых и антиВИЧ-1 активных агентов свидетельствуют результаты изучения биологической активности тритерпеновых 2,3-секо-2,3-дикарбоксипроизводных [Chen et. al., 2008; Urban et. al., 2004; Wei et. al., 2009, а; 2009, б].

Следует заметить, что исследования в области создания фармакологически активных соединений – это многостадийный процесс, включающий весьма длительные, трудоемкие и высокзатратные биологические испытания. Так, процесс доклинического исследования противоопухолевых свойств продуктов синтеза состоит из двух стадий. Определение цитотоксичности соединения на культуре опухолевых клеток в искусственной среде вне организма «хозяина» (*in vitro*) позволяет судить о способности исследуемого соединения вызывать гибель опухолевых клеток при непосредственном контакте. Следующая стадия исследования перспективного цитотоксичного соединения – изучение его действия на животных с перевитой опухолью, подавление развития или гибель которой свидетельствуют о способности соединения реализовать противоопухолевое действие в условиях организма «хозяина» (*in vivo*). Параллельно проводят исследования, направленные на выявление механизмов действия цитотоксичного агента.

Каждая стадия фармакологических исследований на пути создания лекарственного препарата – это своеобразный фильтр, отсеивающий наиболее эффективные соединения. Наглядным примером может служить работа отдела экспериментальной химиотерапии НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина, на ба-



Рис. 3. Лабораторный комплекс ИТХ УрО РАН для исследования цитотоксической активности химических соединений *in vitro*

зе которого с помощью культур опухолевых клеток протестировано более 11000 соединений. На основе наиболее активных соединений разработано 20 препаратов, 10 из которых успешно прошли клинические испытания [<http://www.ronc.ru/690>].

В настоящее время ИТХ УрО РАН развивает новое для Института направление – исследование цитотоксической активности химических соединений *in vitro* (рис. 3). Остановимся подробнее на этом методе, который включает общую оценку

токсического действия химического соединения на культуру опухолевых клеток человека. Выполнение данной задачи предполагает решение проблем, в первую очередь, связанных с развитием и поддержанием жизнеспособности собственно культуры клеток, на которой тестируются потенциальные противоопухолевые агенты (рис. 4). Так, создание оптимальных условий, имитирующих целостный организм, предполагает искусственное поддержание температуры 37 °С и атмосферы 5 %-ного углекислого газа, использо-

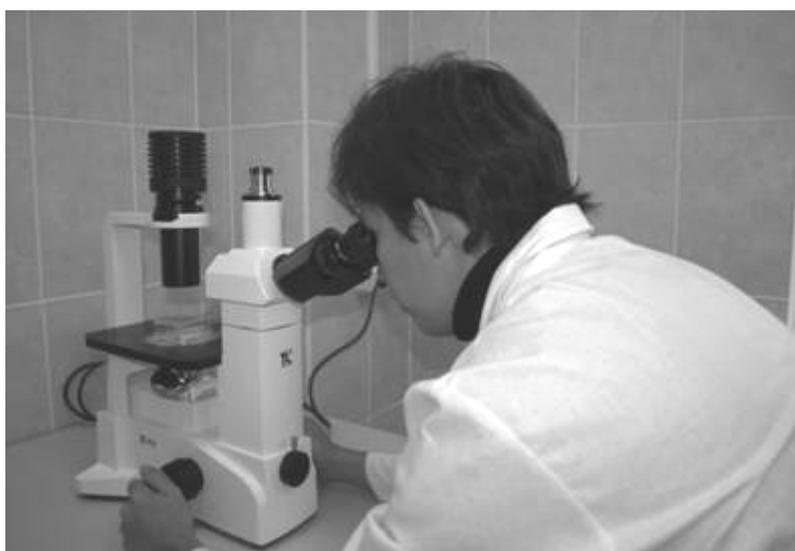


Рис. 4. Научный сотрудник лаборатории биологически активных соединений ИТХ УрО РАН Вихарев Ю.Б. осуществляет микроскопический контроль развития культуры клеток рабдомиосаркомы человека Te32

вание сложных по химическому составу сред культивирования, включающих полный спектр жизненно необходимых аминокислот, витаминов, углеводов, солей и т.д. При этом следует учитывать, что опухолевые клетки человека, используемые в исследованиях, увы, как и человек, не обладают устойчивостью к различным инфекциям. В связи с этим безусловным требованием для проведения испытаний с использованием клеточных линий является соблюдение стерильности. Выполнение описанных условий позволяет получить суспензию жизнеспособных клеток человека для тестирования их устойчивости к исследуемым соединениям с помощью микрометода.

Изучение цитотоксической активности проводят в микропланшетах, что позволяет производить скрининг с использованием микроколичеств исследуемых соединений, в нескольких повторностях. В начале эксперимента клетки засевают в 96-луночные микропланшеты, культуру инкубируют в течение суток и затем в лунки добавляют тестируемое соединение в заданной концентрации. Результаты анализируют, как правило, через 2–3 суток культивирования клеток с исследуемыми соединениями. Число живых клеток оценивают с помощью МТТ-метода, основанного на способности тетразолиевого красителя 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) под действием дегидрогеназ живых клеток восстанавливаться до формазана, окрашивающего раствор в лунках в синий цвет. Оптическое поглощение окрашенных формазаном растворов измеряют на спектрофотометре.

Показатель выживаемости клеток (%) определяется как относительная величина

$$\frac{A_0}{A_k} \times 100, \text{ где } A_0 \text{ и } A_k - \text{оптическое по-}$$

глощение опытных и контрольных (без добавления соединения) образцов. Цитотоксическая активность соединений (IC_{50}) измеряется в мкг (или мМ) и соответствует концентрации вещества, при которой регистрируется гибель 50 % клеток (чем ниже это значение, тем выше активность препарата).

При поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в ИТХ УрО РАН создан лабораторный комплекс (см. рис. 3), предназначенный для изучения цитотоксической активности химических соединений. Приборный парк комплекса (ламинарный бокс, CO_2 -инкубатор, инвертированный микроскоп и планшетный фотометр) решает две основные задачи: поддержание культуры в жизнеспособном состоянии и регистрацию результатов эксперимента. Дальнейшее развитие лабораторного комплекса планируется направить на создание условий, позволяющих выявить один из механизмов действия цитотоксически активных соединений – индукцию апоптоза.

Авторы благодарят руководителя отдела экспериментальной химиотерапии НИИ Экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина профессора, д-ра мед. наук *Галину Константиновну Герасимову* и ведущего научного сотрудника лаборатории биохимической фармакологии канд. мед. наук *Татьяну Александровну Сидорову* за любезно предоставленную возможность стажировки сотрудника ИТХ УрО РАН *Вишарева Ю.Б.* на базе Отдела, за внимание, поддержку и консультации по организации исследований цитотоксичности на базе ИТХ УрО РАН.

Библиографический список

1. Бетулин и его производные. Химия и биологическая активность / Толстиков Г.А. [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. – № 1. – С. 1–14.
2. Киселев Ф.Л., Боринская С.А. Вакцина против рака – первые успехи (http://www.rfbr.ru/default.asp?doc_id=28924).
3. Иммунотропная активность лупановых и олеанановых 2,3-секо-тритерпеноидов / Аникина Л.В. [и др.] // Биоорганическая химия. – 2010. – Т. 36 (в печати).
4. Синтез и биологическая активность серусодержащих производных бетулина / Толмачева И.А. [и др.] // Химия природных соединений. – 2005. – № 6. – С. 578–581.
5. Синтез и иммунотропная активность енаминов олеананового типа / Толмачева И.А. [и др.] // Биоорганическая химия. – 2008. – Т. 34. – № 1. – С. 136–140.

6. Синтез и иммунотропная активность метиловых эфиров 2-алкиламинометилен-3-оксолуп-20(29)-ен-28-овых кислот / *Толмачева И.А.* [и др.] // *Биоорганическая химия.* – 2008. – Т. 34. – № 4. – С. 540–545.
7. Синтез лупановых и 19 β ,28-эпокси-18 α -олеанановых 2,3-секопроизводных на основе бетулина / *Толмачева И.А.* [и др.] // *Химия природных соединений.* – 2008. – № 5. – С. 491–494.
8. Синтез и оценка противовирусной активности 2,3-секогидразоногидразидов олеананового типа / *Галайко Н.В.* [и др.] // Тез. докл. конф. с междунар. участием «Актуальные проблемы химии природных соединений». – Ташкент, 2009. – С. 182.
9. Синтез и противовирусная активность 2,3-секо-производных бетулоновой кислоты / *Толмачева И.А.* [и др.] // *Химия природных соединений.* – 2009. – № 5. – С. 566-568.
10. Синтез тритерпеновых амидов на основе 2,3-секо-1-циано-19 β ,28-эпокси-18 α -олеан-3-овой кислоты / *Толмачева И.А.* [и др.] // *Биоорганическая химия.* – 2010. – Т. 36 (в печати).
11. *Стоник В.А.* Фундаментальные исследования в интересах медицины в Тихоокеанском институте биоорганической химии ДВО РАН и их прикладные результаты // *Вестник ДВО РАН.* – 2004. – № 3. – С. 11–23.
12. Терпеноиды ряда лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы. I. Нативные производные лупана / *Толстикова Т.Г.* [и др.] // *Биоорганическая химия.* – 2006. – Т. 32. – С. 42–55.
13. Терпеноиды ряда лупана – биологическая активность и фармакологические перспективы. II. Полусинтетические производные лупана / *Толстикова Т.Г.* [и др.] // *Биоорганическая химия.* – 2006. – Т. 32. – С. 300–316.
14. Cytotoxic triterpenoids from the leaves of *Microtropis fokienensis* / *Chen I.-H.* [et al.] // *J. Nat. Prod.* – 2008. – Vol. 71. – P. 1352–1357.
15. *Fulda S.* Betulinic acid for cancer treatment and prevention // *Int. J. Mol. Sci.*, 2008. – № 9. – P. 1096–1107.
16. <http://www.ronc.ru/690>.
17. Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin / *Alakurtti S.* [et al.] // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2006. – Vol. 29. – № 1. – P. 1–13.
18. Selective Oxidation of betulin for the preparation of betulinic acid, an antitumoral compound / *Pichette A.* [et al.] // *Synthetic Commun.*, 2004. – Vol. 34. – № 21. – P. 3925–3937.
19. Synthesis and biological evaluation of new symmetrical derivatives as cytotoxic agents and apoptosis inducers / *Sanmartín C.* [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.*, 2005. – Vol. 13. – № 6. – P. 2031–2044.
20. Synthesis of A-seco derivatives of betulinic acid with cytotoxic activity / *Urban M.* [et al.] // *J. Nat. Prod.* – 2004. – Vol. 67. – P. 1100–1105.
21. *Wei Y., Ma Ch.-M., Hattori M.* Synthesis of dammarane-type triterpene derivatives and their ability to inhibit HIV and HCV proteases // *Bioorg. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 17. – P. 3003–3010.
22. *Wei Y., Ma Ch.-M., Hattori M.* Synthesis and evaluation of A-seco type triterpenoids for anti-HIV-1 protease // *Eur. J. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 44. – P. 4112–4120.