

АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 8D05301 – Химия

Темиргазиев Бахтияр Серикович

Растительные полиоксистероиды. Оптимизация выделения, химическая модификация и биологическая активность

Диссертационная работа посвящена оптимизацию методов выделения и комплексному извлечению полиоксистероидов из растительного сырья, теоретическому и экспериментальному исследованию по направленному синтезу новых супрамолекулярных инкапсулированных и гидрофильных производных на их основе с высокой биологической активностью.

В работе были использованы методы ИК-, УФ-, Масс-, ЯМР-спектроскопии, рентгеноструктурного и ВЭЖХ анализа, квантово-химических расчетов реакционной способности и PASS-прогнозирования биологической активности и биоскрининг.

Актуальность темы диссертационного исследования. Стероидные соединения играют исключительно важную роль в жизни растений, животных и человека. В этой связи в последние десятилетия они привлекают внимание исследователей, работающих в области биоорганической химии, фармацевтической химии и химии супрамолекулярных соединений. Уникальные свойства молекул, характеризующихся наличием широкого спектра биологической активности, особенности строения и доступность источников их получения, позволили стать им практически важным исходным возобновляемым материалом для разработки на их основе новых высокоэффективных фитопрепаратов.

Особенно ярко такая полифункциональность проявляется у сравнительно новой группы природных соединений – полиоксистероидов, представляющих собой довольно обширную группу (около 500 соединений).

Однако, развитие современных исследований сдерживается ограниченной доступностью полиоксистероидов, содержание которых в организмах растений и животных невелико, а также затрудняется их водонерастворимостью. Поэтому основной путь для разработки лекарственных препаратов на их основе – это направленный органический синтез или химическая модификация. Кроме того, как показывают исследования, модифицирование молекул стероидных соединений иногда приводит к повышению биологической активности, по сравнению с природными аналогами. Это главная причина обуславливающая необходимость химического и биологического исследования обширных рядов полиоксистероидов.

Исследования последних лет наглядно показывают, что основные тенденции в области синтеза лекарственных препаратов направлены на осуществление химической модификации соединений с целью проявления ими того или иного вида биологической активности. Известно, что сочетание в одной молекуле несколько различных химических структур позволяет достичь значительного синергического эффекта, что, в конечном счете, позволит получить вещества с совершенно новыми практически полезными свойствами.

Одним из перспективных направлений в плане модификации и создания новых водорастворимых субстанций лекарственных препаратов является супрамолекулярное комплексообразование-нанокапсулирование.

В настоящее время использование циклодекстринов (ЦД) для получения комплексов включения биологически активных соединений (БАС) и лекарственных средств (ЛС) является одним из основных путей разработки и создания новых форм фармацевтических препаратов. Среди других широко известных инкапсулирующих рецепторов для БАС, таких как кукурбитурилы, краун-эфиры, каликсарены и др., ЦД отличаются рядом выгодных свойств, обусловленных их дешевизной и особой структурой.

Весьма интересны, с точки зрения сравнения подобных структур, основной отличительной чертой ЦД является их способность к гидрофобному связыванию молекулы «гостя» в своей полости в водной среде с формированием комплексов включения с субстратами, которые менее полярны, чем вода и если их геометрия и структура комплементарна полости циклодекстринового рецептора.

Имеющиеся литературные данные по изучению экдистероидсодержащих растений и полиоксистероидов, способам их выделения, модификации и биологической активности показывают перспективность исследования данных вторичных метаболитов растений. В связи с этим, вопросы изучения полиоксистероидов из доступного растительного сырья Республики Казахстан, модификации их молекул с последующим биоскринингом полученных соединений, а также разработка наукоемких и менее затратных технологии создания новых супрамолекулярных инкапсулированных и гидрофильных форм на их основе остается **актуальной и востребованной.**

Предметом данных исследований являются оптимизация методов выделения, направленная химическая модификация, исследование тонкого строения выделенных и синтезированных соединений и изучение их биологической активности.

Цель и задачи исследования Целью настоящей диссертационной работы является оптимизация выделения полиоксистероидов из растительного сырья, направленный синтез новых супрамолекулярных инкапсулированных и гидрофильных производных на их основе с высокой биологической активностью.

Достижение поставленной цели предполагает решение следующих

задач:

- Проведение исследований по выделению полиоксистероидов из растений, произрастающих и интродуцированных на территории РК;
- Оптимизация извлечения экидистерона – мажорного полиоксистероида из отобранного перспективного вида растительного сырья;
- Прогнозирование биологической активности и изучение реакционной способности выделенных веществ с целью проведения химических модификаций на их основе;
- Направленная модификация выбранных молекул синтонов и установление тонкого строения полученных новых веществ;
- Изучение биологической активности полученных новых супрамолекулярных инкапсулированных и гидрофильных производных.

Научная новизна работы:

Впервые проведена оптимизация извлечения экидистерона – практически важного полиоксистероида из растения *Serratula coronata* L., семейства *Asteracea* Dumort., варьированием методов экстракции сырья и фаз произрастания вида;

- Впервые из растения *Silene brahuica* Voiss семейства *Caryophyllaceae* Juss выделен циклический полиол. Тонкое строение D-пинитола (1S, 2S, 4S, 5R)- 6 – метоксициклогексан -1, 2, 3, 4, 5 – пентола), обладающего гипогликемическими и антидиабетическими свойствами, полностью охарактеризовано с использованием ЯМР ¹H, ¹³C (HSQC, COSY, NOESY) – спектроскопии;

- Впервые в результате комплексного использования современных методов математического моделирования биологической активности по программе PASS online и квантовой химии разработана стратегия целенаправленного модифицирования полиолов и полиоксистероидов;

- Впервые на основе экидистерона (2β, 3β, 5β, 22R) – 2, 3, 14, 20, 25 – гексагидрокси – холест – 7 – ен-6 – он) и α-, β- и γ – ЦД были получены новые водорастворимые соединения и установлены их строения методом ЯМР – спектроскопии. При изучении изменений химических сдвигов протонов субстратов и рецепторов было установлено, что экидистерон взаимодействует с ЦД с образованием надмолекулярных комплексов включения стехиометрического состава 1:1 и 1:2. Установлено, что комплекс включения с β-ЦД проявляет высокую растворимость в воде в более 100 раз, чем исходный полиоксистероид;

- Впервые на основе полиоксистероидов 2-дезоксидезокси-20-гидроксиэкидизона, 2-дезоксидезоксиэкидизона, 3-эпи-2-дезоксидезоксиэкидизона и модифицированного синтона -2, 3, 22 – ацетокси – 14, 20, 25 –гидрокси - 5, 9 (H) – холест – 7 – ен – 6 – она синтезированы новые супрамолекулярные комплексы включения и их тонкие строения полностью подтверждены данными двумерных корреляции спектров ЯМР ¹H - ¹H TOCSY, ¹H - ¹H ROESY, ¹H - ¹³C HMQC и ¹H-¹³C HMBC;

- Впервые на основе 20-гидроксиэкидизона получены комплексы с 2-

гидроксипропил- β -циклодекстрином и динатриевой солью глицирризиновой кислоты и строение синтезированных комплексов установлено методом ЯМР-спектроскопии. Установлено, что супрамолекулярный комплекс экистерона с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином проявляет 3-х кратную улучшенную растворимость в воде, чем исходное соединение.

- Впервые путем супрамолекулярного взаимодействия полиола D – пинитола с ЦД образованы водорастворимые смешанные комплексы состава 1:1. Строение супракомплексов изучено методом спектроскопии ЯМР;

- В результате проведенного биоскрининга выявлено, что супрамолекулярный комплекс 3-эпи-2-дезоксизекдизона с β – ЦД в дозе 25 мг/кг обладает выраженной противовоспалительной активностью на модели острой экссудативной реакции и превышает по активности препарат сравнения «Диклофенак натрия» в 1,6 раз, а комплексы включения 2-дезоксизекдизона с α -, β - и γ - ЦД в данной дозе обладают противовоспалительной активностью, сопоставимой с активностью препарата сравнения.

- Изучение антирадикального свойства путем ингибирования реакции DPPH – радикала в присутствии комплекса экистерона с γ - ЦД показало выраженную антирадикальную активность (АРА) *in vitro*, сравнимую с эффектом бутилгидроксианизола (ВНА). Изучение антиоксидантной активности (АОА) в ряду α -, β - и γ - ЦД комплексов экистерона показало, что антиоксидантное свойство наиболее выражено также для комплекса с γ - ЦД.

Научно-практическая значимость исследования заключается в том, что его результаты могут стать основой для создания новых высокоэффективных фитопрепаратов нового поколения с заданными свойствами.

Впервые разработанные водорастворимые инкапсулированные формы на основе ряда практически доступных циклодекстринов и фитоэкистероидов могут найти применение в фармацевтической промышленности в качестве лекарственных форм с заданными свойствами.

Впервые синтезированный водорастворимый супрамолекулярный комплекс включения 3 - эпи - 2 – дезоксизекдизона с β - ЦД по результатам биоскрининга может рассматриваться в качестве потенциального противовоспалительного средства.

Предложенная схема комплексной переработки сырья серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) с целью получения практически ценных экистероидов и флавоноидов внедрена в ТОО «Карагандинский фармацевтический завод».

Выводы по результатам диссертационного исследования:

1. Проведено комплексное исследование надземной части серпухи венценосной *Serratula coronata* L., культивируемая в коллекционном участке лекарственных растений МНПХ «Фитохимия» (г. Караганда) в

различных фазах произрастания и с применением наиболее оптимальных методов извлечения и на содержание основного действующего компонента экидистерона (20-гидроксиэкидизон). Установлено, что содержание экидистерона от начала вегетации до завершающей фазы идет на спад, что подтверждается данными высокоэффективной жидкостной хроматографии. Приведены данные по количественному содержанию целевого компонента.

2. Приведены результаты комплексного исследования надземной части серпухи венценосной *Serratula coronata* L. – растительной основы первого казахстанского анаболического и адаптогенного средства «Экдифит», культивируемой на участке лекарственных растений МНПХ «Фитохимия». Приводятся данные об оптимальных выходах экидистерона – основной субстанции многих актопротекторных препаратов из различных видов экстрактов и комплексному извлечению флавоноидов и экидистероидов. Показано, что отдельно выделенные флавоноиды и экидистероиды могут быть использованы в качестве новых субстанции и рабочих стандартных образцов.

3. Установлено, что при водно-этанольной, а затем и изобутанольной экстракции надземной части смолевки брагуйской основными компонентами являются фитоэкидистероиды и впервые выделенные с количественным выходом из данного растения циклический полиол – D-пинитол. Тонкое строение D-пинитола (1S,2S,4S,5R)-6-метоксициклогексан-1,2,3,4,5-пентол) полностью охарактеризовано с использованием ЯМР ^1H , ^{13}C (HSQC, COSY, NOESY)-спектроскопии. Показано, что благодаря высокому содержанию D-пинитола (1,0 г от веса воздушно-сухого сырья), обладающего антидиабетическими и гипогликемическими свойствами, растительное сырье смолевки брагуйской перспективно использовать в качестве промышленно – значимого источника получения целевого продукта.

4. Квантово-химическим методом функционала плотности DFT/B3LYP/6-31G рассчитаны геометрические, энергетические и электронные параметры 2-дезоксизэкидистерона. Выполнен сравнительный анализ физико-химических свойств молекул 2-дезоксизэкидизона, 2-дезоксизэкидистерона и экидистерона - синтонов для региоселективных модификаций. Проведен виртуальный биоскрининг указанных фитоэкидистероидов.

5. 20-гидроксиэкидистерон - (2 β , 3 β , 5 β , 22R) -2,3,14,20,22,25-гексагидрокси-5 β -(H)-холест-7-ен-6-он был выделен с количественным выходом этанольной экстракцией из надземной части *Serratula coronata* L. Комплексообразование фитоэкидистероида с β -циклодекстрином изучено методом ЯМР спектроскопии. При изучении изменений химических сдвигов протонов субстратов и рецепторов найдено, что экидистерон взаимодействует с циклодекстринами с образованием надмолекулярных комплексов включения стехиометрического состава 1: 1 или 1: 2. Комплексы экидистерон- β -циклодекстрин проявляют в 100 раз более высокую растворимость в воде, чем исходное соединение.

6. Из надземной части смолевки кустарничковой (*Silene fruticulosa* (Pall.) Schischk, семейства *Caryophyllaceae* Juss.) впервые выделен 2-дезоксидизон (2-дезоксидистерон). Методом ЯМР-спектроскопии изучено комплексообразование фитостероида с γ -циклодекстрином. По изменению химических сдвигов протонов субстрата и рецептора установлено, что 2-дезоксидизон взаимодействует с γ -циклодекстрином с образованием супрамолекулярного комплекса включения стехиометрического состава 1:1 с вхождением фрагмента А молекулы субстрата во внутреннюю полость рецептора.

7. Из смолевки меловой (*Silene cretaceae* Fisch. семейства *Caryophyllaceae* Juss.) впервые выделен 2-дезоксидизон-3 β , 14 α , 22R, 25-тетрагидрокси-5 β (H)-холест-7-ен-6-он. Методом ЯМР-спектроскопии изучено комплексообразование фитостероида с α -, β - и γ -циклодекстринами. По изменению химических сдвигов протонов субстрата и рецепторов установлено, что 2-дезоксидизон взаимодействует с α -, β - и γ -циклодекстринами с образованием супрамолекулярных комплексов включения стехиометрического состава 1:1 с вхождением кольца А стероидного ядра молекулы субстрата во внутреннюю полость рецептора.

8. Из надземной части колючелистника качимовидного (*Acanthophyllum gypsophiloides* Regel) выделен эйдистероид 3-эпи-2-дезоксидизон. Методом спектроскопии ЯМР показано, что супрамолекулярное комплексообразование эйдистероида с α -, β -, γ - и 2-гидроксипропил- β -циклодекстринами сопровождается образованием смешанных комплексов состава 1:1 (β -циклодекстрин), комплексов включения состава 1:2 (γ -циклодекстрин) и внешних комплексов состава 1:2 (2-гидроксипропил- β -циклодекстрин).

9. Впервые путем межмолекулярных взаимодействий молекулы 2,3,22-триацетата эйдистерона с β -циклодекстрином образован водорастворимый смешанный комплекс включения 1:1. Тонкое строение молекулы синтона установлено с применением современных спектральных методов и рентгеноструктурного анализа.

10. Впервые на основе 20-гидроксиэйдизона получены комплексы с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином и динатриевой солью глицирризиновой кислоты и строение синтезированных комплексов установлено методом ЯМР-спектроскопии. Установлено, что супрамолекулярный комплекс эйдистерона с 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином проявляет 3-х кратную улучшенную растворимость в воде, чем исходное соединение.

11. Впервые путем супрамолекулярного взаимодействия практически ценного полиола D-пинитола с циклодекстринами образованы водорастворимые смешанные комплексы состава 1:1. Строение супракомплексов изучено методами спектроскопии ЯМР.

12. Разработана методика определения родственных примесей в СО эйдистерона методом ВЭЖХ и доказано ее валидность. По результатам исследования разработана спецификация качества СО эйдистерона а

качестве уникального стандартного образца отечественного производства, который включен в Государственную Фармакопею Республики Казахстан, необходимый для обеспечения надлежащего контроля качества субстанции для фармацевтического применения и лекарственных препаратов.

13. В результате проведенного биоскрининга выявлено, что супрамолекулярный комплекс 3-эпи-2-дезоксизидона с β -ЦД в дозе 25 мг/кг обладает выраженной противовоспалительной активностью на модели острой экссудативной реакции и превышает по активности препарат сравнения «Диклофенак натрия» в 1.6 раз, а комплексы включения 2-дезоксизидона с α -, β - и γ -циклодекстринами в данной дозе обладают противовоспалительной активностью, сопоставимой с активностью препарата сравнения.

14. Результаты исследований антирадикальных свойств путем ингибирования реакции DPPH – радикала в присутствии комплекса экистерона с γ -циклодекстрином показали выраженную антирадикальную активность *in vitro*, сравнимую с эффектом бутилгидроксианизола (ВНА).

15. В результате проведенного биоскрининга также выявлено, что комплекс включения триацетата экистерона с β -циклодекстрином на модели острого тетрахлорметанового гепатита обладает незначительным гепатопротекторным эффектом, а исходное триацетатпроизводное экистерона не показало значительных изменений в препятствии роста массы печени животных и в восстановлении биохимических показателей сыворотки крови крыс.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- Из растений природной флоры Казахстана *Silene brahuica* Boiss., *Silene fruticulosa* (Pall) Schischk., *Silene cretaceae* Fisch., и интродуцированного на коллекционном участке АО «МНПХ «Фитохимия» *Serratula coronata* L. выделены и идентифицированы полиоксистероиды и полиол: 20-гидроксиэкидизон (экистерон), 2-дезоксизидон, 2-деокси-20-гидроксиэкидизон, 3-эпи-2-дезоксизидон и D-пинитол.

- Оптимальные условия выделения экистерона – мажорного полиоксистероида *Serratula coronata* L., при варьировании температуры 20, 80, 105°C и продолжительности экстрагирования от 3 до 24 часа, в фазе вегетации растения, составляет 2,9 %, что доказывает о высокой эффективности использования растительного сырья, как основного промышленно-значимого источника вышеуказанной субстанции;

- Для исследования реакционной способности выделенных основных полиоксистероидов 20-гидроксиэкидизона, 2-дезоксизидона и 2-деокси-20-гидроксиэкидизона для их дальнейшего использования в качестве технологически доступных синтонов был применен квантово-химические расчеты теории функционала плотности DFT/B3LYP в валентно расщепленном базисе 6-31G в рамках программы GAUSSIAN 09, как наиболее приближенный метод;

- Разработанная стратегия целенаправленного модифицирования молекул с применением современных методов квантовой химии и

математического моделирования биоактивности с проведением взаимодействия 20-гидроксиэкдизона, 2-дезоксидекагидроксиэкдизона, 3-эпи-2-дезоксидекагидроксиэкдизона, 2-дезоксидекагидроксиэкдизона, модифицированного синтона 2,3,22-триацетокси производного экдистерона и D-пинитола с α -, β -, γ -, 2-гидроксипропил- β -циклодекстринами и динатриевой солью глицирризиновой кислоты приводит к синтезу 18 новых супрамолекулярных водорастворимых комплексов в различных стехиометрических соотношениях, тонкие строения которых подтверждены данными двумерных корреляций спектров ЯМР ^1H - ^{13}C TOCSY, ^1H - ^1H ROESY, ^1H - ^{13}C HMQC, ^1H - ^{13}C HMBC;

- Проведение виртуального биоскрининга по программе PASS и экспериментального биоскрининга позволяют выявить, что супрамолекулярный комплекс 3-эпи-2-дезоксидекагидроксиэкдизона с β -циклодекстрином в дозе 25 мг/кг обладает выраженной противовоспалительной активностью и превышает препарат сравнения «Диклофенак натрия» в 1,6 раз, а комплексы 2-дезоксидекагидроксиэкдизона с α -, β -, γ -циклодекстринами в данной дозе обладают данным видом активности, сопоставимой с действием препарата сравнения.

Связь работы с планом государственных научных программ.

Работа выполнялась в рамках грантовых проектов: «Поиск новых природных источников и разработка способа получения субстанции стероидных препаратов» на 2015-2017 гг. (№ гос. регистрации 0115 РК 00185) и «Синтез, строение и биологическая активность новых водорастворимых производных полиоксистероидов» на 2018-2020 гг. (№ гос. регистрации 0118 РК 00011).

Апробация работы. Основные положения, выводы и научные результаты диссертации докладывались и обсуждались на Всероссийских и международных конференциях: IX Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ» (Москва, РФ, 2015), 23rd Conference on Isoprenoids (Minsk, Belarus, 2016), Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные проблемы органической химии» (Новосибирск, РФ, 2017), 12th, 13th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds (Tashkent, Uzbekistan 2017, Shanghai, China 2019), Международной научной конференции «Лекарственные препараты на основе природных соединений» (Ташкент, Республика Узбекистан, 2018).

Основные итоги диссертационного исследования. Основные положения диссертации отражены в 19 опубликованных работах, из них 4 статьи в изданиях из перечня, утвержденных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК; 4 статьи в зарубежных журналах импакт-фактором (Q_3 и Q_4), 1 статья в специализированном журнале ближнего зарубежья, 10 работ в материалах всероссийских и международных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах машинописного текста, включает 31 рисунок, 29 таблиц; состоит

из введения, анализа отечественной и зарубежной литературы по данной теме, 6 раздела собственных экспериментальных и теоретических исследований, экспериментальной части, заключения, списка использованных источников, включающего 287 работ, 4 приложений.