



УКРАЇНА

(19) UA (11) 44634 (13) U
(51) МПК (2009)
C07J 1/00
A61K 31/45
A61K 31/56

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) 16Е-(4'-МЕТОКСИБЕНЗИЛІДЕН)-1,3,5(10)-ТРИЕН-3,17-ДИОЛ, ЩО ВИЯВЛЯЄ АНТИОКСИДАНТНУ АКТИВНІСТЬ ТА ГАЛЬМУЄ РОЗВИТОК ПОСТМЕНОПАУЗАЛЬНОГО МЕТАБОЛІЧНОГО СИНДРОМУ

1

2

(21) u200904147

(22) 27.04.2009

(24) 12.10.2009

(46) 12.10.2009, Бюл.№ 19, 2009 р.

(72) ГОРБЕНКО НАТАЛІЯ ІВАНІВНА, ТАРАН КАТЕРИНА ВІКТОРІВНА, КОНДРАТЮК ЖАННА ОЛЕКСАНДРІВНА, БОРИКОВ ОЛЕКСІЙ ЮРІЙОВИЧ, ОКСЕНЕНКО СВІТЛАНА В'ЯЧЕСЛАВІВНА, ІВАНОВА ОЛЬГА ВОЛОДИМИРІВНА, СТЕПАНОВА АЛЛА ВАСИЛІВНА, ЗВЯГІНА ТЕТЯНА СЕРГІЇВНА,

ВАКУЛА ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ, ЯРЕМЕНКО ФЕДІР ГЕОРГІЙОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ ІМ. В.Я. ДАНИЛЕВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ"

(57) 16Е-(4'-метоксibenзиліден)-1,3,5(10)-триєн-3,17 β -діол, що виявляє антиоксидантну активність та гальмує розвиток постменопаузального метаболічного синдрому.

Корисна модель відноситься до медицини, а саме, до експериментальної фармакології і може бути використана при розробці лікарських засобів для корекції проявів постменопаузального метаболічного синдрому (МС).

На сьогодні в світі налічується близько 470млн. жінок у віці від 50 років, тобто в стані менопаузи, який пов'язаний з підвищенням ризиком серцево-судинних захворювань, нейродегенеративних змін і остеопорозу. Зміни гормонального профілю внаслідок дефіциту естрогенів у жінок в постменопаузальний період призводять до розвитку метаболічного синдрому, зокрема, інсулінорезистентності, абдомінального ожиріння, гіпертригліцеридемії, прозапального стану, порушення гемостазу, ендотеліальної дисфункції, що індукуює атерогенні процеси та ішемічну хворобу серця [1].

На сьогодні для усунення проявів метаболічного синдрому за умов дефіциту естрогенів застосовують гормональну замісну терапію (ГЗТ), до складу якої входить 3,17β -естрадіол, однак, тривале використання вищевказаної терапії збільшує ризик тромбоемболії та раку молочної залози, що свідчить про необхідність зваженої оцінки переваг і можливих негативних наслідків ГЗТ та спонукає до пошуку альтернативних методів профілактики і терапії постменопаузального МС.

Так, одним із перспективних напрямків запобігання або ослаблення серцево-судинної патології

у жінок у період менопаузи може бути використаня сполук з ряду похідних естрадіолу, здатних селективно модулювати дію естрогенних рецепторів та забезпечувати захист від судинних ускладнень без ризику розвитку негативних побічних ефектів, притаманних ГЗТ.

Наявність взаємозв'язку між основною складовою МС - інсулінорезистентністю та оксидативним стресом обґрунтовує доцільність використання сполук з антиоксидантними властивостями для поліпшення чутливості периферичних тканин до дії інсуліну.

В основу корисної моделі поставлено задачу винайти сполуку, яка має виразні антиоксидантні властивості, поліпшує толерантність до вуглеводів, зменшує відносну масу вісцерального жиру та не стимулює проліферативні процеси в матці.

Поставлена задача вирішується синтезом 16Е-(4'-Метоксibenзиліден)-1,3,5(10)-триєн-3,17 β -діолу (умовна назва ПЕ0607), що проявляє антиоксидантну дію й гальмує прояви інсулінорезистентності та інших складових метаболічного синдрому.

Технічний результат - підвищення ефективності профілактики і терапії постменопаузального МС за рахунок застосування нової сполуки з ряду похідних естрадіолу, яка має високу специфічну активність та не викazuje побічної дії.

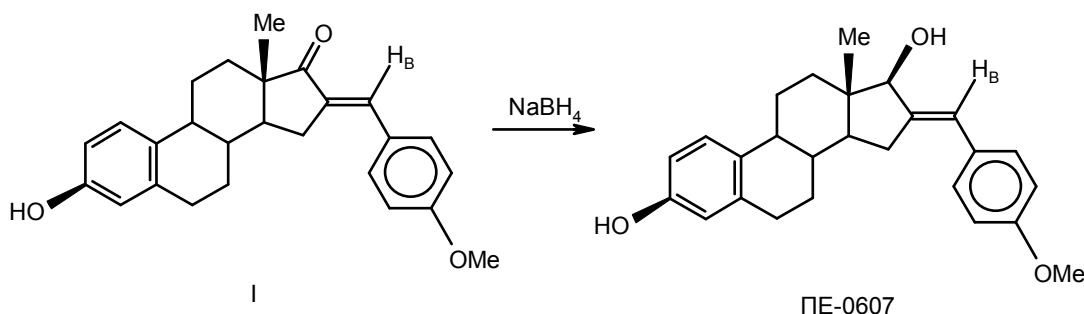
(13) U

(11) 44634

(19) UA

Сполука ПЕ0607 одержується відновленням анізіліденопохідного естрону (похідне 1) відомими методами [2], зокрема, за допомогою натрію борогідриду. В свою чергу похідне 1 одержується при

альдольно-кратоновій конденсації естрону з анісовим альдегідом у лужному середовищі. Спосіб одержання подано на схемі:



Визначення антиоксидантної активності речовини ПЕ0607 *in vitro* проводили на моделі окислення ліпопротеїнів яєчного жовтка [3]. Речовину ПЕ0607 додавали до розчину ліпідів у концентраціях 4, 10, 20, 30 та 40 мкМ та проводили інкубацію при 37°C. Рівень малонового діальдегіду (МДА) визначали методом спектрофотометрії, загальну антиоксидантну активність розраховували в відсотках зниження вмісту МДА порівняно з контрольною пробою. Як препарат порівняння використовували 3,17 β-естрадіол.

Встановлено, що антиоксидантна активність речовини ПЕ0607 підвищувалася дозо-залежно в діапазоні концентрацій від 4 до 40 мкМ. При цьому 50% пригнічення продукції МДА (Cl₅₀) спостерігалося при застосуванні речовини ПЕ0607 у концентрації 4,1 мкМ, тоді як для 3,17 β-естрадіолу цей показник був майже в 4 рази вищим (табл.1). Отримані дані можуть свідчити про наявність у сполуки ПЕ0607 антиоксидантної активності, яка за виразністю ефекту суттєво перевищує дію препарату порівняння 3,17 β-естрадіолу.

Таблиця 1

Коефіцієнт кореляції (r), коефіцієнти регресії (a, b) та розрахункова Cl₅₀ для ПЕ0607 та 3,17 β-естрадіолу (I%=aC±b), (X±S_x, n=4).

Сполука	к	а	В	Cl ₅₀ , мкМ
3,17 β-естрадіол	0,85	0,98±0,13	33,10±3,60	17,2
ПЕ0607	0,96	1,15±0,13	45,79±3,56 ¹⁾	4,1

¹⁾ Статистично значущі відмінності показників від таких для 3,17 β-естрадіолу, p ≤ 0,05.

В результаті оцінки гострої токсичності [4] сполуки ПЕ0607 встановлено, що при пероральному введенні у мишей LD₅₀ перевищує 5000 мг/кг маси тіла, що за класифікацією Сидорова К.К. [5] дозволяє віднести її до практично нешкідливих речовин.

Дослідження впливу речовини ПЕ0607 на розвиток постменопаузального МС проводили у оварієктомованих щурів [6], які утримувалися протягом 16 тижнів на високожировій дієті (ВЖД), де білки, вуглеводи, жири складали 4,9%; 26,4% та 68,8%, відповідно, від загальних калорій. Контрольні тварини знаходилися на стандартній дієті, яка складалась із білків, вуглеводів, жирів (15,0%, 81,1% та 3,9%, відповідно, від загальних калорій) [7].

Через 8 тижнів від початку експерименту розпочинали пероральне введення ПЕ0607 або 3,17 β-естрадіолу в дозі 0,2 мг/кг маси тіла один раз на добу протягом 8 тижнів.

Стан глюкозного гомеостазу оцінювали за показниками базальної глікемії та під час внутрішньочеревного тесту толерантності до глюкози (ВЧТТГ) (3г на кг маси тіла). Площі під глікемічними

кривими (ППК) при проведенні ВЧТТГ розраховували за допомогою комп'ютерної програми "Mathlab". Коефіцієнт чутливості до інсуліну визначали у кінці експерименту за допомогою короткого інсулінового тесту (0,50д/кг маси тіла) [8].

В якості інтегральних показників визначали масу тіла, матки та вісцерального жиру.

Активність аланінамінотрансферази (АлАТ) в сироватці крові виявляли динітрофенілгидразинним методом [9].

Вираженість оксидантного стресу оцінювали за рівнем дієнових кон'югатів (ДК) у гомогенатах серця [10]. Біохімічні показники в органах подано у перерахунку на кількість білка, яку оцінювали методом Лоурі [11].

Інтенсивність нітрозивного стресу в сироватці та сечі оцінювали за рівнем стабільних метаболітів окису нітрогену - нітритів та нітратів (NOx) [12].

Стан системи згортання крові визначали за ступенем та швидкістю АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів [13].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили методами варіаційної статистики. Для

визначення характеру розподілу отриманих результатів дослідження використовували критерій Шапіро-Уїлка. У разі нормального розподілу проводили дисперсійний аналіз ANOVA, для множин-

ного порівняння використовували критерій Н'юмана-Кайлса [14].

Отримані результати представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Дані щодо впливу сполуки ПЕ0607 на показники глюкозного гомеостазу, масу матки, приріст маси тіла, ступінь та швидкість АДФ індукованої агрегації тромбоцитів, рівень ДК у серці й метаболітів окису нітрогену у сечі та сироватці крові експериментальних щурів, ($\bar{X} \pm S_x$, $n=6$).

Показник	Інтактний контроль	ВЖД + оварієктомія + плацебо	ВЖД + оварієктомія + 3,17 β -естрадіол	ВЖД + оварієктомія + ПЕ0607
ППК, ммоль/л · хв	975,4 \pm 41,4	1837,9 \pm 145,6 ¹⁾	1093,3 \pm 65,7 ²⁾	1375,2 \pm 101,5 ²⁾
Коефіцієнт чутливості до інсуліну, %	33,1 \pm 2,9	17,3 \pm 4,8 ¹⁾	31,2 \pm 5,7 ²⁾	32,7 \pm 3,3 ²⁾
Приріст маси тіла, %	12,1 \pm 1,6	41,8 \pm 2,4 ¹⁾	25,3 \pm 4,5 ¹⁾²⁾	27,0 \pm 3,7 ¹⁾²⁾
Маса матки, г	0,52 \pm 0,04	0,11 \pm 0,02 ¹⁾	0,35 \pm 0,03 ¹⁾²⁾	0,22 \pm 0,03 ¹⁾²⁾³⁾
Відносна маса загального вісцерального жиру, %	2,49 \pm 0,44	8,00 \pm 0,60 ¹⁾	5,45 \pm 0,39 ¹⁾²⁾	6,03 \pm 0,76 ¹⁾²⁾
Вміст ДК, нмоль/мг білка	0,26 \pm 0,06	0,54 \pm 0,07 ¹⁾	0,29 \pm 0,09 ²⁾	0,28 \pm 0,02 ²⁾
НО в сечі, нмоль/мл	61,64 \pm 12,58	35,62 \pm 3,80 ¹⁾	67,81 \pm 6,65 ²⁾	65,07 \pm 6,62 ²⁾
НО в сироватці, нмоль/мл	33,56 \pm 4,58	21,23 \pm 3,99 ¹⁾	31,51 \pm 2,12 ²⁾	30,48 \pm 2,29 ²⁾
Ступінь агрегації, %	18,1 \pm 2,7	43,2 \pm 6,1 ¹⁾	25,4 \pm 2,2 ²⁾	19,5 \pm 3,18 ²⁾
Швидкість агрегації, у.о.	101 \pm 10	289 \pm 35 ¹⁾	158 \pm 22 ²⁾	105 \pm 14 ²⁾

¹⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи "інтактний контроль", $p \leq 0,05$;

²⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи "ВЖД + оварієктомія + плацебо", $p \leq 0,05$;

³⁾ Статистично значущі відмінності у порівнянні з даними для групи "ВЖД + оварієктомія + 3,17 β -естрадіол", $p \leq 0,05$.

У результаті проведеного дослідження було встановлено, що терапевтичне пероральне застосування сполуки ПЕ0607 значною мірою ослаблює розвиток інсулінорезистентності та інтолерантності до вуглеводів у оварієктомованих щурів, яких утримували на ВЖД, підтвердження чому було суттєве підвищення коефіцієнта чутливості до інсуліну та зменшення площі під глікемічними кривими в порівнянні з показниками для групи, що отримувала плацебо.

Оцінка приросту маси тіла експериментальних тварин показала, що введення сполуки ПЕ0607 протягом 8 тижнів гальмувало зростання маси тіла оварієктомованих тварин. В той же час встановлено, що речовина ПЕ0607 не призводила до зростання маси матки оварієктомованих щурів, що може свідчити про відсутність у неї стимулюючого ефекту на проліферативні процеси у даному органі. Застосування препарату порівняння 3,17 β -естрадіолу супроводжувалось збільшенням маси матки майже на 50% порівняно з групою, яка отримувала плацебо.

В останні роки епідеміологічні дослідження встановили щільний кореляційний зв'язок між ожирінням за центральним типом та основними компонентами метаболічного синдрому.

Встановлено, що застосування сполуки ПЕ0607 призводить до вірогідного зниження відносної маси вісцерального жиру, що може бути результатом безпосереднього впливу 3,17 β -естрадіолу та його похідного на ядерні фактори PPAR γ та LXR, які відіграють значну роль у регуляції метаболізму ліпідів у жировій тканині [15].

Оскільки відомо, що функціональний стан серця суттєво погіршується за умов метаболічного синдрому, було доцільним визначення показників перекисного окислення ліпідів та антиоксидантного захисту в гомогенатах даного органу. Встановлено, що рівень ДК у гомогенатах серця у тварин, що отримували ПЕ0607, практично не відрізнявся від показників контрольних тварин.

Відомо, що одним із механізмів реалізації вазопротекторного ефекту естрадіолу є його стимулюючий вплив на продукцію NO ендотеліальними клітинами судин.

В результаті проведених досліджень було виявлено, що при використанні сполуки ПЕ0607 відмічали нормалізацію концентрації стабільних метаболітів NO в сироватці та їх екскреції з сечею, що може свідчити на користь її можливого вазопротекторного ефекту.

До біохімічних маркерів печінкової інсулінорезистентності також відносять активність АлАТ, яка є одночасно індикатором гепатотоксичності фармакологічних препаратів. В результаті проведених досліджень було показано, що за умов даної експериментальної моделі активність АлАТ в усіх групах суттєво не відрізнялася від показників в групі інтактного контролю ($p > 0,05$). Проте, відсутність змін в активності даного ферменту при введенні сполуки ПЕ0607 підтверджує відсутність гепатотоксичних властивостей у досліджуваної речовини.

Одним із незалежних факторів ризику серцево-судинних ускладнень за умов інсулінорезистентності є протромбічний стан, який обумовлено порушенням балансу між про- та антикоагулянтами, та високою реактивністю тромбоцитів. В результаті проведених досліджень встановлено, що при введенні сполуки ПЕ0607 спостерігалось зниження як ступеня так і швидкості АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів.

Корисна модель демонструється наступним прикладом:

Приклад

Одержання 16Е-(4'-метоксибензиліден)-1,3,5(10)-триєн-3,17β-діолу відновленням 16Е-(4'-метоксибензиліден)естрону.

А) Розчин естрону 2,0г (7,4ммоль) та свіжоперегнаного анісового альдегіду 1,16г (8,5ммоль) у 30мл спирті до якого додано 0,6г КОН, кип'ятять в продовж 1,5 годин. Після завершення реакції контроль ТШХ на пластинках Силуфол (елюент хлороформ-ацетон, 3:1) при проявленні розчином 2,4-динітрофенілгідразину. Після охолодження осад продукту відфільтровують, промивають спиртом до нейтрального середовища та сушать.

Одержують 16Е-(4'-метоксибензиліден)естрон (1) з т.пл. 266-268°C, вихід 84%. ІЧ спектр у таблетках KBr, ν , cm^{-1} : 3320, 3384 (ОН), 1620, 1604 (C=C, Ar), 1700 (C=O). Дані ЯМР спектру у ДМСО- d_6 (хімічний зсув у м.ч., кількість протонів та їх віднесення): 0,90 (3H, 18-Me); 3,81 (3H, OMe); 7,28 (1H, β -CH); 8,59 (1H, ОН).

Б) До розчину 1,5г (3,8ммоль) похідного естрону 1 у 300мл спирту додають порціями надлишок натрія борогідриду (3,0г, 78ммоль) протягом кількох годин при постійному розмішуванні. Контроль за перебігом реакції здійснюють за допомогою ТШХ на пластинках Силуфол (елюент хлороформ-ацетон, 3:1) при проявленні розчином 2,4-динітрофенілгідразину. Ознакою завершення реакції є зникнення плями вихідного кетону (Rf 0,54). Одержаний продукт у цій системі проявляється плямою бордового кольору з Rf 0,43.

Реакційну суміш виливають у воду, відфільтровують білий осад, який кристалізують зі спирту. Одержують ПЕ0607 з т.пл. 135-137°C, виходи становлять 72-85%.

Для (ПЕ0607) брутто-формула $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_3$, $M_r=390,53$; знайдено, % С: 79,99 розраховано, % С: 79,96. знайдено, % Н: 7,72, розраховано, % Н: 7,74. Мас-спектр ($I > 20\%$): 390 (16%) [M]; 213 (29%); 146 (27%); 133 (21%); 122 (22%); 121 (100%); 91 (34%); 84 (21%); 70 (23%); 69 (21%). ІЧ спектр у таблетках KBr, ν , cm^{-1} : 3468, 3404 (ОН), 1608

(C=C, Ar). Дані ЯМР спектрів (^1H , ^{13}C в ДМСО- d_6) наведено у табл.3.

Відносну орієнтацію замісників при подвійному зв'язку у 16-С визначено методом ядерного ефекту Оверхаузера (NOESY). Наявність крос-піку в спектрі NOESY між сигналами протонів при 3,96м.ч. (17-CH) та 6,354м.ч. (β -CH) свідчить про їх близьке розміщення, а отже про Е-орієнтацію анізильного радикалу.

Таблиця 3

Дані ЯМР спектрів 16Е-(4'-метоксибензиліден)-1,3,5(10)-триєн-3,17β-діолу /хімічний зсув відносно ТМС, в м.ч. (константа спин-спинової взаємодії, в Гц)/, кількість протонів

Молекулярний фрагмент	^1H	^{13}C
1-CH	7,04 д. (8,4) 1H	125,5
2-CH	6,50 д.д. (8,4; 0,9) 1H	112,42
3-C(OH)	8,86 с. 1H	154,61
4-CH	6,45 с. 1H	114,65
5-C	-	136,77
6-CH ₂	2,73 м. 2H	28,9
7-CH ₂	1,3-1,9 м. 11H	25,84
8-CH	1,3-1,9 м. 11H	37,3
9-CH	2,58-2,64 м. 1H	43,4
10-C	-	136,76
11-CH ₂	1,3-1,9 м. 11H	26,85
12-CH ₂	1,3-1,9 м. 11H	29,9
13-CMe	0,596 с. 3H	46,8; 11,4 (Me)
14-CH	1,3-1,9 м. 11H	47,81
15-CH ₂	2,13-2,28 м. 2H	28,7
16-C	-	143,45
17-CH	3,96 д. (5,3) 1H	83,15
17-OH	4,93 д. (5,3) 1H	-
β -CH	6,354 с. 1H	120,99
1'-CH	-	127,44
2',6'-CH	7,30 д. (9,0) 2H	122,70
3',5'-CH	6,90 д. (9,0) 2H	113,51
4'-C	-	158,13
4'-OMe	3,741с. 3H	54,7

Таким чином, проведені дослідження біологічної активності 16Е-(4'-метоксибензиліден)-1,3,5(10)-триєн-3,17β-діолу свідчать, що пероральне терапевтичне застосування вказаної сполуки у тварин із метаболічним синдромом на тлі гіпоестрогенії призводить до зниження інсулінорезистентності та приросту маси тіла, поліпшення толерантності до вуглеводів, зниження відносної маси вісцерального жиру та оксидативного стресу, підвищення ендогенної продукції NO та поліпшення гемореологічних властивостей крові. Перевагою сполуки ПЕ0607 є відсутність виразного впливу на проліферативні процеси у матці, що суттєво може знизити ризик побічних ефектів при використанні даної речовини.

Джерела інформації:

1. Jayachandran, M. Mechanisms of estrogenic vascular protection [Text] / M. Jayachandran, V.M. Miller // Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. - 2006. - Vol. 290. - P.H507-H508.

2. Титце, Л. Препаративная органическая химия [Текст] / Л. Титце, Т. Айхер. - М.: Мир, 1999. - 704с.

3. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеинов [Текст] / И.В. Бабенкова, Ю.О. Теседкин, Г.И. Клебанов [и др.] // Лаб. дело. - 1985. - № 2. - С.59-62.

4. Доклинические исследования лекарственных средств: Метод, рекомендации / Под ред. А.В. Стефанова. - К.: Авиценна, 2002. - С.116-117.

5. Сидоров К.К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения // Токсикология новых промышленных химических веществ / Под ред. А.А. Летавета и В.С. Саноцко-го. - М.: Медицина, 1973. - Вып.13. - 158с.

6. Западнюк, И.П. Лабораторные животные, их разведение, содержание и использование в эксперименте [Текст] / И.П. Западнюк, В.Ю. Западнюк, Е.А. Захария - К.: Гос. мед. изд-во УССР, 1962. - 253с.

7. Mechanism of fat-induced hepatic gluconeogenesis: effect of metformin [Text] / S. Song [et al.] // Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metabol. - 2001. - Vol. 281, №2. - P.E275-282.

8. The short insulin tolerance test for determination of insulin sensitivity: a comparison with the euglycaemic clamp [Text] / A. Akinmokin [et al.] // Diabet. Med. - 1992. - Vol.9, № 4. - P.432-437.

9. Reitmann, S. Calcimetric method for the determination of serum and glutamianie pyruvis transaminases [Text] / S. Reitmann, S.A. Frankel // Amer. J. Clin. Pathol. - 1957. - Vol.28, №1. - P.56-59.

10. Сопоставление различных подходов к определению перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови [Текст] / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г. Яровинский [и др.] // Вопросы мед. химии. - 1989. - №1. - С.127-131.

11. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing protein-dye binding [Text] / M.M. Bradford // Anal. Biochem. - 1976. - Vol.72. - P.248-252.

12. Орлова, Е.А. Анализ нитритов и нитратов в ткани при экспериментальной острой почечной недостаточности [Текст] / Е.А. Орлова. // Укр. журн. експерим. медицини. - 2002. - Т.3, №1. - С.79-82.

13. Пособие по изучению адгезивно-агрегационной активности тромбоцитов [Текст] / А.Л. Берковский, С.А. Васильев, Л.В. Жердева [и др.] - М.: [б.и.], 2002. - 28с.

14. Гланс, С. Медико-биологическая статистика [Текст] / С. Гланс; пер. с англ. Ю.А. Данилова. - М.: Практика, 1998. - 459с.

15. Gene expression profiling identifies liver X receptor alpha as an estrogen-regulated gene in mouse adipose tissue [Text] / L. Lundholm, S. Moverare, K. R. Steffensen [et al.] // J. Molec. Endocrinol. - 2004. - Vol.32. - P.879-892.