



УДК 577.29:547.622.057

ОЦЕНКА ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ 4'-О-МЕТИЛХОНОКИОЛА НА МОДЕЛИ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ

© 2019 г. К. В. Сивак*, К. И. Стосман*, А. А. Мужикян*, А. Г. Александров*,
Н. Б. Викторов**, Д. Д. Ваулина***, Н. А. Гомзина***, #

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. профессора Попова, 15/17

**Санкт-Петербургский государственный технологический институт (Технический университет), Россия, 190013, Санкт-Петербург, Московский пр., 26

***Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт мозга человека им. Н.П. Бехтерева Российской академии наук, Россия, 197376, Санкт-Петербург, ул. академика Павлова, 9

Поступила в редакцию 09.01.2019 г.

После доработки 25.01.2019 г.

Принята к публикации 15.02.2019 г.

Описан синтез двух производных лигнана 4'-О-метилхонокиола (МН): 4'-метокси-5-пропил-1,1'-бифенил-2-ола и 4'-(2-фторэтоксигидрокси)-2-гидрокси-5-пропил-1,1'-бифенила. На модели индуцированного липополисахаридом нейровоспаления у мышей показано, что наибольшей противовоспалительной активностью обладает 4'-(2-фторэтоксигидрокси)-2-гидрокси-5-пропил-1,1'-бифенил: его влияние на степень морфологических изменений в мозге сравнимо с эффектом целекоксиба, известного нестероидного противовоспалительного препарата и селективного ингибитора циклооксигеназы-2.

Ключевые слова: нейровоспаление, липополисахарид, целекоксиб, 4'-О-метилхонокиол

DOI: 10.1134/S0132342319040122

Известно, что нейровоспаление играет ключевую роль в развитии заболеваний, связанных с повреждением и гибелью нейронов (церебральная ишемия, травма, болезни Альцгеймера и Паркинсона, эпилепсия, шизофрения и т.д.) [1, 2]. Нейровоспаление включает ряд процессов, основным из которых является активация микроглии (фагоцитарных глиальных клеток), сопровождаемая возрастающей продукцией цитокинов, экспрессией интегринов, повышенной активностью протеаз и ферментов [3, 4]. Фермент циклооксигеназа 2 (COX2), участвующая в синтезе простагландинов, представляет большой интерес в качестве биомаркера нейровоспаления, поскольку его экспрессия в здоровом мозге низка, а при воспалении резко возрастает [5]. Применение селективных ингибиторов COX2 снижает риск развития заболеваний, связанных с воспалением, но может повышать агрегацию тромбоцитов и быть причиной закупорки сосудов [6]. Поэтому поиск новых

ингибиторов на основе природных соединений, в частности производных 4'-О-метилхонокиола (МН) (схема 1а), выделенного из растений *Magnolia officinalis*, представляется актуальным [7]. Лигнан МН обладает высокой селективностью к COX2 (IC₅₀ COX1 – 2400, а IC₅₀ COX2 – 62 нМ) [8], для сравнения: соответствующие значения для целекоксиба, селективного ингибитора COX2, равны 17000 и 40 нМ [9]. Показано также, что МН снижает экспрессию синтазы оксида азота (iNOS) и скорость образования β-амилоидных бляшек в мозге мышей с индуцированным нейровоспалением [10]; подавляет активность фактора NF-κB в макрофагах и клетках колоректального рака [11].

Работа посвящена синтезу двух производных лигнана МН, одно из которых получено впервые, и оценке их противовоспалительной активности в сравнении с целекоксибом на модели индуцированного липополисахаридом (ЛПС) нейровоспаления у мышей.

Ключевая стадия синтеза производных (III) и (VI) – реакция кросс-сочетания Судзуки-Мияура арилиодидов (II) или (IV) и арилбороновой кислоты, катализируемая тетраakis(трифенилфосфин)палладием(0), Pd(PPh₃)₄ (схема 1б, 1в). Нейровоспаление моделировали у мышей линии

Сокращения: МН – 4'-О-метилхонокиол; COX – циклооксигеназа-2; ЛПС – липополисахарид; МК мозга – массовый коэффициент мозга; HRMS(ESI) – масс-спектры высокого разрешения в режиме электроспрей-ионизации.

Автор для переписки: (тел.: +7 (921) 747-76-94; эл. почта: gomzina@ihb.spb.ru).

C57BL/6 (ФГУП “ПЛЖ “Рапполово”, Ленинградская обл.) путем внутрибрюшинного однократного введения ЛПС из *E. coli* O111:B4 (Sigma-Aldrich) в дозе 2 мг/кг через час после введения соединений (III), (VI), целекоксиба или плацебо. Через 4 дня животных подвергали декапитации под наркозом ксилазин-золетила (50 мг/кг).

К этому времени у мышей из всех опытных групп наблюдалось нейровоспаление, сопровождаемое снижением массы тела и развитием отека мозга (увеличением МК мозга) (табл. 1). На фоне введения соединений (III), (VI) и целекоксиба отмечалось уменьшение выраженности этих показателей.

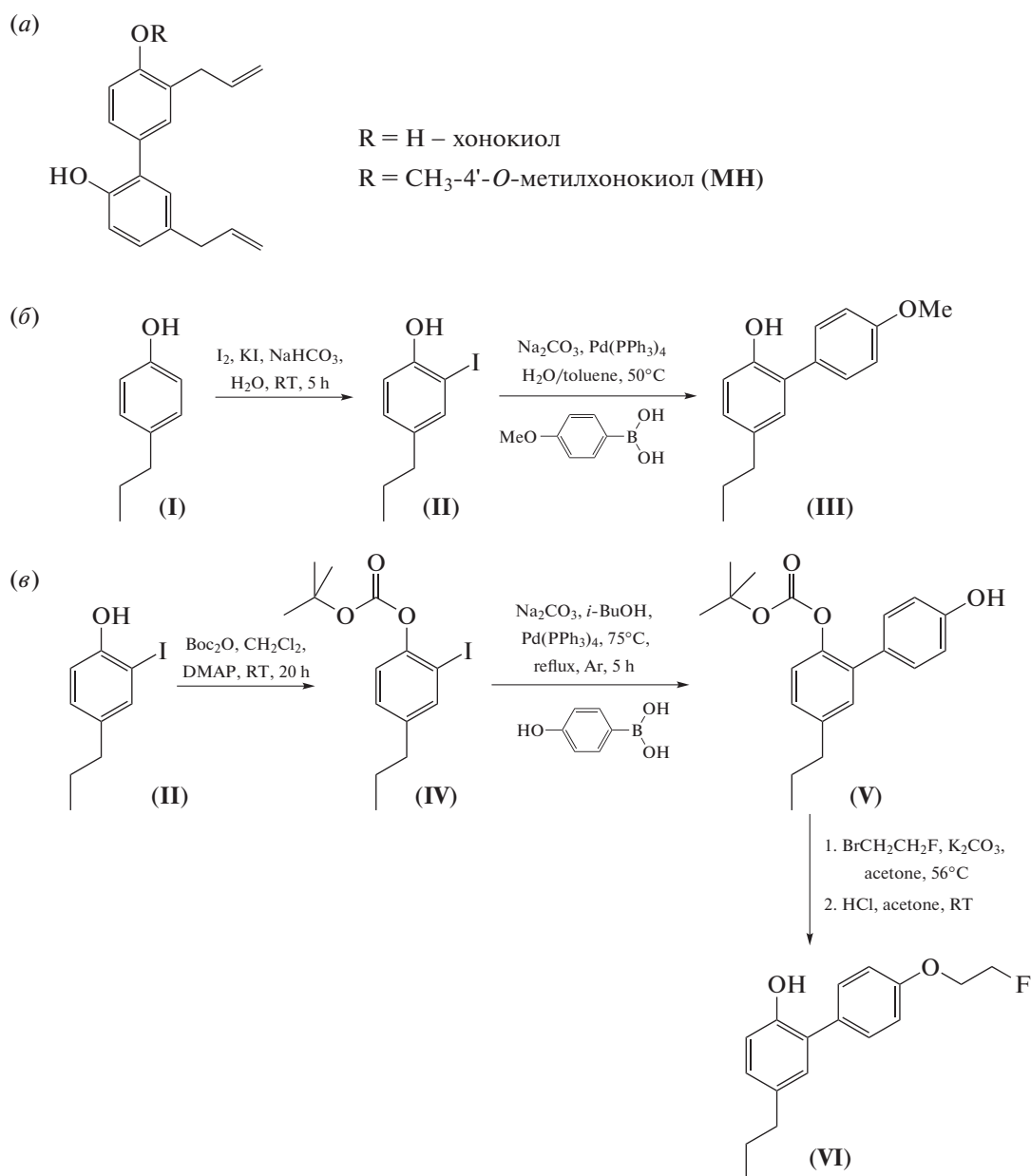


Схема 1. (а) – Структуры хонокиола и 4'-*O*-метилхонокиола (MH); (б) – синтез 4'-метокси-5-пропил-1,1'-бифенил-2-ола (III); (в) – синтез 4'-(2-фторэтокс)-2-гидрокси-5-пропил-1,1'-бифенила (VI).

Гистологическому анализу были подвергнуты гиппокамп и ассоциативная кора как наиболее чувствительные к нейровоспалению отделы мозга (рис. 1). Полуколичественный морфометриче-

ский анализ показал, что линейная плотность нормальных нейронов в контрольной группе была снижена по сравнению с этим показателем у интактных особей, относительное содержание

Таблица 1. Изменение массы тела и массового коэффициента мозга (МК) у мышей с индуцированным нейровоспалением

Показатели ($M \pm SE$) ^a	Экспериментальные группы, в каждой $n = 5$				
	интактная	с ЛПС-индуцированным нейровоспалением			
		плацебо (контроль)	целекоксиб, 20 мг/кг	(III), 5 мг/кг	(VI), 5 мг/кг
Масса тела, г	19.5 ± 0.2	15.7 ± 0.2*	16.5 ± 0.4*	16.6 ± 0.3*	16.8 ± 0.6*
МК мозга ^b × 10 ²	196.7 ± 4.2	259.6 ± 3.6*	226.3 ± 3.7* [^]	235.7 ± 6.0* [^]	234.1 ± 5.7* [^]

^a Данные представлены в виде среднего значения (M) и его ошибки ($\pm SE$). Для статистической обработки данных использовались критерии Крускала–Уоллиса и Манна–Уитни, различия считали значимыми при $p < 0.05$: * $p < 0.05$ по отношению к интактным животным; [^] $p < 0.05$ по отношению к контролю.

^b МК, % – (масса мозга, г/масса тела, г) × 100.

поврежденных (пикноморфных и гиперхромных) нейронов составляло до 40%, наиболее тяжелые повреждения выявлялись в зонах CA1 и DG.

Соединение (III) способствовало уменьшению числа поврежденных нейронов в зоне DG, но не приводило к существенному изменению процесса в других регионах мозга, тогда как соединение (VI) существенно уменьшило выраженность глиальной реакции и количество поврежденных нейронов во всех исследованных областях: их осталось 20% в области CA1 и 5% в области DG и коры. По влиянию на степень морфологических изменений в мозге соединение (VI) статистически не отличалось от препарата сравнения целекоксиб с учетом того, что вводимая доза целекоксиба была в 4 раза больше.

Наличие в структурах (III) и (VI) алкоксигрупп позволяет использовать метку изотопа ¹¹C ($T_{1/2} = 20.4$ мин) или ¹⁸F ($T_{1/2} = 109.8$ мин) для изучения биораспределения радиоактивных аналогов в органах и тканях лабораторных животных на следующем этапе исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ¹H-, ¹³C- и ¹⁹F-ЯМР (δ , м.д.; J , Гц) регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 (400.13, 100.61, 376.54 МГц соответственно) при 25°C в CDCl₃. Масс-спектры высокого разрешения (HRMS) регистрировали на спектрометре Bruker micrOTOF в режиме электроспрей-ионизации (ESI).

2-Иод-4-пропилфенол (II), выход 32%, бесцветное масло; ¹H-ЯМР: 0.95т (3H, CH₃, J 7.2); 1.62м (2H, CH₂CH₃); 2.51 (2H, т, J 7.6, –CH₂Ar); 5.19 (1H, с, OH); 6.93 (1H, д, J 8.4, –CH_{Ar}); 7.07 (1H, дд, J 8.4; 2.0, –CH_{Ar}); 7.49 (1H, д, J 2.0, CH_{Ar}). ¹³C-ЯМР: 13.6, 24.6, 36.6, 85.5, 114.7, 130.2, 136.9, 137.7, 152.7. HRMS(ESI), найдено: m/z 260.9773

$[M - H]^-$. C₉H₁₁IO. Вычислено: $[M - H]^- = 260.9782$. Соединение (II) было получено ранее с выходом 11% [12], без приведения спектральных данных.

4'-Метокси-5-пропил-1,1'-бифенил-2-ол (III). Соединение (II) (0.52 г, 2 ммоль), 4-метоксифенилбороновую кислоту (0.30 г, 2 ммоль) и Na₂CO₃ (1.06 г, 10 ммоль) нагревали до 50°C в смеси воды и толуола, добавляли Pd(PPh₃)₄ (0.116 г, 0.1 ммоль), кипятили под аргоном при перемешивании 9 ч. Смесь разбавляли водой и экстрагировали этилацетатом. Экстракт сушили Na₂SO₄, продукт выделяли на колонке с силикагелем, гептан–этилацетат, 10:1, с выходом 0.30 г (62%). Соединение (III), светло-желтое масло, данные ЯМР-спектров соответствуют данным, приведенным в работе [13]: ¹H-ЯМР: 0.97 (3H, т, J 7.2, CH₃); 1.66 (2H, м, CH₂CH₃); 2.57 (2H, т, J 7.6, CH₂Ar); 3.89 (3H, с, CH₃O); 5.04 (1H, с, OH); 6.91 (1H, д, J 8.0, CH_{Ar}); 7.01–7.10 (4H, м, 4 × CH_{Ar}); 7.42 (2H, м, 2 × CH_{Ar}). ¹³C-ЯМР: 13.8, 24.8, 37.2, 55.4, 114.7, 115.4, 127.4, 128.7, 129.5, 130.1, 130.2, 134.9, 150.4, 159.2. HRMS(ESI), найдено: m/z 241.3088 $[M - H]^-$. C₁₆H₁₈O₂. Вычислено: $[M - H]^- = 241.3100$.

2-Иод-1-((1,1-диметилэтоксикарбонил)окси)-4-пропилбензол (IV), светло-желтая жидкость; ¹H-ЯМР: 0.96 (3H, т, J 7.2, CH₃); 1.60 (9H, с, *t*Bu); 1.64 (2H, м, CH₂CH₃); 2.56 (2H; т, J 7.6, CH₂Ar); 7.08 (1H, д, J 8.4, CH_{Ar}); 7.17 (1H, д, J 8.4, CH_{Ar}); 7.65 (1H, д, J 2.0, CH_{Ar}). ¹³C-ЯМР: 13.6, 24.3, 27.7, 36.8, 83.9, 90.2, 122.2, 129.5, 139.0, 142.4, 149.2, 151.1. HRMS(ESI), найдено: m/z 385.0273 $[M + Na]^+$. C₁₄H₁₉IO₃. Вычислено: $[M + Na]^+ = 385.0271$.

4'-Гидрокси-2-((1,1-диметилэтоксикарбонил)окси)-5-пропил-1,1'-бифенил (V), белые кристаллы, т. пл. 95–97°C (разл.); ¹H-ЯМР: 0.98 (3H, т, J 7.2, CH₃); 1.36 (9H; с, *t*BuOC(O)O); 1.68 (2H, м, CH₂CH₃); 2.63 (2H; м, CH₂Ar); 4.60–5.00 (1H; уш.с,

Срезы мозга		Интактные	Контроль	Целекоксиб	(III)	(IV)
Гиппокамп (×100)						
Поля гиппокампа (×400)	CA1					
	CA3					
	DG					
Ассоциативная кора (×400)						

Рис. 1. Гистологические препараты мозга мышей: гиппокамп (регионы CA1, CA3, зубчатая извилина DG), ассоциативная кора – задняя теменная область коры полушарий. Срезы мозга окрашивали по Нисслю крезидовым фиолетовым, вычисление линейной плотности клеток и относительного содержания поврежденных нейронов проводили в светооптическом микроскопе Leica DM1000.

ОН); 6.89 (2H, д, J 8.8, $2 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$); 7.10 (1H, д, J 8.4, CH_{Ar}); 7.15 (1H, дд, J 8.4; 2.0, CH_{Ar}); 7.19 (1H, д, J 2.0, CH_{Ar}); 7.36 (2H; д, J 8.8, $2 \times \text{CH}_{\text{Ar}}$). ^{13}C -ЯМР: 13.8, 24.5, 27.4 ($(\text{CH}_3)_3$), 37.5, 83.0, 115.1, 122.0, 128.1, 130.3, 130.6, 134.1, 140.8, 146.1, 151.7, 154.9. HRMS(ESI), найдено: m/z 351.1581 [$M + \text{Na}$] $^+$. $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4$. Вычислено: [$M + \text{Na}$] $^+ = 351.1567$.

4'-(2-Фторэтокси)-2-гидрокси-5-пропил-1,1'-бифенил (VI). Соединение (V) (0.33 г, 1.0 ммоль), 1-бром-2-фторэтан (0.30 г, 2 ммоль), K_2CO_3 (0.25 г, 1.8 ммоль) кипятили 24 ч в 8 мл абс. ацетона, градиентным элюированием гептан–дихлорметаном от 10 : 1 до 4 : 1 на колонке с силикагелем выделяли интермедиат. Вос-группу удаляли конц. HCl, продукт выделяли на колонке с сили-

кагелем смесью гептан–дихлорметан (4 : 1) с выходом 0.05 г (16%). Соединение (VI): бесцветное масло; ¹H-ЯМР: 1.01 (3H, т, J 7.2, CH₃); 1.70 (2H, м, CH₂CH₃); 2.60 (2H, м, CH_{2Ar}); 4.30 (2H, д.м, ³J_{H-F} 28, OCH₂); 4.82 (2H, д.м, ²J_{H-F} 47, FCH₂); 5.16 (1H; уш.с, OH); 6.93 (1H, д, J 8.8); 7.06–7.11 (4H, м); 7.46 (2H, д, J 8.8, 2×CH_{Ar}). ¹³C-ЯМР: 13.9, 24.8, 37.3, 67.3 (2H; д, ²J_{C-F} 20, OCH₂); 82.0 (2H, д, ¹J_{C-F} 170, FCH₂); 115.3, 115.6, 127.4, 128.8, 130.2, 130.3, 130.4, 135.0, 150.5, 158.1. ¹⁹F-ЯМР: –223.6. HRMS(ESI), найдено: m/z 297.1273[M + Na]⁺. C₁₇H₁₉FO₂. Вычислено: [M + Na]⁺ = 297.1261.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Инжинирингового центра СПбГТИ (ТУ).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований, номер проекта 17-04-02119.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Perry V., Nicoll J., Holmes C. // Nat. Rev. Neurol. 2010. V. 6. P. 193–201.
2. Prata J., Santos S., Almeida M., Coelho R., Barbosa M.A. // J. Neuroinflammation. 2017. V. 14. P. 179–212.
3. Jacobs A.H., Tavitian B. // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2012. V. 32. P. 1393–1415.
4. Ory D., Celen S., Verbruggen A., Bormans G. // Current Pharmaceutical Design. 2014. V. 20. P. 5897–5913.
5. Laube M., Kniess T., Pietzsch J. // Molecules. 2013. V. 18. P. 6311–6355.
6. Rayar A.M., Lagarde N., Ferroud C., Zagury J.-F., Montes M., Veitia M.S.-I. // Curr. Top. Med. Chem. 2017. V. 17. P. 2935–2956.
7. Yuan Y., Subedi L., Lim D., Jung J.K., Kim S.Y., Seo S.Y. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2019. V. 29. P. 3329–3339.
8. Kim H.S., Ryu H.S., Kim J.S., Kim Y.G., Lee H.K., Jung J.K., Kwak Y.S., Lee K., Seo S.Y., Yun J., Kang J.S., Hong J.T., Kim Y., Han S.-B. // Arch. Pharm. Res. 2015. V. 38. P. 813–825.
9. Penning T.D., Talley J.J., Bertenshaw S.R., Carter J.S., Collins P.W., Docter S., Graneto M.J., Lee L.F., Malecha J.W., Miyashiro J.M., Rogers R.S., Rogier D.J., Yu S.S., Anderson G.D., Burton E.G., Cogburn J.N., Gregory S.A., Koboldt C.M., Perkins W.E., Seibert K., Veenhuizen A.W., Zhang Y.Y., Isakson P.C. // J. Med. Chem. 1997. V. 40. P. 1347–1365.
10. Lee B., Kwak J.-H., Huang S.-W., Jang J.Y., Lim S., Kwak Y.S., Lee K., Kim H.S., Han S.B., Hong J.T., Lee H., Song S., Seo S.Y., Jung J.K. // Bioorg. Med. Chem. 2012. V. 20. P. 2860–2868.
11. Zhang P., Liu X., Zhu Y., Chen S., Zhou D., Wang Y. // Neurosci. Lett. 2013. V. 534. P. 123–127.
12. Suter C.M., Schuetz R.D. // J. Org. Chem. 1951. V. 16. P. 1117–1120.
13. Fuchs A., Baur R., Schoeder C., Sigel E., Mueller C.E. // Bioorg. Med. Chem. 2014. V. 22. P. 6908–6917.

Antiinflammatory Evaluation of 4'-O-Methylhonokiol Derivatives in a Neuroinflammation Model

K. V. Sivak*, K. I. Stosman*, A. A. Muzhikyan*, A. G. Alexandrov*, N. B. Viktorov**,
D. D. Vaulina***, and N. A. Gomzina***, #

#Phone: +7 (921) 747-76-94; e-mail: gomzina@ihb.spb.ru

*Ministry of Health of the Russian Federation Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint-Petersburg, 197376 Russia

**Saint-Petersburg State Technological Institute (Technical University), Saint-Petersburg, 190013 Russia

***Bechtereva Institute of Human Brain, Russian Academy of Science, Saint-Petersburg, 197376 Russia

The synthesis of two derivatives of lignan 4'-O-methylhonokiol (MH), namely, 4'-methoxy-5-propyl-1,1'-biphenyl-2-ol (III) and 4'-(2-fluoroethoxy)-2-hydroxy-5-propyl-1,1'-biphenyl (VI) was described. On the lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation mouse model, derivative (VI) demonstrated the highest anti-inflammatory activity: its effect on the morphological changes in the brain was comparable to that of celecoxib, a well-known non-steroid anti-inflammatory drug and a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 (COX 2).

Keywords: neuroinflammation, lipopolysaccharide, celecoxib, 4'-O-methylhonokiol