



УДК 577.152.361.042:547.92

ВЛИЯНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛЯРНЫХ ГРУПП  
В МОЛЕКУЛЕ СТЕРОИДА НА ЕГО ИНГИБИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ  
НА  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азу

*Камерницкий А. В., Решетова И. Г.*

*Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского Академии наук СССР, Москва*

*Мирсалихова Н. М.*

*Институт биохимии Академии наук УзССР, Ташкент*

*Уварова Н. И., Атсипкина Л. Н.*

*Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВНЦ  
Академии наук СССР, Владивосток*

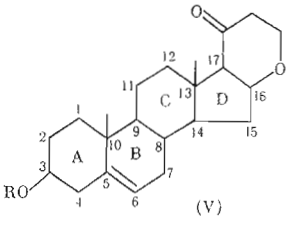
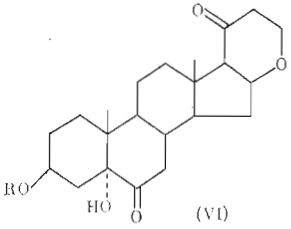
Трансформированные стероиды с окисленными боковыми цепями в области кольца D, отличающиеся полярностью заместителей при  $\text{C}_{(3)}$  кольца A — ацетаты, глюкозиды и свободные спирты — в концентрации  $1 \cdot 10^{-4}$  —  $1 \cdot 10^{-7}$  М оказывают ингибирующее действие на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азу, степень которого понижается с увеличением полярности области А\* молекулы стероидов. Для соединений, не содержащих полярных групп в области D, прослеживается рост ингибирующей активности при переходе от 3-ацетата к 3-глюкозиду. Полученные данные подтверждают наличие зависимости степени ингибирования  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы аналогами субстрата от бифильности их молекул.

Характерная особенность агликонов сердечно-активных стероидных гликозидов, ингибирующих  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азу мембран, — наличие кислородсодержащих заместителей в D-области молекулы, а именно 17 $\beta$ -бутенOLIDного цикла, и гликозидной цепи при  $\text{C}_{(3)}$  [1]. Считается, что гликозидная часть стероида резко повышает ингибирующую активность агликкона по отношению к АТФ-азе и делает ингибирование необратимым [2]. Наши исследования влияния модифицированных стероидов, имеющих кислородсодержащие заместители в D- и A-областях молекулы, на активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы [3, 4] позволили заключить, что ингибирующий АТФ-азу эффект стероидного агликкона связан с различием полярного характера этих двух частей молекулы, т. е. ее бифильностью. В самом деле, если увеличение кислородсодержащих заместителей в D-области повышало способность стероидов ингибировать АТФ-азу, то одновременное введение таких заместителей в положения 5 и 6 редуцировало этот эффект. Это вызвало необходимость проверить влияние на указанный способность стероидных агликонов характера заместителей в положении 3. Для такой проверки были выбраны соединения (I) — (V) (см. табл. 1, 2) в форме соответствующих 3-ацетатов, свободных спиртов и глюкозидов.

Если высказанные нами ранее соображения о зависимости ингибирующей способности стероидов в отношении АТФ-азы от их полярной несимметричности (бифильности) [3] справедливы, то для соединений типа (V), неполярных в D-области, следовало ожидать повышения ингибирующей активности при переходе от 3-ацетата (V, R=Ac) к 3-оксисоединению (V, R=H) и далее к 3-глюкозиду (V, R=Glc). Наоборот, повышение полярности A-области у соединений (I) — (IV), несущих большое число полярных групп в D-области, должно было бы снизить их ингибирующую способность.

\* Под D-областью мы понимаем кольцо D и заместители в положении 17, под A-областью — кольцо A и заместители в положении 3.

Зависимость степени ингибирования  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы производными 21,24-динорхол-5-ен-16 $\beta$ ,23-оксидо-20-она от характера замещения в них при  $\text{C}_{(3)}$ 

Структура	R	Ингибирующий эффект (%) при концентрациях, M			
		$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
 (V)	Ac		4,3		
	H	27,5	20,5	12,4	
	Glc	92,4	75,8	11,0	5,5
 (VI)	Ac	28,4	27,5	18,4	

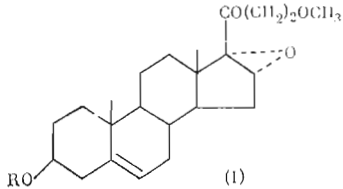
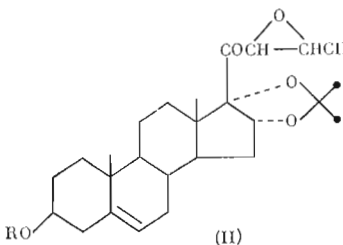
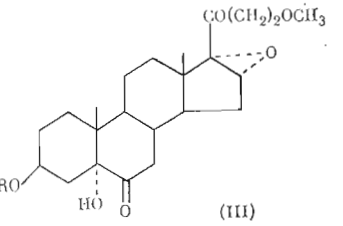
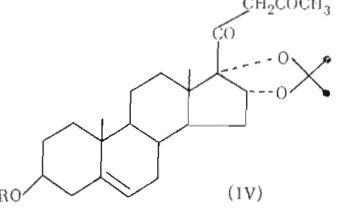
Действительно (см. табл. 1), для соединений (V) переход от ацетата к спирту сопровождается повышением ингибирующей активности стероида в концентрации  $10 \text{ мкМ}$  почти в 5 раз, а активность соответствующего 3-глюкозида (V,  $\text{R}=\text{Glc}$ ) повышается уже в  $\sim 20$  раз. Заметное, шестикратное, увеличение ингибирующей активности наблюдалось в случае 3-ацетата стероида, содержащего полярную  $5\alpha$ -окси-6-кетогруппировку (VI). В то же время у соединений (I)–(IV), полярных в области D-кольца, имет место обратный эффект (табл. 2). В самом деле, тогда как рост числа кислородсодержащих заместителей в D-области стероидов (I  $\rightarrow$  IV,  $\text{R}=\text{Ac}$ ) сопряжен с повышением их ингибирующей активности, переход от менее полярного замещения к более полярному в положении 3 вызывает противоположное изменение. При этом в соединениях (I), (IV) степень ингибирования уменьшается в последовательности  $3\text{-OAc} > 3\text{-OH} > < 3\text{-OGlc}$ , а в соединениях (II), (III) — в последовательности  $3\text{-OAc} > > 3\text{-OGlc} > 3\text{-OH}$ .

Влияние бифильности молекулы кардиотонических гликозидов на их активность прослеживается и на природных соединениях.

У карденолидов, имеющих одинаковый углеводный фрагмент при  $\text{C}_{(3)}$ , например 3 $\beta$ -( $\alpha$ -L-рамнозидов), биологическая активность уменьшается с появлением полярных заместителей в D-области молекулы. Так, летальная доза на кошке (мг/кг), составляющая для эвомонозида, рамнозида дигитоксигенина (3 $\beta$ ,14 $\beta$ -диола) 0,278, возрастает для родексина В, рамнозида гитоксигенина (3 $\beta$ ,14 $\beta$ ,16 $\beta$ -триола) до 0,34. Наоборот, биологическое действие усиливается с ростом полярности А-области. Например, летальная доза у периплорамнозида, рамнозида периплогенина (3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,14 $\beta$ -триола) падает до 0,18 [5]. Тот же показатель для конваллотоксина, рамнозида строфантидина (3 $\beta$ ,5 $\beta$ ,14 $\beta$ -триол-19-оля), равный 0,079, возрастает до 0,191 для адонитоксина, рамнозида адонитоксигенина (3 $\beta$ ,14 $\beta$ ,16 $\beta$ -триол-19-оля) при перемещении гидроксильной группы из положения 5 $\beta$  в положение 16 $\beta$  [5].

Полученные результаты наряду с исследованиями ингибирования  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -зависимой АТФ-азы модифицированными стероидными агликонами [3] подтверждают наличие определенной зависимости ингибирующего действия стероидов от бифильности их молекулы.

Зависимость степени ингибирования  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы стероидами от характера замещения в них при  $\text{C}_{(3)}$ 

Структура	R	Ингибирующее действие (%) при концентрациях, М			
		$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$
 (I)	Ac	35,4	18,4	15,7	1,65
	H Glc	13,5	11,0 7,1	2,2	
 (II)	Ac	65,8	20,7	14,7	+15,9
	H	23,9	4,1	+12,9	
	Glc	88,4	15,6	9,6	
 (III)	Ac	46,6	28,4	10,2	11,5
	H Glc	93,1	16,1 22,9	20,3	
 (IV)	Ac	60,0	40,8	30,5	20,4
	H	29,7	24,7	8,9	
	Glc	23,4	15,0	12,2	

## Экспериментальная часть

3-Окси- и 3-ацетаты стероидов (I)–(V) синтезированы по методам, описанным в работах [6–8]. Соответствующие глюкозиды получены гликозидированием 3-оксипроизводных стероидов (I)–(V) в условиях работы [9] взаимодействием с ацетобромглюкозой в нитрометане в присутствии цианида ртути в качестве акцептора НВг при  $20^\circ\text{C}$ . Образующиеся ацетаты  $\beta$ -глюкозидов превращены в свободные глюкозиды обработкой 8%  $\text{K}_2\text{CO}_3$  в метаноле. Структура каждого глюкозида подтверждена наличием в ПМР-спектре сигнала аномерного протона  $\delta 4,58$  м.д. ( $J_{1,2}$  7,4 Гц).

*Ингибирование АТФ-азы стероидами.* Стероиды, предварительно растворенные в диметилсульфоксиде ( $1 \cdot 10^{-2}$  М), добавляли в инкубационную смесь, содержащую 1–10 мкг/мл АТФ-азы, 130 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 30 мМ трис-HCl, pH 7,5, и выдерживали 45 мин при  $20^\circ\text{C}$ .

Реакцию инициировали введением АТР до концентрации 1 мМ, реакционную смесь выдерживали 10 мин при 37° С и затем останавливали добавлением 7% НСЮ. Ингибирующий эффект стероидов (%) рассчитывали, определяя остаточную активность АТР-азы ( $A_{ост}$ ) как отношение потерянной в присутствии ингибитора активности ( $A_0 - A_{ост}$ ) к активности фермента, инкубированного в тех же условиях без стероида ( $A_c$ ).

Активность АТР-азы определяли по количеству неорганического фосфата, реализуемого в ходе реакции [10]; содержание белка — по методу [11].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Schwartz A., Lindenmayer G. E., Allen J. C. *Pharmac. Rev.*, 1975, v. 27, p. 1—134.
2. Мирсалихова Н. М., Умарова Ф. Т., Пальянц Н. Ш., Абубакиров Н. К. *Химия природн. соед.*, 1976, № 2, с. 188—194.
3. Камерницкий А. В., Решетова И. Г., Мирсалиханова Н. М., Умарова Ф. Т. *Биохимия*, 1982, т. 47, вып. 6, с. 957—961.
4. Камерницкий А. В., Решетова И. Г., Мирсалихова Н. М. *Химия природн. соед.*, 1983, № 5, с. 605—608.
5. Макаревич И. Ф., Кемергелидзе Э. П., Кисличенко С. Г., Загула В. В., Резниченко А. А., Колесников Д. Г., Ковалев И. П. В кн.: Карденолиды и буфадиенолиды. Тбилиси: Медгизерба, 1975, с. 78, 94, 122, 132, 147.
6. Ахрем А. А., Камерницкий А. В., Решетова И. Г. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1972, № 6, с. 1364—1368.
7. Камерницкий А. В., Ольгина Н. М., Решетова И. Г., Чернюк К. Ю. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1975, № 2, с. 411—414.
8. Камерницкий А. В., Леви В. Г., Решетова И. Г. *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1981, № 4, с. 887—890.
9. Атопкина Л. Н., Сметанина О. Ф., Кузнецова Т. А., Уварова Н. И. *Химия природн. соед.*, 1982, № 5, с. 656—657.
10. Rapisz H. T., Graczyk G., Wilmanska D., Skarzynski J. *Anal. Biochem.*, 1970, v. 35, № 2, p. 494—504.
11. Hartee E. F. *Anal. Biochem.*, 1972, v. 48, № 2, p. 422—427.

Поступила в редакцию

28.IX.1983

После доработки

26.X.1983

### EFFECT OF ARRANGEMENT OF POLAR GROUPS IN STEROID MOLECULE ON ITS INHIBITORY ACTIVITY TOWARDS Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase

KAMERNITSKY A. V., RESHETOVA I. G., MIRSALIKHOVA N. M.,  
UVAROVA N. I., АТОПКИНА L. N.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow; Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent; Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Science Center, Academy of Sciences of the USSR, Vladivostok*

Transformed steroids having oxidized side chains in the D ring site and varying by polarity of the substituent at the ring A C<sub>(3)</sub>-position — acetates, glucosides or with free hydroxyls — in the concentration range  $1 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-7}$  M were found to inhibit Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. The extent of inhibition decreases with the rise in the polarity of the A region of the steroid molecule. With the compounds devoid of polar groups in the D region an increase in the inhibitory activity is observed on passing from 3-acetate to 3-glucoside. The data obtained confirm the relationship between the extent of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase inhibition and biphilicity of the molecule.