



УДК 547.918:547.914.4.057:001.18

## СИНТЕЗ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ДИНИКОТИНАТА БЕТУЛИНА

© 2002 г. **О. Б. Флехтер<sup>\*,#</sup>, Л. Т. Карачурина<sup>\*</sup>, Л. Р. Нигматуллина<sup>\*</sup>, Т. А. Сапожникова<sup>\*</sup>,  
Л. А. Балтина<sup>\*</sup>, Ф. С. Зарудий<sup>\*</sup>, Ф. З. Галин<sup>\*</sup>, Л. В. Спирихин<sup>\*</sup>,  
Г. А. Толстиков<sup>\*</sup>, О. А. Плясунова<sup>\*\*</sup>, А. Г. Покровский<sup>\*\*</sup>**

<sup>\*</sup> Институт органической химии Уфимского научного центра РАН, 450054, Уфа, просп. Октября, 71;

<sup>\*\*</sup> Институт молекулярной биологии, лаборатория ретровирусов, Кольцово, Новосибирская обл.

Поступила в редакцию 24.09.2001 г. Принята к печати 25.01.2002 г.

На примере 3,28-диникотината бетулина, полученного ацилированием бетулина, проведено уточнение сигналов в спектрах ЯМР лупановых тритерпеноидов. Показано, что 3,28-диникотинат бетулина обладает гепатопротекторной, противовоспалительной, противовоспалительной, регенеративной и анти-ВИЧ-активностью и впервые продемонстрирована иммуномодулирующая активность среди производных лупановых тритерпеноидов.

*Ключевые слова:* лупановые тритерпеноиды; бетулина диникотинат, иммуномодулирующая, гепатопротекторная, противовоспалительная, анти-ВИЧ-активность.

### ВВЕДЕНИЕ

Лупановые тритерпеноиды – бетулин (I) и бетулиновая кислота обладают разнообразной биологической активностью [1–5], антифидантными свойствами [6, 7], могут быть использованы для получения полимерных материалов [8] и т.д. Кроме того, интерес к данным тритерпеноидам обусловлен, несомненно, широкой доступностью бетулина: так, его содержание в коре белоствольных берез достигает 30% [9].

В продолжение наших работ по трансформациям и поиску новых биологически активных соединений среди лупановых тритерпеноидов [10–12] мы осуществили синтез 3,28-ди-*O*-никотината бетулина (II). Ранее было показано, что пентаникотинат глицирризиновой кислоты (препарат ниглизин) обладает широким спектром фармакологической активности (противовоспалительной, противовоспалительной, гепатопротекторной, противовирусной) [13]. Ниглизин ингибирует вирусы иммунодефицита человека и Марбурга [14, 15]. Препарат успешно используется для лечения хронического гастродуоденита у детей [16] и геморрагической лихорадки с почечным синдромом у взрослых [17].

Для получения бетулина (I) мы использовали усовершенствованный способ экстракции кусковой (неизмельченной) коры березы в автоклаве при давлении 17 атм. и температуре 90°C азеотропной смесью изопропанола; выход экстракта достигал 35%.

Диникотинат бетулина (II) получали ацилированием бетулина (I) хлорангидридом никотиновой кислоты в безводной среде пиридин–трибутиламин с выходом 94% (схема). По-видимому, данная среда более благоприятно влияет на выход сложных эфиров, чем предлагаемая другими авторами смесь пиридин–4-диметиламинопиридин [18]. Структура соединения (II) подтверждена данными ИК-, УФ-, ЯМР-спектров и элементного анализа. Так, в спектре <sup>1</sup>H-ЯМР происходит смещение сигналов протонов H3 и H28 в слабое поле в результате введения ароматического заместителя, тогда как сигналы последних наблюдаются в области δ 7.40–9.18 м.д. В спектре <sup>13</sup>C-ЯМР также наблюдается слабополюсный сдвиг углеродов C3 и C28 по сравнению с бетулином, появляются сигналы углеродов сложноэфирных связей (δ 164.8, 165.8 м.д.) и сигналы остатка никотиновой кислоты в области δ 123.2–153.3 м.д.

В процессе расшифровки спектров диникотината бетулина (II) и сравнении с литературными данными [1, 18, 19] мы обнаружили расхождения у разных авторов в отнесении сигналов протонов H18 и H19 базовой структуры лупановых тритерпеноидов, а данных о расположении сигналов протонов H21 не встретили вовсе. В результате использования расчетов по аддитивным схемам и интерпретации спектров <sup>13</sup>C-ЯМР с модуляцией константы СН-взаимодействия и двумерной спектроскопии СН-корреляции (CHCORR) мы провели отнесение сигналов углеродов и протонов соединения (II). Из карты взаимодействия в двумерном спектре (рисунок) хорошо видно, что сигнал протона H19 (δ 2.50 м.д.) проявляется в виде дуб-

<sup>#</sup> Автор для переписки (факс: (3472) 356066; эл. почта: obf@anrb.ru).

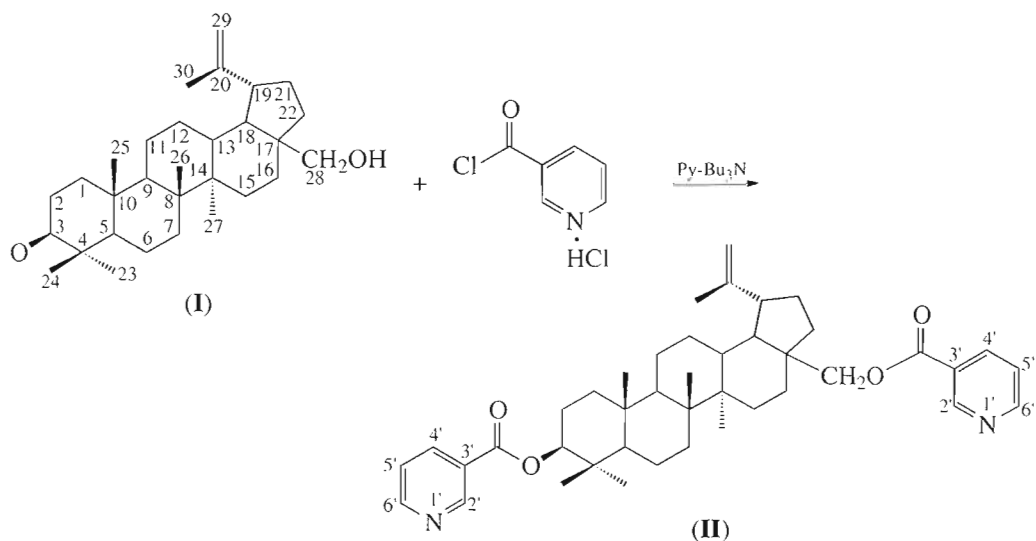
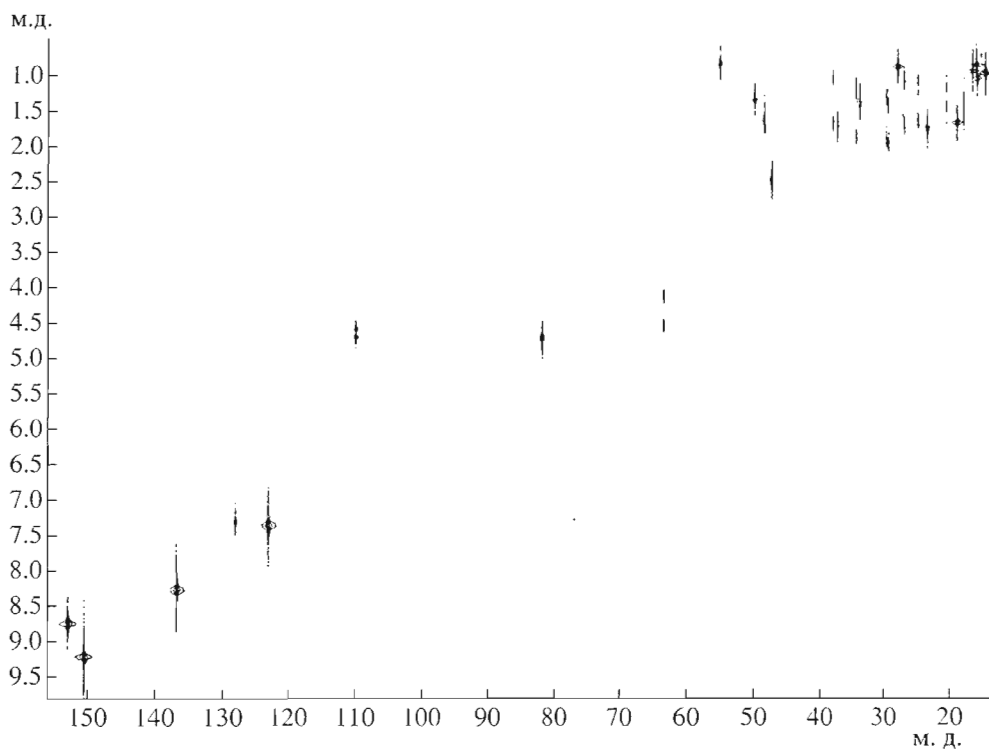


Схема.

лета триплетов (спектр  $^1\text{H}$ -ЯМР:  $J$  5, 11, 11 Гц) в результате взаимодействия с протонами H18, H21<sub>a</sub> и H21<sub>b</sub> и принадлежит атому C19 с химическим сдвигом  $\delta$  47.6 м.д. В то же время сигналу атома C18 ( $\delta$  48.7 м.д.), расположенному в более слабом поле, соответствует сигнал протона при  $\delta$  1.6 м.д. в виде мультиплета, перекрывающегося с сигналами других протонов. В соответствии с картой вза-

имодействия двумерного спектра сигналы двух диастереотропных протонов H21<sub>a</sub> и H21<sub>b</sub> проявляются в виде мультиплета с химическими сдвигами  $\delta$  1.40 и 1.98 м.д.

Острая токсичность соединения (II) составила 6.5 (6.0–7.02) г/кг, а его терапевтическая доза при экспериментальном гепатите – 11.7 (8.2–16.6) мг/кг.

Двумерный спектр ЯМР  $^{13}\text{C}$ -H CORR диникотината бетулина (II).

**Таблица 1.** Влияние диникотината бетулина (**II**) на показатели, характеризующие синдромы поражения гепатоцитов и ПОЛ при тетрахлорметановой интоксикации печени

Показатели	Интактные животные	CCl <sub>4</sub> -гепатит (контроль)	( <b>II</b> ) + CCl <sub>4</sub> -гепатит	Карсил + CCl <sub>4</sub> -гепатит
Аланинаминотрансфераза, мкмоль/л	0.92 ± 0.09	4.7 ± 0.20	2.8 ± 0.33*	2.3 ± 0.51*
Аспартатаминотрансфераза, мкмоль/л	1.94 ± 0.25	6.2 ± 0.10	3.1 ± 0.20*	3.5 ± 0.46*
Щелочная фосфатаза, мкмоль/л	0.81 ± 0.42	2.3 ± 0.65	1.55 ± 0.47	1.1 ± 0.58
Билирубин, мкмоль/л	12.3 ± 1.11	44.2 ± 3.90	26.1 ± 1.2*	25.4 ± 1.4*
Малоновый диальдегид, ммоль/г в печени	0.098 ± 0.03	0.352 ± 0.03	0.197 ± 0.03*	0.184 ± 0.03*
Интенсивность секреции желчи, мг/мин/100 г	3.56 ± 0.225	1.77 ± 0.112	5.22 ± 0.510*	3.20 ± 0.163*

\* Достоверные результаты по сравнению с контролем ( $P < 0.05$ ); количество животных в группах равно 6; доза никотината (**II**) и карсила составила 12 мг/кг.

**Таблица 2.** Влияние диникотината бетулина (**II**) на иммунный ответ (образование антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей и гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана [29, 30])

Соединение	Доза, мг/кг	ГЗТ, %	Число АОК во всей селезенке	Число АОК на 1 млн. спленоцитов	Абс. фагоцит. показатель
( <b>II</b> )	12	30.2 ± 6.82	52645 ± 5480*	448.3 ± 85.7*	2.14 ± 0.27*
Оксиметилурацил	50	31.3 ± 3.72	84405 ± 6816*	453.6 ± 95.8*	3.28 ± 1.36*
Контроль		47.1 ± 7.37	29305 ± 7241	199.8 ± 36.9	1.35 ± 0.24

\* Достоверные результаты по сравнению с контролем ( $P < 0.05$ ); количество животных в группах равно 7.

Известно, что гепатиты сопровождаются повышением активности аланинаминотрансферазы (Ala-аминотрансфераза), аспартатаминотрансферазы (Asp-аминотрансфераза), щелочной фосфатазы, а также усилением перекисного окисления липидов (ПОЛ), снижением интенсивности секреции желчи и т.д. [20]. Результаты наших исследований показали, что диникотинат (**II**) обладает гепатозащитным действием, способствует восстановлению уровня маркерных ферментов сыворотки крови, щелочной фосфатазы и билирубина. Лечение отравленных животных диникотинатом бетулина (**II**) приводило к снижению активности Ala- и Asp-аминотрансфераз в ~1.7 и 2 раза соответственно, щелочной фосфатазы – в ~1.5 раза по сравнению с контрольной группой (CCl<sub>4</sub>-гепатит). Это дает основание считать, что производное (**II**) уменьшает выраженность биохимических синдромов поражения печени. Кроме того, обнаружено наличие антиоксидантных свойств препарата (уменьшается интенсивность процессов ПОЛ в ~1.8 раза), что приводит к снижению образования гепатотоксичных веществ (табл. 1).

Известно, что патология печени может быть причиной или следствием иммунологических нарушений, которые способствуют обострению основного заболевания и его осложнениям [21]. Такая ситуация требует применения иммунокорригирующих средств. Оказалось, что диникотинат бетулина (**II**) обладает ярко выраженным имму-

номодулирующим действием, причем такой вид активности лупановых тритерпеноидов обнаружен впервые. В пересчете на 1 млн. спленоцитов данное соединение увеличивает антителогенез в 2.2 раза по сравнению с контролем ( $P < 0.05$ ). Соединение (**II**) ослабляет гиперчувствительность замедленного типа к эритроцитам барана, что может быть результатом выявленного нами противовоспалительного эффекта соединения [22] (табл. 2).

Гепатопротекторная и иммуномодулирующая активность диникотината бетулина (**II**) сочетается с выраженным противоязвенным действием. На индометациновой модели экспериментальной язвы соединение (**II**) предохраняло слизистую оболочку желудка от изъязвления, подобно известному препарату вентеру. Число разрушений слизистой оболочки желудка было в ~1.7 раза меньше, чем в контроле ( $P < 0.01$ ). Исследуемое соединение повышает защитные функции слизистой оболочки, т.е. проявляет гастропротективные свойства. По-видимому, защитное действие тритерпеноида обусловлено активизирующим влиянием на синтез простагландинов, нарушенный введением индометацина. Лечебное действие данного соединения изучалось на модели экспериментальной язвы, вызванной этанолом. Диникотинат (**II**) по сравнению с контрольной группой и аналогично вентеру ускоряет заживление язвенного дефекта. При введении этанола происходят

**Таблица 3.** Противоязвенное действие диникотината бетулина (II) при профилактическом введении

Соединение	Доза, мг/кг	Среднее число разрушений слизистой оболочки желудка, вызванных			Средняя площадь язв, вызванных, мм <sup>2</sup>	
		индометацином	аспирином	этанолом (60% в 150 мМ НСl)	этанолом (70% р-р)	жидким азотом
(II)	12	15.8 ± 1.10*	10.25 ± 0.85	0.40 ± 0.21*	11.6 ± 1.73*	5.36 ± 0.66*
Вентер	20	17.8 ± 0.86*	–	0.67 ± 0.17*	11.6 ± 0.93*	5.36 ± 0.80
Омез	10	19.5 ± 0.50	7.25 ± 0.64*	–	–	–
Контроль		26.6 ± 2.89	11.2 ± 0.48	8.83 ± 1.87	18.4 ± 1.18	7.99 ± 0.93

\* Достоверные результаты по сравнению с контролем ( $P < 0.05$ ); количество животных в группе равно 6.

**Таблица 4.** Противовоспалительная активность диникотината бетулина (II)

Соединение	Доза, мг/кг	Средний процент отека лапок при воспалении, вызванном	
		формалином	каррагенином
(II)	12	37.4 ± 2.55*	45.0 ± 4.10*
Ортофен	8	38.5 ± 2.28*	38.7 ± 2.75*
Контроль		64.8 ± 3.99	61.3 ± 4.68

\* Достоверные результаты по сравнению с контролем ( $P < 0.05$ ); количество животных в группах равно 7.

разрушение защитного слоя слизистой оболочки, слущивание эпителия и образование крупной пептической язвы. Соединение (II) оказывает эффективное лечебное действие, уменьшает площадь язв в ~1.6 раза по сравнению с контролем ( $P < 0.001$ ).

В следующей серии опытов мы изучали влияние диникотината бетулина (II) на течение хронической пептической язвы, вызванной криогенным способом и показали, что данное соединение в 1.5 раза по сравнению с контролем ( $P < 0.05$ ) и аналогично вентеру уменьшает площадь язв.

Установлено, что на всех изученных моделях соединение (II) оказывает выраженный противоязвенный эффект, уменьшает частоту образования язв и заживляет язвенные поражения слизистой оболочки у крыс (табл. 3).

Диникотинат бетулина (II) при воспалениях, вызванных формалином и каррагенином, в ~1.7 ( $P < 0.02$ ) и в ~1.4 раза ( $P < 0.05$ ) соответственно задерживает, подобно ортофену, развитие воспалительного отека по сравнению с контролем и, таким образом, обладает выраженной противовоспалительной активностью (табл. 4).

Изучено также влияние диникотината (II) на репаративную регенерацию кожи у крыс на модели термического ожога. На 10-е сут лечения в группе животных, аппликации которым проводили 1% мазью препарата, площадь ран уменьшилась на ~42% по сравнению с исходной ( $P < 0.01$  по сравнению с контролем), тогда как у животных, леченных мазью метилурацила, площадь ран уменьшилась на ~20%. Заживление лоскут-

ных ран на 10-е сут в группе животных, леченных 1% мазью препарата (II), было также значительно лучше, чем в группе, леченных мазью метилурацила. В первой группе площадь ран снизилась на 66, во второй – на 55%, у контрольных – на 45%. Полученные данные свидетельствуют, что соединение (II) (1% мазь) действительно способствует заживлению ран (табл. 5).

Анти-ВИЧ-активность диникотината (II) была исследована на традиционной модели высокочувствительной к ВИЧ клеточной линии МТ-4 – перевиваемых лимфоцитов человека, первично инфицированных вирусом иммунодефицита человека 1 типа, – штамм ВИЧ-1/ЭВК. В качестве фармакологического аналога использовали известный ингибитор вирусной обратной транскриптазы – азидотимидин, широко применяемый в практике лечения ВИЧ-инфекции, но имеющий ряд недостатков [23]. Эффективность противовирусного действия соединения (II) была оценена с помощью комплекса методов, позволяющих получить достаточно полную информацию об особенностях его анти-ВИЧ-действия: определение цитотоксичности препарата; определение степени защиты инфицированных ВИЧ клеток от гибели путем определения их жизнеспособности методом исключения трипановым синим; количественное определение накопления вирусного белка р24 иммуноферментным методом.

Установлено, что диникотинат (II) эффективно подавляет накопление вирусспецифического белка р24 ( $ID_{50}$  0.02 мкг/мл), не оказывая при этом защитного действия, и в диапазоне концент-

**Таблица 5.** Влияние диникотината бетулина (II) на репаративную регенерацию кожных ран

Соединение	Средняя площадь кожных ран (мм <sup>2</sup> ) на модели			
	термического ожога		лоскутных ран	
	исходная	через 10 сут	исходная	через 10 сут
(II) (1% мазь)	20.72 ± 0.83	11.97 ± 0.83***#	23.87 ± 2.14	8.0 ± 0.81***#
Метилурацил (5% мазь)	18.99 ± 0.83	15.07 ± 1.15*	24.18 ± 2.10	10.84 ± 0.49*
Контроль (вазелин)	21.20 ± 0.98	18.10 ± 1.15	24.02 ± 1.68	13.20 ± 1.48*

\* Достоверно по отношению к исходной площади ран ( $P < 0.05$ ).

\*\* Достоверно по сравнению с контрольной группой на 10 сут ( $P < 0.01$ ).

# Достоверно по сравнению с 5% мазью метилурацила на 10-е сут ( $P < 0.05$ ); количество животных в группах равно 7.

**Таблица 6.** Количественные характеристики ингибирования ВИЧ в культуре клеток МТ-4 диникотинатом бетулина (II)

Препарат	IC <sub>50</sub> , мкг/мл	ID <sub>90</sub> , мкг/мл		ID <sub>50</sub> , мкг/мл		IS	
		по p24	по защите	по p24	по защите	по p24	по защите
(II)	≥ 20.0	>20	>20	0.02	>20	>1000	1
Азидотимидин	9.5	0.0060	0.0025	0.001	0.0007	9500	13571

раций 0.001–20.0 мкг/мл не токсично для клеток МТ-4 (IC<sub>50</sub> > 20.0 мкг/мл). Индекс IS соединения (I) >1000 (подавление накопления антигена p24 > 1000), что свидетельствует о его выраженном анти-ВИЧ-действии (табл. 6).

Таким образом, 3,28-диникотинат бетулина, обладающий гепатопротекторной, иммуномодулирующей, противовоспалительной, регенеративной и анти-ВИЧ-активностью, является перспективным соединением среди лупановых тритерпеноидов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ТСХ-анализ проводили на пластинках Silufol (Chemapol, Чехия), используя систему растворителей хлороформ–метанол, 20 : 1. Вещества обнаруживали 20% раствором фосфорновольфрамовой кислоты в этаноле с последующим нагреванием при 100–120°C в течение 2–3 мин. В работе использовали биохимические реактивы фирмы Lachema (Чехия).

Спектры ЯМР <sup>13</sup>C и <sup>1</sup>H регистрировали на спектрометре Bruker AM-300 (75.5 и 300 МГц соответственно) в дейтерохлороформе, внутренний стандарт – SiMe<sub>4</sub>. Температуры плавления определяли на микростолике Voetius. Хлоргидрат хлорангидрида никотиновой кислоты получали по методике [24].

**Методика выделения бетулина из коры березы.** Неизмельченную кору березы (вида *Betula pendula*) (400 г) экстрагировали азеотропной смесью изопропанола (3000 мл) в течение 2 ч при

90°C и давлении 17 атм. Выход сухого экстракта после двукратного экстрагирования составил 146.2 г (35%). Полученный экстракт перекристаллизовывали из ацетона и получали бетулин ( $T_{пл}$  256–258°C), готовый для использования в синтезе.

### Получение 3,28-ди-О-никотината бетулина (II).

К раствору 1 ммоль (0.44 г) бетулина (I) в смеси безводных 5 мл пиридина и 5 мл трибутиламина при перемешивании и охлаждении (0–5°C) прибавляли 3 ммоль (0.43 г) свежеприготовленного хлоргидрата хлорангидрида никотиновой кислоты. Температуру доводили до комнатной и перемешивали еще 4 ч. Реакционную массу выливали в 50 мл холодной воды, подкисляли соляной кислотой до pH ≈ 5 и экстрагировали хлороформом. Экстракт промывали водой, 5% раствором HCl, снова водой, сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и упаривали в вакууме. Выход продукта 0.59 г (93.6%).  $R_f$  0.55 (хлороформ–метанол, 20 : 1).  $T_{пл}$  116–118°C. Найдено, %: C 77.54, H 8.21, N 4.05. C<sub>42</sub>H<sub>56</sub>O<sub>4</sub>N<sub>2</sub>. Вычислено, %: C 77.26, H 8.64, N 4.29. УФ-спектр (EtOH),  $\lambda_{max}$ , 263 нм: (lg ε 4.18). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>, вазелиновое масло): 1730 (C=O), 1650 (CH=CH<sub>2</sub>), 1600 (Ar), 1470, 1390, 1330, 1300, 1260, 1220, 1150, 1050, 990, 910 (CH=CH<sub>2</sub>), 870. Спектр <sup>1</sup>H-ЯМР ( $\delta$ , м.д., J, Гц): 0.81 (<sup>1</sup>H, м, H5), 0.82 (3H, с, 24-, 25- или 26-CH<sub>3</sub>), 0.86 (3H, с, 23-CH<sub>3</sub>), 0.91 (3H, с, 24-, 25- или 26-CH<sub>3</sub>), 0.98 (3H, с, 27-CH<sub>3</sub>), 1.02 (3H, с, 24-, 25- или 26-CH<sub>3</sub>), 1.00–1.15 (4H, м, H1<sub>a</sub>, H12<sub>a</sub>, H15<sub>a</sub>, H22<sub>a</sub>), 1.17–1.50 (9H, м, H6<sub>a,b</sub>, H7<sub>a,b</sub>, H9, H11<sub>a,b</sub>, H16<sub>a</sub>, H21<sub>a</sub>), 1.63 (3H, с, 30-CH<sub>3</sub>), 1.51–2.00 (10H, м, H1<sub>b</sub>,

H2<sub>a,b</sub>, H12<sub>b</sub>, H13, H15<sub>b</sub>, H16<sub>b</sub>, H18, H21<sub>b</sub>, H22<sub>b</sub>), 2.50 (1H, дт, H19, J 5, 11, 11), 4.05 (1H, д, H28, J 11), 4.45–4.53 (2H, м, H28, H29), 4.60–4.67 (2H, м, H3, H29), 7.25 и 7.35 (2H, оба дд, H5', J 3.8, 4.7), 8.20 и 8.28 (2H, оба дд, H4', J 4.7, 1.6, 1.7), 8.65 и 8.70 (2H, оба т, H6', J 4.1), 9.14 и 9.18 (2H, оба дд, H2', J 1.8, 5.9). Спектр <sup>13</sup>C-ЯМР (δ, м.д.): 38.0 (C1), 23.6 (C2), 82.2 (C3), 38.2 (C4), 55.2 (C5), 18.0 (C6), 33.9 (C7), 40.7 (C8), 50.1 (C9), 36.9 (C10), 20.7 (C11), 25.0 (C12), 37.5 (C13), 42.6 (C14), 26.9 (C15), 29.7 (C16), 46.5 (C17), 48.7 (C18), 47.6 (C19), 149.8 (C20), 29.4 (C21), 34.5 (C22), 28.0 (C23), 15.9 (C24), 16.0 (C25), 16.6 (C26), 14.7 (C27), 63.7 (C28), 110.0 (C29), 19.0 (C30), 164.8, 165.8 (–O–C=O), 123.2 и 123.2 (C5'), 126.2 и 126.6 (C3'), 137.0 и 137.0 (C4'), 149.8 и 150.8 (C2'), 153.1 и 153.3 (C6').

**Фармакологическая часть.** Острую токсичность соединений определяли на белых беспородных мышах массой 18–20 г по Литчфилду–Уилкокксону [25]. Экспериментальный гепатит вызывали подкожным введением 50% масляного раствора четыреххлористого углерода в течение 4 сут [26]. Опыты проводили на белых беспородных крысах массой 180–200 г. О гепатозащитном действии судили по активности Ala- и Asp-амино-трансфераз, а также щелочной фосфатазы в сыворотке крови [27]. Изучаемое соединение вводили в желудок в терапевтической дозе, вычисленной при токсическом поражении печени CCl<sub>4</sub>, – 12 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали карсил (Sopharma, Болгария) в дозе 12 мг/кг. Выраженность ПОЛ оценивали по содержанию в гомогенате печени малонового диальдегида [28].

Влияние соединений на разные звенья иммунитета изучали на моделях гуморального иммунного ответа к эритроцитам барана (по числу антителообразующих клеток) и клеточного иммунитета на Т-зависимый антиген к эритроцитам барана (по разности массы отека и здорового уха мышей). Препаратом сравнения служил оксиметилурацил в дозе 50 мг/кг [29]. Функциональное состояние фагоцитов оценивали по способности лейкоцитов поглощать частицы латекса морфологическим методом при изучении мазка, окрашенного по Романовскому-Гимзе. Об интенсивности фагоцитоза судили по абсолютному фагоцитарному показателю, исходя из фагоцитарного индекса, фагоцитарного показателя и общего количества лейкоцитов в 1 л крови [30].

**Противоязвенное действие диникотината бетулина (II)** изучали на белых беспородных крысах массой 180–220 г на моделях экспериментальных язв желудка: индометациновой, аспириновой, спиртовой, криогенной. Острые повреждения слизистой оболочки желудка вызывали у голодных животных внутрибрюшинным введением индометацина в дозе 20 мг/кг, ацетилсалициловой кислоты в дозе 300 мг/кг [31], 60% этанола в 150 мМ

HCl [32]. Исследуемое соединение (II) вводили перорально в дозе 12 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали цитопротектор вентер в дозе 20 мг/кг. Лечебное действие изучали на модели этаноловой язвы, вызванной у наркотизированных крыс введением 70% раствора этилового спирта в подсерозную оболочку желудка в объеме 0.05 мл. Препарат начинали вводить через сутки после операции зондом в желудок в течение 10 сут. Криогенное повреждение (по методу Вертелкина) слизистой оболочки желудка вызывали путем аппликации к стенке пилорической части желудка охлажденного в жидком азоте металлического стержня d 7 мм в течение 10 с [33]. Соединение вводили с 5 по 15 дни в терапевтической дозе. О противовоспалительной активности соединения судили по уменьшению количества деструкций слизистой оболочки и средней площади заживающих язв.

**Противовоспалительную активность** изучали на известных моделях асептических артритов, вызванных 3% раствором формалина и 1% раствором каррагенана, которые вводили в объеме 0.05 мл под апоневроз правой стопы мышей [34]. Изучаемое вещество в указанной дозе вводили через зонд в желудок за 1 ч до воспроизведения отека, через 1 и 2 ч после инъекции флогогена. В качестве препарата сравнения использовали ортофен (Акрихин, ОАО “Химфармкомбинат”, Россия) в дозе 8 мг/кг. О противовоспалительной активности судили по среднему проценту увеличения массы отека правой лапки по сравнению с массой здоровой исходной (масса левой лапки).

**Влияние диникотината бетулина (II) на репаративную регенерацию кожи** исследовали на двух моделях кожных ран. Термический ожог кожи воспроизводили у крыс: на боковой поверхности тела удаляли волосную покров и через стеклянную трубку на кожу наливали воду (100°C) на 10–12 с. Во второй серии воспроизводили послойные лоскутные раны. Определяли площадь и выраженность ожога на следующие 10 и 15 сут. На раны наносили 1% мазь диникотината (II); в качестве препарата сравнения использовали 5% мазь метилурацила (“Алтайвитамины”, Россия).

**Анти-ВИЧ-активность диникотината бетулина (II)** изучали на традиционной модели первично инфицированных ВИЧ лимфоидных клеток МТ-4. В работе использовали штамм ВИЧ-1/ЭВК. Цитотоксичность соединения оценивали в культуре перевиваемых Т-лимфоцитов человека линии МТ-4. Препарат растворяли в этиловом спирте и в соответствующих разведениях вносили в лунки 96-луночных культуральных планшетов (по три лунки на каждое разведение) при расходе клеток. Посевная концентрация составляла  $5 \times 10^5$  клеток/мл. Далее клетки культивировали на ростовой среде (среда RPMI-1640 с добавлением 10% сыворотки плода коровы, 0.06% L-глутамин, 100 мкг/мл



гентамицина и 60 мкг/мл линкомицина) при 37°C и 5% углекислого газа в течение 4 сут. По окончании инкубации подсчитывали долю жизнеспособных клеток в камере Горяева после окрашивания трипановым синим. Строили дозозависимую кривую и определяли концентрацию соединений, вызывающую гибель 50% клеток, –  $CD_{50}$ . Для оценки анти-ВИЧ-активности соединения клетки МТ-4 инфицировали штаммом ВИЧ-1/ЭВК с множественностью заражения 0.2–0.5 инфекционных единиц на клетку. После адсорбции вируса в течение 1 ч при 37°C инфицированные и контрольные клетки разводили ростовой средой до посевной концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/мл и вносили в лунки 96-луночных культуральных планшетов. Затем вносили раствор соединения (II) (по три лунки на каждое разведение) и далее культивировали как описано выше. Концентрация соединения составляла от 0.001 до 20 мкг/мл.

**Ингибирующий эффект соединения (II)** оценивали на 4 сут культивирования измерением количества вирусного антигена р24 иммуноферментным методом. Кроме того, определяли анти-ВИЧ-активность, исходя из степени защиты инфицированных клеток от гибели в результате вирусной инфекции, подсчитывая долю жизнеспособных клеток в камере Горяева после окрашивания трипановым синим. На основе полученных результатов строили дозозависимые кривые и определяли количественные характеристики ингибирования репродукции ВИЧ:  $ID_{50}$  – концентрацию соединения, на 50% подавляющую продукцию вируса или обеспечивающую 50% защиту клеток;  $IS$  – индекс селективности: отношение токсичной дозы соединения  $IC_{50}$  к его эффективной дозе  $ID_{50}$ .

Воспроизведение экспериментальных патологий (язв, ожогов, ран, воспалений) проводили у животных, наркотизированных этаминалом натрия. Декапитацию крыс осуществляли под эфирным наркозом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 00-03-81174, 01-03-33131).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R.E., Cosentino L.M., Ballas L.M., Jiang J.B., Janzen W.P., Chen I.-S., Lee K.-H. // *J. Nat. Prod.* 1994. V. 57. P. 243–247.
2. Pisha E., Chai H., Lee I., Chagwedera T.E., Farnsworth N.R., Cordell G.A., Beecher C.W.W., Fong H.H.S., Kinghorn A.D., Brown D.M., Wani M.C., Wall M.E., Hicklen T.J., das Gupta T.K., Pezzuto J.M. // *Nat. Med.* 1995. V. 1. P. 1046–1051.
3. Recio M.C., Giner R.M., Manes S., Gueno S., Julien H.R., Hostettmann K., Rios J.L. // *Planta Med.* 1995. V. 61. P. 9–12.
4. Fulda S., Jeremias I., Steiner H.H., Pietsch T., Debatin K.-M. // *Int. J. Cancer.* 1999. V. 82. P. 435–441.
5. Carlson R.M., Krasutsky P.A., Karim R.-U. Use of Betulin and Analogs Thereof to Treat Herpesvirus Infection. US patent 5, 750, 578 from May 12, 1998.
6. Lugemwa F.N., Huang F.Y., Bentley M.D., Mendel M.J., Alford A.R. // *J. Agric. Food Chem.* 1990. V. 38. P. 493–496.
7. Huang F.-Y., Chung B.Y., Bentley M.D., Alford A.R. // *J. Agric. Food Chem.* 1995. V. 43. P. 2513–2516.
8. Немиллов В.Е., Начинкин О.И., Царев Г.И. // *Физико-химия полимеров.* 1996. Т. 2. С. 124–127.
9. Jaaskelainen P. // *Pap. ja Puu.* 1981. V. 10. P. 599–603.
10. Флехтер О.Б., Карачурина Л.Т., Поройков В.В., Нигматуллина Л.Р., Балтина Л.А., Зарудий Ф.С., Давыдова В.А., Спирихин Л.В., Байкова И.П., Галин Ф.З., Толстиков Г.А. // *Биоорганическая химия.* 2000. Т. 26. С. 215–223.
11. Флехтер О.Б., Карачурина Л.Т., Нигматуллина Л.Р., Балтина Л.А., Зарудий Ф.С., Давыдова В.А., Спирихин Л.В., Байкова И.П., Галин Ф.З., Толстиков Г.А. // *Хим.-фарм. журн.* 2000. Т. 34. С. 3–5.
12. Флехтер О.Б., Нигматуллина Л.Р., Карачурина Л.Т., Балтина Л.А., Зарудий Ф.С., Давыдова В.А., Галин Ф.З., Толстиков Г.А. // *Хим.-фарм. журн.* 2000. Т. 34. С. 17–20.
13. Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Шульц Э.Э., Покровский А.Г. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 691–709.
14. Покровский А.Г., Плясунова О.А., Толстиков Г.А., Муринов Ю.И. Ингибитор размножения вируса иммунодефицита человека: А.с. СССР 1804848 // *Б. И.* 1993. № 12.
15. Покровский А.Г., Беланов Е.Ф., Волков Г.В., Плясунова О.А., Толстиков Г.А. // *Докл. АН.* 1995. Т. 344. С. 709–711.
16. Дружинина Н.А. Особенности болезней верхнего отдела пищеварительного тракта у школьников из регионов атмосферного загрязнения и подход к фармакотерапии. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Челябинск, 1996. 31 с.
17. Мамон М.А. Клинико-патологическое изучение гомеостаза и выделительной функции почек у больных геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в условиях комплексной терапии с применением ниглизина. Автореф. дис. канд. мед. наук. М., 1998. 23 с.
18. Sun I.-C., Wang H.-K., Kashiwada Y., Shen J.-K., Cosentino L.M., Chen C.-H., Yang L.-M., Lee K.-H. // *J. Med. Chem.* 1998. V. 41. P. 4648–4657.
19. Chatterjee P., Pezzuto J.M., Kouzi S.A. // *J. Nat. Prod.* 1999. V. 62. P. 761–763.
20. Николаев С.М. Растительные лекарственные препараты при повреждениях гепатобилиарной системы. Новосибирск: Наука, 1992. 155 с.
21. Алексеева И.Н., Брызгин Т.М., Павлович С.И., Ильевич Н.В. Печень и иммунологическая реактивность. Киев: Наук. думка, 1991. 168 с.
22. Камилов Ф.Х., Лазарева Д.Н., Плечев В.В. Пиримидины и их применение в медицине. Уфа: Башк. гос. мед. ин-т, 1992. 156 с.

23. Плясунова О.А., Егоричева И.Н., Федюк Н.В., Покровский А.Г., Балтина Л.А., Муринов Ю.И., Толстиков Г.А. // Вопросы вирусологии. 1992. № 5–6. С. 235–238.
24. Наумова Б.С., Чекмарева И.Б., Жданович Е.С., Преображенский Н.А. // Хим.-фарм. журн. 1969. Т. 3. С. 11–12.
25. Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Ленинград: Медгиз, 1963. 152 с.
26. Скакун Н.П., Ковальчук С.Ф. // Фармакол. и токсикол. 1987. Т. 50. С. 97–99.
27. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. Минск: Беларусь, 1976. 311 с.
28. Стальная И.Д., Гаршивили Т.Г. // Современные методы в биохимии / Ред. В.Н. Орехович. М.: Медицина, 1977. С. 66–69.
29. Cunningham A.J., Gzenberg A. // Further Unprovement in the Plague, Technique for Detecting Single Antibody Forming Cell Immunology. 1968. V. 2. P. 599–600.
30. Иммунологические, цитохимические и биохимические методы исследования фагоцитирующих клеток: Методические рекомендации. Уфа: Башк. гос. мед. ин-т, 1996. 85 с.
31. Аничков С.В., Заводская И.С. Фармакотерапия язвенной болезни. Л.: Медицина, 1965. 187 с.
32. Кузьмицкий Б.Б., Мизуло М.А., Романова В.Н., Малаева Л.П. // Экспер. и клин. фармакология. 1992. Т. 55. С. 27–28.
33. Вертелкин В.А., Голофеевский В.Ю., Стефанюк Н.Ф., Салтыков А.А. Криогенный способ формирования экспериментальной язвы желудка. Пат. Физиология. 1987. № 2. С. 77–78.
34. Тринус Ф.П., Мохорт Н.А., Клебанов Б.М. Нестероидные противовоспалительные средства. Киев: Здоров'я, 1975. 240 с.

## Synthesis and Pharmacological Activity of Betulin Dinicotinate

O. B. Flekhter<sup>\*#</sup>, L. T. Karachurina<sup>\*</sup>, L. R. Nigmatullina<sup>\*</sup>,  
T. A. Sapozhnikova<sup>\*</sup>, L. A. Baltina<sup>\*</sup>, F. S. Zarudii<sup>\*</sup>, F. Z. Galin<sup>\*</sup>, L. V. Spirikhin<sup>\*</sup>,  
G. A. Tolstikov<sup>\*</sup>, O. A. Plyasunova<sup>\*\*</sup>, and A. G. Pokrovskii<sup>\*\*</sup>

<sup>#</sup>Fax: (3472) 35-6066; e-mail: obf@anrb.ru

<sup>\*</sup>Institute of Organic Chemistry, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences,  
pr. Oktyabrya 71, Ufa, Bashkortostan, 450054 Russia

<sup>\*\*</sup>Laboratory of Retroviruses, Institute of Molecular Biology, NPO Vector,  
pos. Kol'tsovo, Novosibirsk oblast, 633159 Russia

The assignment of NMR resonances of lupane triterpenoids was refined by the example of 3,28-dinicotinoylbetulin, obtained by acylation of betulin. Hepatoprotective, antiulcer, antiinflammatory, reparative, and anti-HIV activities were found for the compound. In addition, it was demonstrated to have immunomodulatory activity, for the first time detected among lupane triterpenoids. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 6; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* betulin dinicotinate; hepatoprotective, immunomodulatory, antiulcer, anti-HIV activities; lupane triterpenoids