

REPORTS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
ISSN 2224-5227

Volume 4, Number 302 (2015), 135 – 140

UDC 615.1/.4(075)

DEVELOPMENT OF PRECLINICAL STUDIES OF GLYCYRRHETIC ACID DERIVATIVES AND PRACTICAL IMPLEMENTATION OF NEW TECHNOLOGIES IN PHARMACOLOGY

K.D. Rakhimov

“KazMUCE”, JSC, Almaty, Kazakhstan
assa2014@inbox.ru, krakhimov@rambler

Key words: licorice, glycyrrhetic acid, anti-tumor activity, tumor.

Abstract. Based on the study findings we have drawn a conclusion that a crucial role in the anti-tumor activity of glycyrrhetic acid derivatives is attached to the second conjugated carbonyl group.

Thuswise, a high anti-tumor effect was found experimentally in Δ 1,2-3-keto-18-dehydrogulonic acid sodium salt.

УДК 615.1/.4(075)

РАЗРАБОТКА ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРОИЗВОДНЫХ ГЛИЦЕРРЕТОВОЙ КИСЛОТЫ И ВНЕДРЕНИЕ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ФАРМАКОЛОГИЮ

К.Д. Рахимов

АО «КазМУНО», Алматы, Республика Казахстан

Ключевые слова: солодка, глицирретовая кислота, противоопухолевая активность, опухоль.

Аннотация. Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что решающую роль в противоопухолевой активности производных глицирретовой кислоты играет введение второй сопряженной карбонильной группы.

Так, высокий противоопухолевый эффект в условиях эксперимента выявлен у натриевой соли Δ 1,2-3-кето-18-дегидроглицирретовой кислоты.

Глицирретовая кислота содержится в солодковом корне. В Казахстане наиболее распространены и продуктивны солодки голая (*Glycyrrhiza Glabro* L.) и уральская (*G. Urolensis* Fisch). Сырьевые запасы солодки в Казахстане весьма богаты [1,2].

Солодка является постоянным компонентом лекарственных прописей средств народной медицины и принимают ее как легкое слабительное, отхаркивающее средство. Обладает умеренным диуретическим действием [3].

По своей химической структуре глицирретовая кислота (I) является пентациклической оксикетотритерпеновой кислотой ряда амирина. Характерным фрагментом в ее структуре является наличие в положении II сопряженной кетогруппы, что приближает ее к стероидам (прогестерону) и обуславливает подобные биологические свойства. Наличие сопряженной кетогруппы давало основание предположить наличие у нее противоопухолевой активности. В солодках голой и уральской она находится в виде гликозида, называемого глициррезинозой (II), в которой агликон (глицирретовая кислота) связана по гидроксилу в положении 3 с двумя остатками

глюкуроновой кислоты. Существует 2 изомера глицирретовой кислоты α и β - эпимеры, различающиеся по положению водородного атома при С-18.

В последние годы успешно проходят клиническое изучение препараты, выделенные из солодки голой. (*Glycyrrhiza Glabra* L.). В частности, производные глицирретовой кислоты-18-дегидроглицирретовой кислоты (глицирретинин) [4] и монозамещенная аммониевая соль глицирретовой кислоты [5]. Они обладают противовоспалительными свойствами, используются в виде мази при лечении аллергических дерматитов, экзем и др. кожных заболеваний.

Полученные Lauria F [6] основные эфиры α и β глицирретовой кислоты с аминами циклического ряда (пиридином, пирролом, оксазином) и диметиламиноэтиловые эфиры 3-кето- α и β -глицирретовой кислоты активны по отношению к миеломе Оберлинга-Гверина на крысах, 3-кето- и 3-кето-20 кетоацетаты α и β глицирретовой кислоты эффективно действуют при лимфобластическом варианте острой лейкемии. В то же время II-дезоксиглицирретовая кислота, сукцинаты α и β - глицирретовой кислоты и α -диметиламиноэтиловый эфир 3-кетоглицирретовой кислоты, обладающие высоким противовоспалительным действием, были неэффективны при острых лейкемиях. У β/β' - дихлордиаэтилдифенилацетат метилглицирретата обнаружена противоопухолевая активность в эксперименте. Сама глицирретовая кислота, подобна гидрокортизону, оказала ингибирующее действие на развитие опухолей, полученных у подопытных крыс инъекцией 3%-ного раствора формалина [7]. О наличии определенной противолейкемической активности названной кислоты и ее производных сообщает Logeman W.F. et al. [8,14]. Так, глицирретовая кислота достоверно тормозила развитие миеломы Оберлинга-Гверина, причем 18- α изомер проявил несколько большую эффективность. Активными в отношении данной миеломы были 3 кето-18- α - глицирретовая кислота (% отношение веса опухоли к веществу к весу опухоли в контроле -0,33), а также 3-кето-20-кетол-18- β -глицирретовая кислота (%-0,42). Но последняя не оказывала тормозящего действия на лейкемию L 1210 у мышей. Удаление II – кетогруппы также как и введение диметиламиноэтильной группировки, резко снижает противолейкемический эффект (%-0,88-0,94), у глицирретовой кислоты и ее производных не выявлено терапевтического эффекта в опытах на мышцах с саркомой 180.

Тогда как производное глицирретовой кислоты из солодки голой при подкожном введении тормозило развитие асцитной опухоли Эрлиха (штамм В и Г) на 42-62% и саркомы 180-до 56%. При этом в отношении первых двух штаммов (ВИГ) достоверное ингибирующее действие проявлялось и при уменьшении дозы до $\frac{1}{2}$ МПД (35-56%). Пероральное введение этого вещества приводило к существенной задержке роста асцитной опухоли Эрлиха (штамм В)- на 63%, саркомы 180-48% и саркомы 37- на 81%. Также отмечено, что при сопоставлении результатов опытов *in vivo* и *in vitro*, задерживающее влияние производного глицирретовой кислоты № I на опухолевый рост является опосредованным [9]. Эта точка зрения подтверждается литературными данными о способности тритерпеноидных соединений из солодки препятствовать разрушению кортикоидных гормонов в тканях [10] и тем самым усиливать их действие. Гормоны же надпочечников, как известно, в больших дозах подавляют пролиферацию клеточных элементов опухоли [9,14].

В нашей работе мы исследовали производные глицирретовой кислоты (натриевая соль Δ 1,2-3-кето-18-дегидроглицирретовой кислоты - препарат «ГК») β -изомер, выделенный из солодки уральской в лаборатории химии растений Института химических наук АН КазССР ныне Институт химических наук им. А.Б. Бектурова - генеральный директор Е.Е. Ергожин, лауреат Государственной премии в области науки и техники, Заслуженный деятель науки и Заслуженный изобретатель Республики Казахстан, академик НАН РК, доктор химических наук, профессор (Г.К. Никонов с сотрудниками).

Как указывалось выше, противоопухолевые свойства у сапогенинов возрастают по мере увеличения количества связанных с ними сахарных остатков, и у гликозидов проявляются в наибольшей степени.

По результатам острой и хронической токсичности производных глицирретовой кислоты гибель животных (мышей и крыс) от непереносимых доз в основном наступала в первые сутки после введения, начиная сразу после инъекции или через 1-4 часа. Токсические явления были обусловлены нарушением кровообращения во внутренних органах. Причиной гибели животных от

непереносимых доз, возможно, послужила острая сердечно-легочная недостаточность, гемолитическая анемия (эритропения). Применение высоких доз (ЛД₁₀) нужно производить с осторожностью из-за небольшого разрыва величин нижней доверительной границы ЛД₅₀ и ЛД₁₀ (МПД).

При изучении хронической токсичности в максимально переносимых дозах (МПД) при ежедневном внутривенном и внутривенном введении в течение 5 или 10 дней не наблюдалось выраженного отрицательного действия на животных и их гибели.

Препарат «ГК» среди производных глицирретовой кислоты в переносимых дозах вызывал обратимое повышение в сыворотке крови крыс мочевины, остаточного азота, белка в середине курса введения препарата. При этом препарат, достоверно умеренно увеличивает активность аланин-аминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови крыс в течение всего курса его введения и в следующий месячный срок наблюдения. При этом (в переносимых дозах «ГК») изменения гематологических и других биохимических показателей крови и мочи имели обратимый характер [11,13].

Препарат «ГК» в переносимых дозах не угнетает фолликулостимулирующую активность гипофиза у интактных крыс и состояния желудочно-кишечного тракта, не изменяет антиоксидантную функцию печени [1,13].

Первоначально провели сравнительное изучение глициррезинового R₁ = (глюкоуроновая – глюкоуроновая кислота) и глицирретовой кислот R₂=H.

Для обеспечения растворимости в воде оба вещества испытывались в виде натриевых солей. При этом выяснилось, что как гликозид (R₁ – глюкоуроновая – глюкоуроновая кислоты; R₂=N a) так и агликон (R₁-OH; (R₂- Na) имеют практически равную и невысокую активность в пределах 50-67% на карциносаркоме Уокера и лимфосаркоме Плисса.

Замена гидроксильной группы на аминогруппу существенно не отразилось на активности. Только на С 37 и солидной опухоли Эрлиха несколько повысилась противоопухолевая активность, однако и в этих случаях не превысила процент торможения роста опухоли 50%. Наиболее высокая активность как у агликона, так и аминокислотного производного была отмечена в случае ЛСП (57-60%, P<0,05).

Как известно, противоопухолевые свойства обуславливаются наличием сопряженного карбонила, который присутствует в молекулах значительного числа природных цитостатиков. Поэтому представило интерес изучить производные глицирретовой кислоты, содержащие два сопряженных карбонила.

С этой целью была получена натриевая соль – 3- кето-глицирретовая кислота (R₁ =C=O; Δ' R₂=Na), содержащая сопряженные карбонильные группы при С₁₁ и С₃.

Противоопухолевая активность при введении второго сопряженного карбонила существенно повысилась в ряде мышинных (саркоме 37 от 29 до 64%, саркоме 180- от 20 до 52%, солидной опухоли Эрлиха от 20 до 51%, гепатоме 22-от 28 до 58%) и крысиных (КСУ от 50 до 62%: С М- I от 38 до 72%), а также на С 45, устойчивой к проспидину, - от 10 до 89%. Хотя параметры острой токсичности одинаковые с другими соединениями. На основании высокой противоопухолевой активности и по простоте осуществления синтеза Δ'-3-кето-глицирретовой кислоты мы считаем целесообразным рекомендовать ее для предклинических испытаний.

Было изучено также влияние сопряженности карбонила при С II за счет введения второй двойной связи по С 18-С19 (Δ 18,19).

Определено также влияние сопряженности карбонила при С 17 за счет введения второй двойной связи по С18-С19, для чего синтезирована натриевая соль 18-дегидроглицирретовой кислоты, однако это превращение не дало результата. На перевиваемых опухолевых штаммах ЛСП. КСУ это вещество по цитостатическому действию практически не отличалось от 3-кето производного, а на штамме СМ- I и К.Герена показало даже снижение активности.

С целью уточнить имеет ли введение сопряженного карбонила в положении 3 столь решающее значение в проявлении терапевтического эффекта, была изучена активность натриевой соли Δ 1,2-3- кето-18-дегидроглицирретовой кислоты (ГК).

Выявили, что как в случае глицирретовой, так и в 18-дегидроглицирретовой кислоты введение сопряженного карбонила по С₃ вызывает значительное повышение противоопухолевых свойств.

Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что решающую роль в противоопухолевой активности производных глицирретовой кислоты играет введение второй сопряженной карбонильной группы.

Так, высокий противоопухолевый эффект в условиях эксперимента выявлен у натриевой соли Δ 1,2-3-кето-18-дегидроглицирретовой кислоты («ГК»). В МПД при внутрибрюшинном и внутривенном введении крысам и мышам достоверно ингибировала рост ЛСП, КСУ, С180, С 37 (77-90%, $P < 0,05-0,001$), К. Герена, Са 755, солидной опухоли Эрлиха, альвеолярного слизистого рака печени РС-I (61-76%, $P < 0,05-0,05$). Другие опухолевые штаммы малочувствительны к «ГК». Эти результаты получены и изучены нами впервые [12].

Данный препарат (под шифром «ГК») прошел предклиническое изучение [1, 13].

Для выявления возможности использования других способов введения были поставлены опыты на крысах и мышах с чувствительными к препарату перевиваемыми опухолями. Подкожное и внутримышечное введение «ГК» и МПД давали несколько меньший противоопухолевый эффект. Кроме того, наблюдали выраженное местно-раздражающее действие (в месте инъекций – отек, инфильтрат, некроз ткани). Малоэффективным было и пероральное и ректальное введение препарата мышам с солидной опухолью Эрлиха, С37 и крысам с ЛСП, КСУ (20-54%). Высокий противоопухолевый эффект натриевой соли Δ 1,2-3-кето-18 – дегидроглицирретовой кислоты («ГК»), как отмечалось выше, получили при внутрибрюшинном и внутривенном введении. При этом следует отметить достоверно большую эффективность внутривенного способа введения препарата, чем внутрибрюшинного, по такому показателю, как увеличение средней продолжительности жизни животных: до 38% ($P < 0,05$) крыс с ЛСП и до 23% ($P < 0,05$) крыс с КСУ.

При разработке оптимального режима применения препарата «ГК» установлено, что 5-10-кратное внутривенное введение приводит к значимо большему противоопухолевому эффекту, чем одно-, двух-, трехкратное. Наибольшая активность достигается в пределах доз 3-4 МПД – МПД с интервалом в 24, а также 48 часов между инъекциями (до 70-90% торможения роста вышеуказанных опухолей $P < 0,01-0,001$).

При интервале в 72 часа между инъекциями эффективность снижалась до 55%.

Было проведено сравнительное исследование противоопухолевого действия препарата «ГК» и ряда веществ среди хлорэтиламинов (сарколизин), этилениминов (тиофосфамид), антиметаболитов (6-меркаптопурин, метотрексат) и растительных алкалоидов (винкристин) на чувствительных и исходно резистентных опухолях соответственно к каждой группам. Названные препараты (при ежедневном внутрибрюшинном и внутривенном введениях в течение 10 дней в эквивалентных по токсичности дозах-МПД) по силе влияния на использованные перевиваемые опухоли существенно отличаются от натриевой соли Δ 1,2-3-кето-18-дегидроглицирретовой кислоты.

Наряду с этим нами впервые были предприняты исследования препарата «ГК» при внедрении новых технологий в фармакологию (фармакокинетику, фармакогенетику), кроме того исследования проводились и на органных культурах опухолей человека различной локализации и чувствительности: рак полости рта (плоскоклеточный), аденокарцинома желудка, аденокарцинома легких, тератобиостома ямчика и рак мочевого пузыря. При этом препарат проявил некоторую активность в отношении аденокарциномы желудка и аденокарциномы легких, остальные опухолевые локализации оказались резистентными к препарату «ГК» [1]. Препарат полностью агглютинирует опухолевые клетки асцитных вариантов ЛСП. С37, КСУ и значительно – клетки опухоли Эрлиха (исследование агглютинации с асцитными опухолевыми клетками проводили в разных концентрациях препарата «ГК» -1,5; 2,0;3,0%) [1].

Изучено влияние препарата «ГК» на лекарственно резистентные штаммы перевиваемых опухолей крыс. Препарат «ГК» в лекарственной форме МПД как при внутрибрюшинном, так и, в особенности, при внутривенном введениях вызывает несущественный противоопухолевый эффект на лекарственно резистентный к рубомицину и проспидину вариант лимфосаркомы Плисса (20-29%). Сохранилась исходная чувствительность к данному препарату, ЛСП, резистентной к лейкофдину.

К препарату «ГК» при обоих способах введения обнаружена повышенная чувствительность С 45, резистентного к рубомицину (73-75% торможения. $P < 0,05$). Субштаммом С 45, резистентной к

проспидину и сарколизину, при лечении препаратами «ГК» возникла коллатеральная чувствительность (90-94%, ингибирования соответственно, с рассасыванием опухолей у 20-40% животных) против исходного варианта (40-44%). Обнаружена перекрестная резистентность к препарату «ГК» у С 45, резистентной к 5-фторурацину.

Препарат «ГК» существенно удлинял продолжительность жизни мышей с лимфоидной лейкемией L 1210, резистентной к 6-меркаптопирину (УПЖ-69%) и метотрексату (УПЖ - 64%) и умеренно L 1210, резистентного варианта к нитрозометилмочевину (УПЖ-44%) [13].

Таким образом, из изученных производных глицирретовой кислоты выраженное противоопухолевое действие проявляет натриевая соль Δ 1,2-3-кето-18-дегидроглицирретовой кислоты (препарат под шифром «ГК»). Это, по-видимому, обуславливается тем, что двойные связи, входящие в группировки α, β – ненасыщенных кетонов, реагируют с биологически важными нуклеофилами. Вещество также содержит триангулярную систему, в вершинах треугольника которой находятся атомы с неподеленными парами электронов с повышенной электронной плотностью [12].

Препарат «ГК» в лекарственной форме вызывает перекрестную резистентность к 5-фторурацилу субштамма С 45, ЛСП к рубомицину и коллатеральную чувствительность к препарату «ГК» у резистентного к сарколизину, проспидину подштаммов С 45. Удлиняет продолжительность жизни мышей с лимфоидной лейкемией L 1210, резистентной к 6-меркаптопирину и метотрексату [13].

Предклиническое испытание препарата «ГК» на опухолях человека в условиях органного культивирования позволяет прогнозировать перекрестную резистентность и коллатеральную чувствительность в клинике «ГК», что представляет интерес для изучения в плане потенциального противоопухолевого средства.

Материалы подготовлены и в свое время были представлены в фармакологический комитет МЗ РК для утверждения его на клиническую апробацию.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Отчет по теме «Провести предклиническое исследование нового растительного вещества противоопухолевого действия натриевой соли Δ 1,2-3-кето-18-дегидроглицирретовой кислоты». – Алма-Ата, 1985. – 197с.
- [2] Худайбергенев Э.Б. Солодки Казахстана. Алма-Ата: Наука, 1979. – 127с.
- [3] Ибрагимов Ф.И., Ибрагимова В.С. Основные лекарственные средства китайской медицины. – М.: Медгиз, 1960. – 410с.
- [4] Азимов М.М., Закиров У.Б., Раджапова Ш.Д. Фармакологическое изучение противовоспалительного средства глицерина//Фармакол. и токсикол., 1988. – Л/ - 4. – С.90-93.
- [5] Татаурова Т.А., Крекова Л.В., Ворникова В.В. и др. Токсикологическое доклиническое изучение глицерама//Фармакол. и токсикол. – 1988. - // - 6. С.87-90.
- [6] Lauria F. Esteri basici degli e glycyrrhettinico// Gazz. Chim.Ital. – 1961. – Vol.16, № 1. – P.210-214.
- [7] Brown H.M. Glycyrrhetic and hydrogen succinate (Disodium salt) a new anti-inflammatory compound//Lancet. – 1959. - №2. – P.492.
- [8] Жусупова Г.Е., Ержанова М.С., Рахимов К.Д., Верменичев С.М. Противоопухолевая активность скльфокилот кверцетина//XXX интернациональный конгресс неорганической химии. – София, - 2. – 1987. – С.9-32.
- [9] Шварев И.Ф., Коновалова Н.К., Путилова Г.И. Влияние тритерпеноидных соединений из солодки голой на экспериментальные опухоли//Вопр.изучения и использования солодки в СССР. – М.-Л., 1966. – С.167-170.
- [10] Atherden L.M. Glycyrrhetic acid: inhibition of metabolism of steroids in vitro//Biochem. – 1958. - №69. – P.75-78.
- [11] Сергеев А.В., Ревазова Е.С., Денисова С.И., Калоцкая О.В., Рытенко А.Н., Чистякова Л.П. Иммуномодулирующая и противоопухолевая активность полисахаридов растительного происхождения//Бюлл. эксперим. биологии и медицины. 1985. – ТС. – 12. – С.741-743.
- [12] Никонов Г.К., Ирismetов М.И., Мирзасалиева Н.А., Верменичев С.М., Кабиев О.К., Рахимов К.Д. Натриевая соль Δ 1,2-3-кето-18-дегидроглицирретовой кислоты, обладающая противоопухолевой активностью//Авт. свидет. СССР № 145453, 1984.
- [13] Рахимов К.Д. Новые природные соединения в химиотерапии лекарственно резистентных опухолей. Дисс. док. мед. наук. Москва. 1991. С.455.
- [14] Рахимов К.Д. Фармакология оку құралы. Алматы, 2014 – 554 Б.

REFERENCES

- [1] Report on “Preclinical studies of a new plant substance with anti-tumor effect using Δ 1,2-3-keto-18-dehydrogluconic acid sodium salt”. - Almaty, 1985. – P.197. (in Russ.).

- [2] Khudaibergenov E.B. Licorice of Kazakhstan. Alma-Ata: Science, 1979. – P.127. (in Russ.).
- [3] Ibragimov F.I., Ibragimov V.S. Essential medicines from Chinese medicine. - M.: Medgiz, 1960. – P.410. (in Russ.).
- [4] Azimov M.M., Zakirov U.B., Radzhapova Sh.D. Pharmacological study of anti-inflammatory gliderininum // Pharmacology and Toxicology, 1988. - L / - 4. - P.90-93. (in Russ.).
- [5] Tataurova T.A., Krekova L.V., Vortnikova V.V. and colleagues. Toxicological preclinical study of glycyram // Pharmacology and Toxicology - 1988. - // - 6. P.87-90. (in Russ.).
- [6] Lauria F. Esteri basici degli e glycyrrhettinico// Gazz. Chim.Ital. – 1961. – Vol.16, № 1. – P.210-214.
- [7] Brown H.M. Glycyrrhetic and hydrogen succinate (Disodium salt) a new anti-inflammatory compound//Lancet. – 1959. - №2. – P.492.
- [8] Zhusupova G.E., Yerzhanova M.S., Rakhimov K.D., Vermenichev S.M. Antitumor activity of quercetin sulfonic acid // XXX International Congress of Non-Applied Chemistry. - Sofia - 2 - 1987 - P.9-32. (in Russ.).
- [9] Shvarev I.F., Konovalova N.K., Putilova G.I. Effect of triterpenoid compounds from common licorice on experimental tumors // Study and use of licorice in the USSR. – M.-L., 1966. - P.167-170. (in Russ.).
- [10] Atherden L.M. Glycyrrhetic acid: inhibition of metabolism of steroids in vitro//Biochem. – 1958. - №69. – P.75-78.
- [11] Sergeyev A.V., Revazova E.S., Denisovs S.I., Kalotskaya O.V., Rytenko A.N., Chistyakova L.P. Immunomodulatory and antitumor activity of vegetable polysaccharides // Exper. biology and medicine. 1985 - TS. - 12 - P.741-743. (in Russ.).
- [12] Nikonov G.K., Irismetov M.I., Mirzasalieva N.A., Vermenichev S.M., Kabiev O.K., Rakhimov K.D. Δ 1,2-3-keto-18-dehydrogulonic acid sodium salt with anti-tumor effect // USSR inventor's certificate № 145453, 1984. (in Russ.).
- [13] Rakhimov K.D. New natural compounds in chemotherapy against drug resistant tumors. Thesis of Dr.scient.med. Moscow. 1991. P.455. (in Russ.).
- [14] Rakhimov K.D. Pharmacology teaching tools. Almaty, 2014 – P. 554. (in Russ.).

ӨНДІРІЛГЕН ГЛИЦЕРРЕТ ҚЫШҚЫЛЫН КЛИНИКА АЛДЫ ЗЕРТТЕУІН ӨНДЕУ ЖӘНЕ ФАРМАКОЛОГИЯҒА ЖАҢА ТЕХНОЛОГИЯЛАРДЫ ЕНГІЗУ

К.Д. Рахимов

Аннотация. Жасалған зерттеу жұмыстарының нәтижелері өндірілген глициррет қышқылының ісікке қарсы белсенділігінде шепуші рольді ілесетін екінші карбонильді топты енгізу болып табылатынын көрсетеді.

Сонымен, фармакологиялық тәжірибе кезінде ісікке қарсы жоғары әсер натрий тұзында Δ 1,2-3-кето-18-дегидроглициррет қышқылында анықталды.

Кілт сөздер: мия шөп, глициррет қышқылы, ісікке қарсы белсенділік, ісік.

Поступила 15.07.2015 г.