



УДК 547.92+541.69

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ СТЕРОИДОВ

11 \*. О ЗАВИСИМОСТИ МЕЖДУ СТЕПЕНЬЮ УПЛОЩЕННОСТИ МОЛЕКУЛЫ  
СТЕРОИДА И МИНЕРАЛОКОРТИКОИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

*Камерницкий А. В., Павлова-Гришина Н. С., Скорова А. В.*

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

*Каверина Л. П., Круглова О. Н., Терехина А. И.*

*Научно-исследовательский институт по биологическим испытаниям  
химических соединений, С. Кулава Московской обл.*

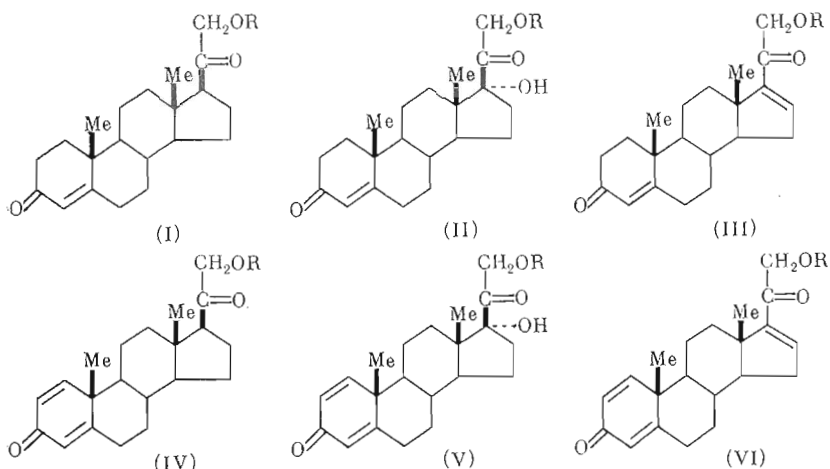
Исходя из 21-ацетатов кортексона (I) и кортексолона (II) синтезированы  $\Delta^1$ -аналоги соединений (I) и (II) (производные (IV) и (V)),  $\Delta^{16}$ - и  $\Delta^{1,16}$ -аналоги (I) (производные (III) и (VI)), а также 21-гемисукцинаты всех упомянутых стероидов. Все полученные соединения исследованы *in vivo* на минералокортикоидную активность в сравнении с соединением (I) и на антиминералокортикоидную активность в сравнении со спиронолактоном. Введение дополнительных двойных связей сопровождается снижением натрийзадерживающего действия у (IV), его исчезновением у производного (III) или извращением у (V). В то же время переход от соединения (I) к соединению (III) приводит к утере калийуретического эффекта и далее к появлению у производных (III) и (VI) калийзадерживающей способности. Эти изменения в биологической активности могут быть связаны с изменением в стереохимии стероидного скелета и боковой цепи, влияющим на взаимодействие стероида с его рецептором, возможно ( $K^+$ ,  $Na^+$ )-зависимой АТР-азой.

Минералокортикоиды (альдостерон, кортексон) по существующим представлениям являются регуляторами водно-солевого обмена у животных и человека [2]. Биосинтез их обычно трактуется как первоначальное 21-гидроксилирование 17 $\beta$ -ацетилстероидов в противоположность 17 $\alpha$ -гидроксилированию, ведущему к образованию глюкокортикоидов [3]. Известно, однако, что некоторая минералокортикоидная активность обычного типа, т. е. способность к задержке воды и ионов натрия и выведению из организма, ионов калия, свойственна и соединениям 17 $\alpha$ -оксипрегнанового ряда, например кортизону [4].

Единой точки зрения на механизм действия минералокортикоидов на молекулярном уровне нет. Высказывается мнение, что он может быть связан с изменением работы Na-насоса, в частности с влиянием на ( $Na^+$ ,  $K^+$ )-зависимую АТР-азу. Однако остается неясным, имеется ли в этом случае прямое влияние стероида (например, альдостерона) на проницаемость мембран, либо это влияние как-то опосредовано через геном и изменение белкового синтеза [5].

\* Сообщение 10 см. [1].

В связи с этим представлялось интересным, во-первых, сопоставить минералокортикоидную активность представителей обеих ветвей биосинтеза кортексона (I) и кортексолона (II), а во-вторых, проследить зависимость такого действия от уплощения стероидного скелета (введение дополнительных двойных связей).



R = H (a); Ac (b); CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH (c); CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COONa (d)

Дегидратация кортексолона (II) проводилась путем нагревания его 3,17,21-триацетата с уксусной кислотой в диметилформамиде (ДМФА) [6], а синтез Δ<sup>1</sup>-соединений (IV) — (VI) — путем дегидрирования ацетатов (Iв) — (IIIв) дихлордигидробензохиноном [7].

Помимо 21-ацетатов (Iв) — (VIв) синтезированы также 21-гемисукцинаты (Iс) — (VIс) и их натриевые соли (Id) — (IIIд), (Vд) (см. табл. 1).

Соединения (IIIв) — (VIв) и (Id) — (IIIд), (Vд) исследованы на минералокортикоидную активность в сравнении с ацетатом кортексона (ДОКА) (Iв) и ацетатом кортексолона (IIв) и на антиминералокортикоидное действие в сравнении со спиронолактоном. В опытах использовали беспородных адrenaлэктомированных крыс-самцов весом 140—180 г. О минералокортикоидном эффекте судили по влиянию соединений на экскрецию ионов натрия и калия с мочой. Вещества вводили через 48 ч после адrenaлэктомии дважды с 3-часовым интервалом. Одновременно с первой инъекцией животным подкожно вводили 5 мл 0,9% раствора хлористого натрия. Двухчасовую порцию мочи получали пункцией мочевого пузыря в условиях предварительной перевязки мочеиспускательного канала, которую производили через 1 ч после второй инъекции соединения. Содержание ионов натрия и калия в моче определяли методом пламенной фотометрии на приборе ФПЛ-1. Антиминералокортикоидную активность оценивали по способности веществ ингибировать минералокортикоидное действие ДОКА [8]. Соединения вводили дважды внутривенно за 18 ч и одновременно с первой инъекцией ДОКА.

Результаты изучения минералокортикоидного действия соединений приведены в табл. 2, из которой видно, что вещества (IVв) и (Id) снижают экскрецию натрия с мочой соответственно на 50 и 40% и существенно не влияют на выведение калия. По эффективности указанные соединения близки к ацетату кортексолона (IIв). ДОКА (Iв) в аналогичных условиях снижает экскрецию натрия примерно на 70% и увеличивает выведение калия на 35%. Соединение (Vв) увеличивает содержание натрия и калия в моче соответственно на 70 и 100%. Вещества (IIIв) и (VIв) приблизительно на 30% снижают экскрецию калия, не влияя на выведение натрия.

## Свойства синтезированных соединений

Соединение	Т. пл., °С (растворитель)	ИК (ν, см <sup>-1</sup> )
Прегн-4-ен-21-ол-3,20-дион (Ia) 21-Гемисульфидат (Ic)	200-203 (ацетон - гексан) (ср. [14])	1625, 1667, 1705, 1748, 3200-3400
Прегн-4-ен-17α, 21-диол-3,20-дион (IIa) 21-Гемисульфидат (IIc)	195-198 (ацетон - гексан)	1615, 1640, 1660, 1715, 1727, 3350-3520
Прегна-4,16-диен-21-ол-3,20-дион (IIIa) 21-Гемисульфидат (IIIc)	204-206 (водн. метанол) 171-173 (водн. ацетон)	1590, 1615, 1667, 1670, 3410-3450 1590, 1620, 1650, 1667, 1684, 1730, 1748, 3200-3450
Прегна-1,4-диен-21-ол-3,20-дион (IVa) 21-Ацетат (IVb) 21-Гемисульфидат (IVc)	182-184 (водн. ацетон) 199-201 (ацетон - гексан) (ср. [7]) 172-175 (ацетон - гексан)	1603, 1630, 1665, 1713, 3400 1605, 1625, 1665, 1723, 1748 1600, 1613, 1630, 1665, 1710, 1725, 1750, 3435
Прегна-1,4-диен-17α, 21-диол-3,20-дион (Va) 21-Ацетат (Vb) 21-Гемисульфидат (Vc)	210-215 (водн. метанол) 224-227 (ацетон - гексан) (ср. [10]) 120/192-194 (водн. метанол)	1610, 1623, 1670, 1723, 3280-3400 1603, 1620, 1660, 1723, 1748, 3280-3400 1605, 1615, 1640, 1715, 1755, 3000-3550
Прегна-1,4,16-триен-21-ол-дион-3,20 (VIa) 21-Ацетат (VIb) 21-Гемисульфидат (VIc)	170-190 (водн. метанол) 190-193 (ацетон - гексан) 208-212 (ацетон - гексан)	1587, 1605, 1623, 1660, 1675, 3420-3460 1587, 1605, 1623, 1660, 1675, 1745 1580, 1615, 1660, 1684, 1723, 1755, 3430-3490

Таблица 2

Влияние соединений при подкожном введении в дозе 2 мг/кг на экскрецию с мочой ионов натрия и калия (в мг за 2 ч) у адреналэктомированных крыс

Вещество	Количество животных в группе	Na	K	Na/K
—	84	1,7±0,08	1,7±0,08	1,1±0,08
Ацетат кортексона (Iв)	96	0,6±0,06 *	2,3±0,1 *	0,2±0,02 *
—	14	1,4±0,2	1,7±0,3	1,1±0,2
Ацетат кортесолона (IIв)	18	0,7±0,09 *	1,4±0,2	0,5±0,09 *
—	15	1,6±0,3	1,6±0,2	0,9±0,1
(IIIв)	15	1,2±0,1	1,1±0,1 *	1,3±0,2
—	16	1,9±0,2	1,5±0,2	1,3±0,3
(IVв)	13	0,9±0,1 *	1,9±0,3	0,8±0,2
—	17	1,2±0,1	1,3±0,1	0,8±0,1
(Vв)	19	2,0±0,3 *	2,8±0,3 *	0,7±0,1
—	9	2,5±0,4	2,4±0,2	1,0±0,1
(VIв)	9	1,8±0,3	1,6±0,3 *	1,2±0,1
—	13	2,4±0,3	2,2±0,2	1,0±0,1
(Id)	17	1,4±0,2 *	2,6±0,4	0,6±0,06 *
—	9	2,5±0,4	2,4±0,2	1,0±0,1
(IIId)	8	1,7±0,3	1,9±0,3	1,0±0,2
(IIIId)	7	1,9±0,3	2,4±0,3	0,8±0,1
—	9	1,6±0,2	2,3±0,2	0,7±0,08
(VId)	8	1,2±0,2	1,8±0,2	0,7±0,2

\* Значения, достоверно отличающиеся от контрольных.

Таблица 3

Влияние соединений при внутрижелудочном введении в дозе 300 мг/кг на экскрецию с мочой ионов натрия и калия (в мг за 2 ч) у адреналэктомированных крыс в условиях совместного введения с ДОКА 2 мг/кг, подкожное введение

Вещество	Количество животных в группе	Na	K	Na/K
—	53	0,5±0,06	3,00±0,4	0,2±0,02
Спиронолактон	55	2,2±0,2 *	1,7±0,1 *	1,5±0,1 *
—	9	0,6±0,1	3,1±0,5	0,2±0,03
(IIIв)	7	0,5±0,2	2,4±0,3	0,2±0,05
—	6	0,4±0,1	1,8±0,3	0,2±0,09
(IVв)	5	1,6±0,3 *	4,3±0,9 *	0,4±0,04 *
—	22	0,4±0,04	3,9±0,8	0,1±0,02
(Vв)	20	1,3±0,1 *	3,5±0,3	0,4±0,04 *
—	16	0,8±0,1	2,4±0,1	0,3±0,04
(VIв)	9	0,5±0,1	3,0±0,3	0,2±0,02
—	10	1,2±0,2	2,4±0,2	0,5±0,05
(Id)	3	0,8±0,2	—	—
(IIId)	5	2,4±0,3 *	3,7±0,7	0,8±0,2
—	16	0,8±0,1	2,4±0,1	0,3±0,04
(IIIId)	9	0,3±0,1 *	3,3±0,5	0,1±0,03 *
—	9	0,3±0,04	2,4±0,2	0,1±0,02
(VId)	6	2,2±0,5 *	3,7±0,6	0,1±0,1 *

Примечание. В контрольной группе приведены значения, полученные при введении ДОКА. Звездочкой отмечены величины, достоверно отличающиеся от контрольных.

В табл. 3 приведены результаты изучения антимицералокортикоидной активности соединений. Из таблицы видно, что способность угнетать натрийзадерживающее действие ДОКА обнаружили соединения (IVb), (Vb), (IIId) и (Vd), которые существенно не отличались по выраженности этого действия от спиронолактона. Вещество (IIIId), напротив, усиливало натрийзадерживающий эффект ДОКА. Ни одно из испытанных веществ в отличие от спиронолактона не угнетало калийуретическую активность ДОКА, а соединение (IVb) даже несколько усиливало ее. Вещество (Id) при внутривенном введении обнаружило высокое токсическое действие ( $L_{D50}$  300 мг/кг).

Введение в молекулу соединений (Ib) и (IVb)  $\Delta^1$ -двойной связи меняет форму кольца A, делая его плоским, и в какой-то степени влияет на геометрию остальной части молекулы. В биологическом плане такое изменение снижает и натрийзадерживающее и калийуретическое действие, делая последнее недостоверным.

С другой стороны, переход от типичного минералокортикоида (Ib) к  $17\alpha$ -оксиганалогу (IIb) практически не сказывается на способности (IIb) задерживать натрий, но полностью снимает калийуретический эффект.

Поскольку тетраэдрический характер C(17)-центра при этом сохраняется и не происходит изменения геометрии скелета, то такое изменение активности можно связать либо с появлением полярной  $17\alpha$ -гидроксильной группы, либо с изменением конформации в самой боковой цепи. Намек на возможную причину может быть найден при переходе от соединения (Ib) к его  $\Delta^{16}$ -аналогу (IIIb). При этом элиминируется  $17\alpha$ -полярный центр, но происходит сильное искажение и скелета и конформации боковой цепи стероида. В результате не только резко падает натрийзадерживающее действие у соединения (IIIb), но и появляется заметный калийзадерживающий эффект.

Сочетание в одной молекуле (VIb) двух  $\Delta^1$ - и  $\Delta^{16}$ -двойных связей, как и следовало ожидать, приводит аддитивно к такому же результату.

На этом фоне непонятным остается результат, обнаруженный для ацетата  $\Delta^1$ -дегидроаналога кортексолона (Vb), показавшего достоверное натрий-калийуретическое действие. Можно предположить, что конформация боковой цепи претерпевает изменение и при переходе от ацетата (IIb) к ацетату (Vb) за счет конформационной трансмиссии. По отношению к иону натрия введение дополнительных двойных связей в молекулы ацетатов кортексона и кортексолона сопровождается снижением натрийзадерживающего действия ( $\Delta^1$ -производные ДОКА), его исчезновением ( $\Delta^{16}$ -производные ДОКА) или извращением ( $\Delta^1$ -производные кортексолона).

Во всех случаях введение 21-гемисукцинатной группы (Id) — (VIId) существенно снижает либо вообще ликвидирует минералокортикоидное действие, очевидно, вследствие исчезновения возможностей для гидрофобного взаимодействия.

Полученные результаты, по-видимому, лучше укладываются в схему непосредственного взаимодействия стероида с АТФ-азой. Причем можно представить, что изменения геометрии субстрата приводят к соответствующим изменениям конформации рецептора в его комплексе с стероидом.

Синтезированные соединения могут явиться интересными моделями для изучения механизма минералокортикоидного действия на молекулярном уровне.

### Экспериментальная часть

Температуры плавления определены на блоке Кофлера. ИК-спектры снимали на приборе UR-10 в таблетке с KBr. Для аналитического контроля за ходом реакций применяли ТСХ на микропластинке с закрепленным слоем силикагеля (дисперсность 5—15 мкм). Найденные данные элементного анализа соответствуют вычисленным.

*Получение 21-ацетата прегна-4,16-диен-21-ол-3,20 диона (IIIв).* Раствор 1,5 г ацетата кортексолона (IIв) и 0,45 г *n*-толуолсульфокислоты в 6 мл уксусного ангидрида нагревали 3 ч при 80°С. Смесь вылили в 50 мл воды, выпавший осадок отфильтровали. Получено 1,6 г 3,17,21-триацетата, раствор 1 г которого в 8 мл сухого диметилформамида нагревали 9 ч с 0,5 г безводного ацетата калия при 105—110°С. Реакционную смесь после охлаждения вылили в холодную воду и отфильтровали выпавший осадок. Получено 0,85 г 3,21-диацетата. Раствор 0,52 г последнего в 12 мл водного этилацетата, содержащего 50 мг *n*-толуолсульфокислоты и 2,5 мл уксусной кислоты, кипятили 4 ч, после чего разбавили водой и отфильтровали выпавший осадок. Получено 0,28 г ацетата (IIIв), т. пл. 152—153°С (из ацетона — гексана) (ср. [9]). ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 1220, 1240, 1590, 1620, 1665, 1680, 1740.

*1,2-Дегидрирование 21-ацетатов (Iв) — (IIIв) с помощью 2,3-дихлор-5,6-дицианбензохинона.* К раствору стероида (0,008 моль) в 75 мл абс. диоксана добавляли дихлордицианбензохинон (0,008 моль) и смесь кипятили 10 ч. После охлаждения выпавший осадок отфильтровывали и промывали на фильтре хлористым метиленом или хлороформом. Фильтрат упаривали досуха, остаток растворяли в том же растворителе и профильтровывали через слой Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (~70 г). Упариванием фильтрата получены  $\Delta^1$ -стероиды (IVв) — (VIв) (см. табл. 1).

*Щелочное омыление 21-ацетатов.* К раствору стероида (0,004 моль) в 150 мл метанола добавляли 5% водный раствор бикарбоната калия (0,015 моль) и оставляли при 20°С на 48 ч. Метанол упаривали в вакууме, остаток разбавляли водой, выпавший осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали. Получены 21-оксистероиды (IIIа) — (VIа) (см. табл. 1).

*Получение 21-гемисукцинатов.* Раствор стероида (0,0029 моль) и янтарного ангидрида (0,0058 моль) в 20 мл сухого пиридина нагревали на водяной бане при 95—98°С в течение 4—10 ч, осуществляя хроматографический контроль. Пиридин упаривали в вакууме, остаток разбавляли водой и выпавший темный осадок отфильтровывали, промывали водой и высушивали.  $\Delta^1$ -Гемисукцинаты очищали продавливанием под азотом через колонку с SiO<sub>2</sub> в системе эфир — гексан — метанол, 16 : 4 : 1. Получены гемисукцинаты (Iс) — (VIс) (см. табл. 1).

*Получение Na-солей 21-гемисукцинатов.* К раствору 21-гемисукцината (0,001 моль) в 25 мл метанола добавляли раствор бикарбоната натрия (0,001 моль в 4 мл воды) и оставляли на 1 ч при 20°С. Метанол и воду упаривали в вакууме. Для полного удаления воды реакционную смесь упаривали несколько раз с абс. бензолом. Остаток обрабатывали абс. диоксаном и выпадающий при этом белый аморфный осадок отфильтровывали. Получены Na-соли 21-гемисукцинатов (Id) — (VIId).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Камерицкий А. В., Игнатов В. Н., Левина И. С., Серебряков Э. П., Никитина Г. В., Корхов В. В. (1977) Хим.-фарм. ж., 10, 96—98.
2. Соффер Л., Дорфман Р., Гебрилов Л. (1966) Надпочечные железы человека, с. 112—124, «Медицина», М.
3. Sharm D. C., Dorfman R. L. (1966) A Generalised Outline of the Metabolism of Steroid Hormones, Holden-Day Inc., San Francisco.
4. Хефтман Э. (1972) Биохимия стероидов, с. 97—113, «Мир», М.
5. Fraser R. (1971) in: The Biochemistry of Steroid Hormone Action (Smellie R. M. S., ed.), pp. 101—127, Acad. Press, London — New York.
6. Salce L., Hazen G. G., Schoenewaldt E. F. (1970) J. Org. Chem., 35, 1681—1682.
7. Kubota T., Yoshida K., Hayashi F., Takeda K. (1965) Chem. pharm. Bull., 13, 50—57.
8. Kagawa C. M., Cella J. A., Van Arman C. G. (1957) Science, 126, 1015—1016.
9. Lehmann H.-G. (1976) Tetrahedron Lett., 987—988.
10. Sakamoto H., Kato M. (1976) Chem. pharm. Bull., 24, 828—831.
11. Sondheimer F., Rosenkranz G., Mancera O. (1958) Патент ФРГ, 1041954.

Поступила в редакцию  
26.XII.1978

BIOLOGICAL ACTIVITY OF TRANSFORMED STEROIDS. 11. ON CORRELATION  
BETWEEN A DEGREE OF MOLECULE FLATNESS  
AND A MINERALOCORTICOID ACTIVITY

KAMERNITZKY A. V., PAVLOVA-GRISHINA N. S., SKOROVA A. V.,  
KAVERINA L. P., KRUGLOVA O. N., TEREKHINA A. I.

*N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow; Institute of Biological Testing of Chemical  
Compounds, S. Kupavna*

Starting from cortexone acetate (I) and cortexolone acetate (II), the  $\Delta^1$ -analogs of (I) and (II) (derivatives (IV) and (V), respectively), the  $\Delta^{16}$ - and  $\Delta^{1,16}$ -analogs of (I) (III and VI), as well as 21-hemisuccinates of all the above compounds were obtained. The compounds were assayed in vivo for mineralocorticoid activity as compared with (I), and for antimineralocorticoid activity in comparison with spironolactone. The addition of extra double bonds resulted in the decrease in sodium retention capacity with (IV), its abolishing with (III) and its inversion with (V). Simultaneously, on passage from (I) to (II) the potassiumuretic effect disappears and is further replaced by the potassium retention action in the case of (III) and (VI). The changes in biological activity may be related to the changes in stereochemistry of steroid skeleton and side chain. These in turn may modify the mode of interaction between steroid and its putative receptor, probably  $K^+$ ,  $Na^+$ -dependent ATP-ase.

---