

ОЗОНОЛИЗ ХОЛЕСТЕРИНА В ПРИСУТСТВИИ ПИРИДИНА

© Ю. В. Легостаева*, Л. Р. Гарифуллина, Э. Р. Нуриева, Н. М. Ишмуратова

Уфимский институт химии УФИЦ РАН

Россия, Республика Башкортостан, 450054 г. Уфа, пр. Октября, 71.

Тел.: +7 (347) 235 60 66.

*Email: insect@anrb.ru

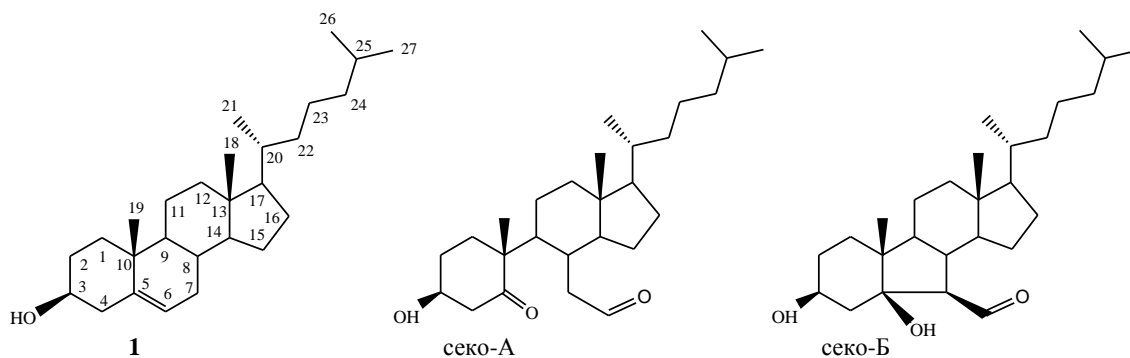
Продукты озонирования холестерина можно рассматривать как возможные биомаркеры некоторых заболеваний, возникающих в результате окисления атеросклеротических бляшек, основным липидным компонентом которых является холестерин. Для создания библиотеки окисленных производных холестерина изучается его озонлиз в различных вариантах. Показано, что озонлиз холестерина в хлористом метиле в присутствии пиридина протекает с образованием 1,2,4-триоксоланового производного, наличие которого в реакционной смеси подтверждено спектроскопией ЯМР. Попытка выделения промежуточного озонида колоночной хроматографией на Al_2O_3 привела к его изомеризации в 3 β -гидрокси-5-оксо-секохолестан-6-овую кислоту.

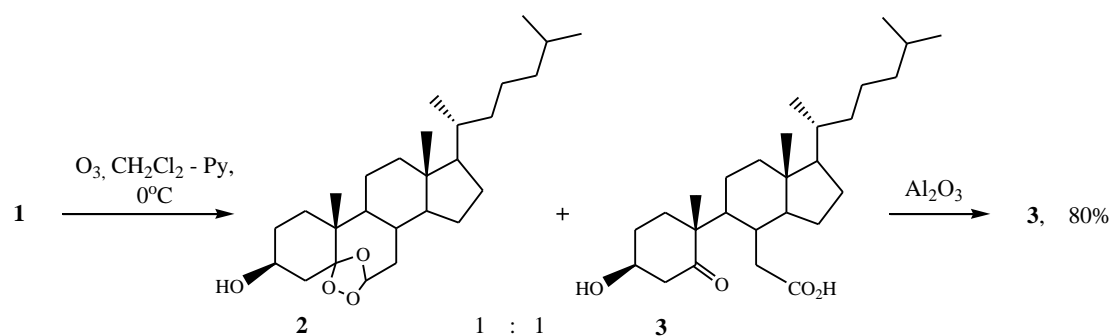
Ключевые слова: холестерин, 3 β -гидрокси-5-оксо-5,6-секохолестан-6-овая кислота, озонлиз, пиридин.

Холестерин **1** – природный полициклический липофильный вторичный одноатомный спирт, входящий в состав липидной структуры клеточных мембран и обеспечивающий их стабильность. Наличие двойной связи в молекуле холестерина определяет его подверженность окислению различными активными формами кислорода, присутствующими в организме. Интерес к озонолитическому окислению холестерина **1** возрос в 2000-х гг., т.к. продукты его озонирования стали рассматриваться как возможные биомаркеры некоторых заболеваний, возникающих в результате окисления атеросклеротических бляшек, основным липидным компонентом которых является холестерин, как озоном, продуцируемым организмом [1–2], так и ингаляционным озоном смога [3]. Для создания библиотеки окисленных производных холестерина изучался его озонлиз в инертных растворителях (гексан, CCl_4) [4], хлористом метиле с последующим восстановлением $Zn/AcOH$ [3], в присутствии этанола [5]. Основным продуктом озонирования енола **1** обычно является 5,6-секостерол – 3 β -гидрокси-5-оксо-5,6-секохолестан-6-аль (секо-А, atheronal A), который в результате внутримолекулярной альдолиза может превращаться в 3 β -гидрокси-5 β -гидрокси-В-норхолестан-6 β -карбоксальдегид (секо-Б, atheronal B) [6–8].

Одним из популярных в современном органическом синтезе вариантов является так называемый «неперекисный» озонлиз, осуществляемый в присутствии соединений – акцепторов пероксидного кислорода (третичных аминов, amino-*N*-оксидов, пиридина) [9]. Целью данной работы является изучение озонолитических превращений холестерина **1** в присутствии пиридина.

При озонировании холестерина **1** в CH_2Cl_2 в присутствии 3.5 мольных экв. пиридина при 0 $^{\circ}C$ была получена смесь (1:1) озонида **2** и продукта его разложения – кетокислоты **3**, что было установлено спектроскопией ЯМР. В спектрах ЯМР ^{13}C наряду с удвоенными сигналами холестанового скелета присутствуют химические сдвиги 102 и 112 м.д., соответствующие атомам углерода триоксоланового фрагмента, а также 208 и 174 м.д., характерные, соответственно, для кето- и карбоксильного атомов углерода. Соотношение соединений **2** и **3** в реакционной смеси определяли сопоставлением интегральной интенсивности протонов CHO и CO_2H в спектрах ЯМР 1H . Попытка разделения этой смеси колоночной хроматографией на Al_2O_3 привела к разложению озонида **2**: в индивидуальном виде была выделена 3 β -гидрокси-5-оксо-секохолестан-6-овая кислота **3**.





При изучении цитотоксических эффектов различных оксистеролов на нескольких культурах клеток было установлено, что продукты озонлиза холестерина (секо-А, секо-Б и их кислотные производные, в том числе и кислота **3**), обладают более высокой цитотоксической активностью по сравнению с основными эндогенными оксистеролами, такими как 5β,6β-эпоксистерин, 7β-гидроксихолестерин, 7-кетохолестерин и 25-гидроксихолестерин [10].

Экспериментальная часть

В работе использовали оборудование Центра коллективного пользования «Химия» УФИХ УФИЦ РАН. ИК спектры записывали на приборе IR Prestige-21 (Fourier Transform Spectrophotometer – Shimadzu) в тонком слое. Спектры ЯМР регистрировали на спектрометре Bruker AM-500 (рабочие частоты 500.13 МГц (1H), 125.47 МГц (^{13}C)) в $CDCl_3$, внутренний стандарт – TMS. Контроль методом ТСХ проводили на SiO_2 марки Sorbfil (Россия). Использовали холестерин марки «Sigma-Aldrich» (CAS 57-88-5, чистота $\geq 92.5\%$ (ГЖХ)). Для колонной хроматографии применяли Al_2O_3 для хроматографии II степени активности ООО «Хром-Лаб» (Россия). Производительность озонатора 40 ммоль $O_3/ч$.

3β-Гидроксис-5-оксо-секохолестан-6-овая

кислота 3. Через раствор 1.0 г (2.6 ммоль) холестерина **1** в смеси 20 мл CH_2Cl_2 и 0.7 мл (9.1 ммоль) Pu при $0^\circ C$ барботировали озон-кислородную смесь до исчезновения исходного енола **1** (контроль ТСХ). После упаривания получили 1.1 г смеси, содержащей, по данным ЯМР 1H и ^{13}C , озонид **2** (сигналы идентичны описанным в [3]) и кетокислоту **3**. После хроматографирования реакционной смеси (Al_2O_3 , петролейный эфир – $CHCl_3$, 10:1, 2:1) выделили 0.9 г (80%) кетокислоты **3**. R_f 0.14 (петролейный эфир–*трет*-бутилметиловый эфир, 2:1). ИК спектр (KBr, ν , cm^{-1}): 1706 (C=O), 1720 (C=O), 3330 (OH). Спектр ЯМР 1H : 0.65 (с, 3H, CH_3^{18}), 0.85 (д, 6H, J 6.5, $2CH_3^{26,27}$), 0.89 (д, 3H, J 6.4, CH_3^2), 1.15 (с, 3H, CH_3^{19}), 4.00–4.15 (м, 1H, CH^3), 5.30 (уш.с, 1H, OH), 9.20 (уш.с, 1H, COOH). Спектр ^{13}C -ЯМР: 11.94 (к, $C^{18}H_3$), 18.57 (к, $C^{21}H_3$), 19.39 (к, $C^{19}H_3$), 22.51 (к, $C^{26}H_3$), 22.77 (к, $C^{27}H_3$), 23.71 (т, $C^{11}H_2$), 24.05 (т, $C^{23}H_2$), 24.35 (т, $C^{15}H_2$), 27.56

(д, $C^{25}H_2$), 27.72 (т, $C^{16}H_2$), 28.10 (т, C^2H_2), 33.43 (д, C^8H), 33.56 (т, C^1H_2), 35.68 (д, $C^{20}H$), 35.92 (т, $C^{22}H_2$), 39.13 (т, $C^{24}H_2$), 39.79 (с, C^{10}), 39.83 (т, $C^{12}H_2$), 41.67 (с, $C^{13}H_2$), 42.39 (т, C^4H_2), 44.34 (т, C^7H_2), 47.67 (д, C^9H), 54.82 (д, $C^{14}H$), 56.03 (д, $C^{17}H_2$), 72.97 (д, CH^3OH), 168.99 (с, C^6OOH), 200.87 (с, C^5O).

Работа выполнена при финансовой поддержке программы РАН «Фундаментальные основы химии», тема №8 ««Хемо-, регио- и стереоселективные превращения терпеноидов, стероидов и липидов в направленном синтезе низкомолекулярных биорегуляторов» (№ госрегистрации АААА-А17-117011910023-2, 2017 г.).

ЛИТЕРАТУРА

- Wentworth P., Nieva J., Takeuchi C., Galve R., Wentworth A. D., Dilley R. B., DeLaria G. A., Saven A., Babor B. M., Janda K. D., Eschenmoser A., Lerner R. A. Evidence for ozone formation in human atherosclerotic arteries // *Science*. 2003. V. 302. P. 1053–1056.
- Tomono S., Miyoshi N., Shiokawa H., Iwabuchi T., Aratani Ya., Higashi T., Nukaya H., Ohshima H. Formation of cholesterol ozonolysis products in vitro and in vivo through a myeloperoxidase-dependent pathway // *Journal of Lipid Research*. 2011. V. 52. P. 87–97.
- Wang K., Bermudez E., Pryor W. A. The ozonation of cholesterol: separation and identification of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization products of 3β-hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al // *Steroids*. 1993. V. 58. P. 225–229.
- Jaworski K., Smith L. L. Ozonization of Cholesterol in Nonparticipating Solvents // *J. Org. Chem*. 1988. V. 53. P. 545–554.
- Tagiri-Endo M., Nakagawa K., Sugawara T., Ono K., Miyazawa T. Ozonation of cholesterol in the presence of ethanol: identification of a cytotoxic ethoxyhydroperoxide molecule // *Lipids*. 2004. V. 39. P. 259–264.
- Takeuchi C., Galve R., Nieva J., Witter D. P., Wentworth A. D., Troseth R. P., Lerner R. A., Wentworth P. Proatherogenic effects of the cholesterol ozonolysis products, atheronal-A and atheronal-B // *Biochemistry*. 2006. 45. P. 7162–7170.
- Windsor K., Genaro-Mattos Th. C., Miyamoto S., Stec D. F., Kim H.-Yo. H., Tallman K. A., Porter N. A. Assay of protein and peptide adducts of cholesterol ozonolysis products by hydrophobic and click enrichment methods // *Chem. Res. Toxicol.* 2014. 27. P. 1757–1768.
- Brinkhorst J., Nara S. J., Pratt D. A. Hock cleavage of cholesterol 5R-hydroperoxide: an ozone-free pathway to the cholesterol ozonolysis products identified in arterial plaque and brain tissue // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. 130. P. 2224–2225.
- Ишмуратов Г. Ю., Легостаева Ю. В., Боцман Л. П., Толстиков Г. А. Превращения перекисных продуктов озонлиза олефинов // *Ж. орган. химии*. 2010. Т. 46. №11. С. 1591–1617.
- Tomono S., Yasue Yu., Miyoshi N., Ohshima H. Cytotoxic effects of secosterols and their derivatives on several cultured cells // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013. V. 77. 3. P. 651–653.

Поступила в редакцию 18.09.2018 г.

OZONOLYSIS OF CHOLESTEROL IN THE PRESENCE OF PYRIDINE

© Yu. V. Legostaeva*, L. R. Garifullina, E. R. Nurieva, N. M. Ishmuratova

*Ufa Institute of Chemistry, RAS
71 Oktyabrya Avenue, 450054 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.**Phone: +7 (347) 235 60 66.***Email: insect@anrb.ru*

Cholesterol is a natural polycyclic secondary monohydric alcohol that is part of the lipid structure of cell membranes and ensures their stability. The presence of a double bond in the cholesterol molecule determines its susceptibility to oxidation by various active forms of oxygen present in the body. Cholesterol ozonation products can be considered as possible biomarkers of certain diseases caused by oxidation of atherosclerotic plaques, the main lipid component of which is cholesterol. To create a library of derivatives of oxidized cholesterol, various types of its ozonolysis were studied. One of the most popular variants in modern organic synthesis is “non-peroxide” ozonolysis carried out in the presence of peroxide-acceptor compounds. Ozonolysis of cholesterol in methylene chloride in the presence of pyridine produces the 1,2,4-trioxolane derivative, the presence of which in the reaction mixture was confirmed by NMR spectroscopy. An attempt to isolate the intermediate ozonide by column chromatography (Al_2O_3) resulted in its decomposition to 3 β -hydroxy-5-oxo-secocholestane-6-oic acid.

Keywords: cholesterol, 3 β -hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestane-6-oic acid, ozonolysis, pyridine.

Published in Russian. Do not hesitate to contact us at bulletin_bsu@mail.ru if you need translation of the article.

REFERENCES

1. Wentworth P., Nieva J., Takeuchi C., Galve R., Wentworth A. D., Dilley R. B., DeLaria G. A., Saven A., Babior B. M., Janda K. D., Eschenmoser A., Lerner R. A. *Science*. 2003. Vol. 302. Pp. 1053–1056.
2. Tomono S., Miyoshi N., Shiokawa H., Iwabuchi T., Aratani Ya., Higashi T., Nukaya H., Ohshima H. *Journal of Lipid Research*. 2011. Vol. 52. Pp. 87–97.
3. Wang K., Bermudez E., Pryor W. A. *Steroids*. 1993. Vol. 58. Pp. 225–229.
4. Jaworski K., Smith L. L. *J. Org. Chem.* 1988. Vol. 53. Pp. 545–554.
5. Tagiri-Endo M., Nakagawa K., Sugawara T., Ono K., Miyazawa T. *Lipids*. 2004. Vol. 39. Pp. 259–264.
6. Takeuchi C., Galve R., Nieva J., Witter D. P., Wentworth A. D., Troseth R. P., Lerner R. A., Wentworth P. *Biochemistry*. 2006. 45. Pp. 7162–7170.
7. Windsor K. *Chem. Res. Toxic.* 2014. 27. Pp. 1757–1768.
8. Brinkhorst J., Nara S. J., Pratt D. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2008. 130. Pp. 2224–2225.
9. Ishmuratov G. Yu., Legostaeva Yu. V., Botsman L. P., Tolstikov G. A. *Zh. organ. khimii*. 2010. Vol. 46. No. 11. Pp. 1591–1617.
10. Tomono S., Yasue Yu., Miyoshi N., Ohshima H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013. Vol. 77. 3. Pp. 651–653.

Received 18.09.2018.