



УДК 547.854:615.017

СИНТЕЗ И ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА ГЕПАТОПРОТЕКТНЫХ СВОЙСТВ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНОВОГО РЯДА

© 2017 г. А. Б. Выштакалюк^{*,#}, В. Э. Семенов^{*,#}, В. В. Зобов^{*,**}, И. В. Галяметдинова^{*}, Л. Ф. Гумарова^{*}, А. А. Парфенов^{*}, Н. Г. Назаров^{*,**}, О. А. Ленина^{*}, С. А. Кондрашова^{*}, Ш. К. Латыпов^{*}, Г. В. Черепнев^{*,**}, М. С. Шашин^{*}, В. С. Резник^{*}

^{*}Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН,
420088, Республика Татарстан, г. Казань, ул. Арбузова, 8

^{**}Казанский государственный (Приволжский) университет

Поступила в редакцию 03.10.2016 г.

Принята к печати 08.12.2016 г.

На основе действующего вещества лекарственного средства Ксимедон (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-*N*-(2-гидроксиэтил)пиримидона-2), далее пиримидин (I), синтезированы новые производные с биогенными кислотами, а именно янтарной, *L*-аскорбиновой, *para*-аминобензойной, никотиновой, *L*-2-амино-4-(метилтио)бутановой (*L*-метионином) кислотами. Исследованы параметры острой токсичности ЛД₅₀, в качестве первичной оценки гепатопротекторных свойства исследован антитоксический эффект соединений при токсическом поражении гепатотропным ядом четыреххлористым углеродом. Установлено, что синтезированные соединения по токсикологической безопасности относятся к III и IV классам (умеренно и малотоксичных соединений). Наименее токсичны конъюгаты пиримидина (I) с аскорбиновой кислотой и метионином (ЛД₅₀ более 5400 мг/кг). Пиримидин (I) и его производные обладают антитоксическим действием при остром отравлении четыреххлористым углеродом, т.к. при сочетанном введении крысам четыреххлористого углерода и пиримидина (I) или его производных повышается выживаемость животных и нормализуются интегральные функциональные параметры – масса и температура тела, сниженные в условиях токсического поражения. Кроме того, под действием пиримидина (I) и его некоторых производных (конъюгаты с аскорбиновой, янтарной, *para*-аминобензойной и никотиновой кислотами) наблюдается снижение весовых коэффициентов печени и почек (масса органов по отношению к массе тела) и активностей трансаминаз – маркеров цитолиза гепатоцитов, которые повышаются при токсическом поражении четыреххлористым углеродом. Под действием пиримидина (I) и его новых производных (конъюгатов с аскорбиновой, янтарной и никотиновой кислотами) уменьшается площадь патологических поражений печени стеатозом и некрозом в 2–3 раза. Выявлены преимущества пиримидина (I) и его новых производных по сравнению с лекарственным препаратом гепатопротектором Тиотриазолином.

Ключевые слова: пиримидины, Ксимедон, гепатопротекторы, заболевания печени, токсический гепатит.

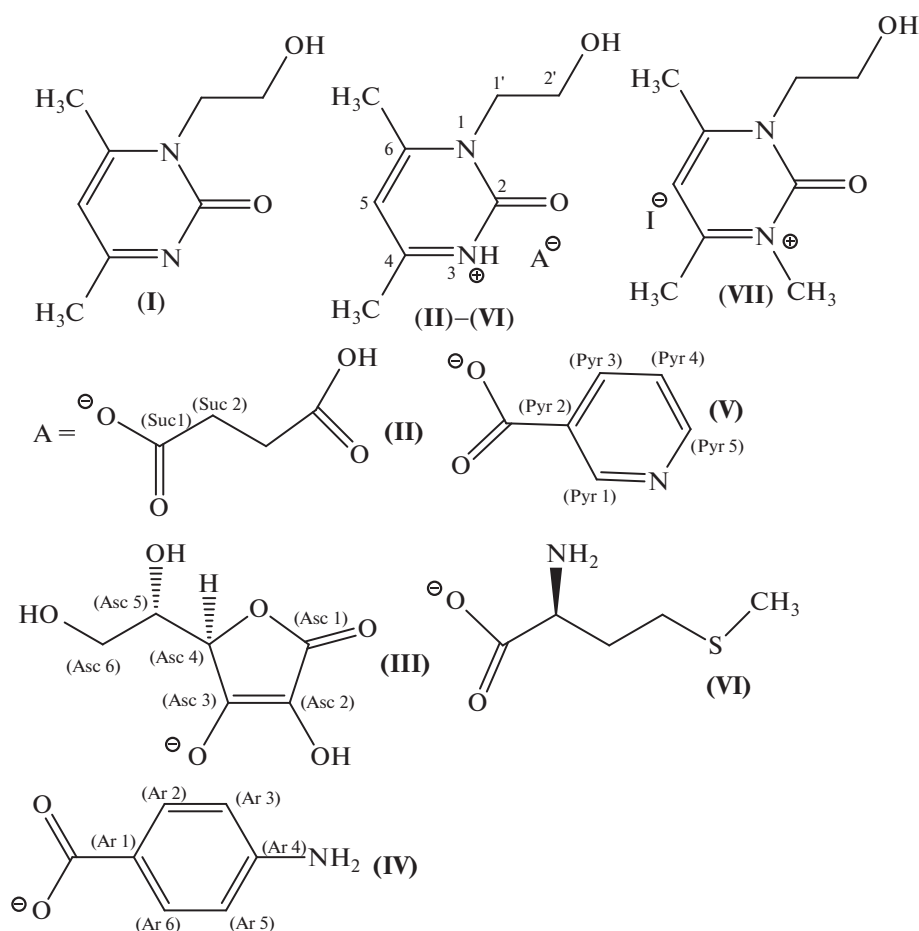
DOI: 10.7868/S0132342317040170

По данным Всемирной Организации Здравоохранения в мире более 2 миллиардов человек страдают различными заболеваниями печени. Сложившаяся ситуация требует все более частого назначения гепатопротекторов, основной функцией которых является профилактика и лечение клеток печени от повреждений, индуцированных гепатотоксинами. В связи с этим поиск гепатопротекторов – это одна из приоритетных задач отечественного здравоохранения.

Сокращения: ЛД₅₀ – доза, вызывающая гибель 50% животных; АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспартат-аминонотрансфераза.

[#] Авторы для связи (тел.: +7 (917) 229-34-85; факс: +7 (843) 273-22-53; эл. почта: alex.vysh@mail.ru; sve@iopc.ru).

Производные пиримидина привлекают внимание как потенциальные гепатопротекторы благодаря их свойству стимулировать регенерацию тканей. Среди производных пиримидина способность проявлять гепатопротекторные свойства установлена для препарата Оксиметилурацил (2-метил-4-амино-6-оксипиримидин) [1]. Ранее нами показана перспективность одного из производных пиримидина, а именно действующего вещества лекарственного средства Ксимедон-1,2-дигидро-4,6-диметил-1-*N*-(2-гидроксиэтил)пиримид-2-она (соединение (I) на рисунке), а также его *L*-аскорбата (соединение (II) на рисунке), для которых выявлена способность повышать адаптационные резервы организма в стрессовых условиях повышенных физических нагрузок в тесте “принудительное



Ксимедон (I) и его производные (II)–(VII). Приведена нумерация атомов соединений.

плавание” [2] и стимулировать восстановление печени при токсическом поражении четыреххлористым углеродом [3, 4]. Кроме того, показано [5, 6], что производные пиридина на основе Ксимедона обладают нейропротекторным действием, оказывая положительное влияние на регенерацию ткани спинного мозга при травме.

Данное исследование направлено на изучение гепатопротекторного действия новых производных действующего вещества (I) лекарственного средства Ксимедон, его солеподобных конъюгатов с биогенными кислотами, а именно: янтарной, *L*-аскорбиновой, *para*-аминобензойной, никотиновой, *L*-2-амино-4-(метилтио)бутановой (*L*-метионином) кислотами – (соединения (II)–(VI) соответственно, на рисунке). Кроме того, в ряд исследуемых соединений включено соединение (VII), в котором атом N пиридинового кольца алкилирован метильной группой (рисунок). Мы предполагаем, что конъюгирование производного пиридина (I) с биогенными кислотами усилит его гепатопротекторные свойства и позволит получить новые средства для защиты печени. В данном исследовании проведена

первичная оценка гепатопротекторных свойств (антитоксическое действие веществ при токсическом поражении четыреххлористым углеродом) синтезированных соединений (II)–(VII) в сравнении с пиридином (I) и лекарственным препаратом гепатопротектором Тиотриазолин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конъюгаты (II)–(VI) (рисунок) получали нагреванием смеси пиридина (I) и соответствующей кислоты в спирте или воде.

Структура соединений (II)–(VI) установлена с помощью ряда гомо- и гетерокорреляционных ЯМР-экспериментов (2D ¹H-¹H-COSY, 2D ¹H-¹³C-HSQC/HMBC, ¹³C, DEPT) и ИК-спектроскопии, а состав – данными элементного состава. В спектрах ЯМР ¹H и ¹³C соединений (II)–(VI) присутствуют резонансные сигналы как пиридинового фрагмента, так и фрагмента кислоты. ИК-спектры соединений (II)–(VI) практически аддитивны спектрам пиридина (I) и соответствующей кислоты. Проведены также рент-

Таблица 1. Параметры острой токсичности (ЛД₅₀) исследуемых соединений и используемые дозы для крыс

Соединения	ЛД ₅₀ , мыши, в/б, мг/кг	Доза, 1/300 от ЛД ₅₀ , мг/кг
Тиотриазолин	5890	20.0
(I) Ксимедон	Более 6500	20.0
(II)	827 (616–1242)	3.0
(III)	5427 (3690–7023)	20.0
(IV)	1686 (1409–1943)	6.0
(V)	1909 (1804–2172)	6.0
(VI)	5459 (4313–7264)	20.0
(VII)	1800	6.0

гендифракционные исследования некоторых из полученных конъюгатов, результаты которых будут опубликованы в последующих сообщениях.

Для оценки перспективности новых синтезированных соединений – производных пиримидина (I) в качестве гепатопротекторов, проведен первичный скрининг, в соответствии с методикой, приведенной в работе [7]. Первым этапом отбора соединений для изучения гепатопротекторных свойств является исследование параметров острой токсичности. В настоящей работе острую токсичность исследовали на беспородных белых мышах массой 18–25 г при внутрибрюшинном (в/б) введении. Тестируемые соединения вводили мышам в водных растворах в 4–5 возрастающих дозах, в каждой группе было по 4–6 животных. Статистический расчет полулетальной дозы ЛД₅₀ проведен в программе “R” version 2.13.0 (2011-04-13). По показателям ЛД₅₀ (табл. 1), в соответствии с работой [8], большинство исследуемых соединений можно отнести к III–IV, а соединения (III) и (VI) – к VI классу токсичности. Таким образом, по параметрам острой токсичности, в соответствии с работой [7], все синтезированные соединения могут представлять потенциальный интерес для изучения гепатопротекторной активности.

Исследование гепатопротекторных свойств синтезированных производных пиримидина проведено на беспородных половозрелых белых крысах обоего пола (самцы массой 250–350 г, самки массой 200–300 г). Общее количество животных в каждой группе было 10–11 особей. Исследуемые соединения с профилактической целью вводили животным в/б в течение 11 дней в дозах, составляющих 1/300 от ЛД₅₀ (табл. 1). В качестве эталонного вещества-сравнения взят гепатопротектор Тиотриазолин. Влияние веществ в данных дозах на клиническое состояние здоровых животных оценивали по изменению массы за 11-дневный период введения соединений до начала индукции токсического поражения. Начиная с 12-го дня, в

течение 3 дней, индуцировали токсическое поражение печени на фоне введения исследуемых соединений, согласно работе [7].

В результате исследования было показано, что в контрольной группе, не получавшей лечения, в результате затравки выжило около 84% животных (16 особей из 19). Наиболее высокий показатель выживаемости (100%) в условиях затравки CCl₄, отмечался в группах, которым вводили соединения (V), пиримидин (I) и Тиотриазолин. В группах, которым вводили соединения (II) и (IV), показатель выживаемости был ниже (90–92%), но все же превосходил показатель для контрольной группы (табл. 2). Поскольку полученные изменения показателей выживаемости животных были статистически не достоверны по сравнению с контрольной группой животных (критерий χ^2), следует говорить лишь о тенденции к проявлению данного антитоксического эффекта при отравлении четыреххлористым углеродом. В остальных группах показатель выживаемости не отличался от контроля.

Исследование массы животных за период курсового введения исследуемых соединений показало, что введение исследуемых соединений в дозах 1/300 от ЛД₅₀ в течение 11 дней не оказывало отрицательного влияния на динамику изменения массы тела, клиническое состояние животных было в норме. В группе, которой вводили соединения (VI) (доза 20 мг/кг, самцы) наблюдали статистически значимое увеличение средней массы крыс на 11.5 ± 6.6 г ($p < 0.05$) на 8-й день введения. Причем масса тела, превышающая исходные значения на 14.2 ± 7.3 г, сохранялась вплоть до третьей затравки CCl₄. Аналогичное действие выявлено для соединения (VII). Под его влиянием увеличение массы животных наблюдали на 4-й день введения на 7.4 ± 3.6 г ($p < 0.05$). Более высокие значения массы тела, превышающие исходный уровень на 12.4 ± 5.9 г, также наблюдались в этой группе даже после второго введения CCl₄. В остальных опытных группах, которым вводили исследуемые препараты (Тиотриазолин, пиримидин (I), соединения (II)–(V) и (VII)), а также в контроле, статистически значимого изменения массы тела за 11 дней введения препаратов не выявлено ($p > 0.05$).

При затравке CCl₄ у самцов контрольной группы наблюдали потерю массы на 24.1 ± 10.9 г после второго и третьего введения CCl₄. Различия с исходными значениями массы статистически достоверны ($p < 0.05$). У самок в результате воздействия CCl₄ статистически значимые изменения массы не выявлены.

Сохранение массы тела животными, отсутствие различий с исходными значениями или уменьшение потери массы использовано нами в качестве одного из критериев антитоксического

Таблица 2. Анализ антитоксического эффекта производных пиримидинового ряда относительно токсического поражения

Используемые вещества и воздействие	Выжило		Температура тела за время введения CCl ₄ , °C					Снижение массы тела при введении ЧХУ, г	
	%	число особей	исходная	после 1 введения	после 2-го введения	после 3-го введения	самцы	самки	
Интактные (без воздействия)	100	15/15	38.84 ± 0.07	38.40 ± 0.21 <i>p</i> < 0.001	38.77 ± 0.32 <i>p</i> < 0.001	38.26 ± 0.20 <i>p</i> < 0.001	—	—	
Контроль: H ₂ O + CCl ₄	84.2	16/19	38.59 ± 0.14	36.09 ± 0.38	35.35 ± 0.23	33.19 ± 0.17	24.1 ± 10.9*	Нет (<i>p</i> > 0.05)	
Тиотриазолин + CCl ₄	100	11/11	38.66 ± 0.16	35.73 ± 0.43	35.27 ± 0.28	33.55 ± 0.34	Нет (<i>p</i> > 0.05)	Нет (<i>p</i> > 0.05)	
Пиримидин (I) (Ксимедон) + CCl ₄	100	11/11	38.10 ± 0.38	36.59 ± 0.32	35.87 ± 0.28	34.65 ± 0.41 <i>p</i> < 0.001	Нет (<i>p</i> > 0.05)	Нет (<i>p</i> > 0.05)	
(II) 3.0 мг/кг в/б + CCl ₄	92.3	12/13	38.43 ± 0.16	35.72 ± 0.38	35.66 ± 0.37	33.85 ± 0.24 <i>p</i> < 0.05	19.0 ± 2.6*	12.0 ± 5.7*	
(III) 20.0 мг/кг + CCl ₄	81.8	9/11	38.32 ± 0.26	36.17 ± 0.44	35.64 ± 0.31	34.76 ± 0.47 <i>p</i> < 0.001	Нет (<i>p</i> > 0.05)	Нет (<i>p</i> > 0.05)	
(IV) 6.0 мг/кг в/б + CCl ₄	90.9	10/11	38.48 ± 0.16	36.11 ± 0.34	35.59 ± 0.40	33.86 ± 0.39	16.0 ± 3.2*	Нет (<i>p</i> > 0.05)	
(V) 6.0 мг/кг в/б + CCl ₄	100	11/11	38.24 ± 0.27	36.42 ± 0.27	35.56 ± 0.27	34.61 ± 0.41 <i>p</i> < 0.01	Нет (<i>p</i> > 0.05)	Нет (<i>p</i> > 0.05)	
(VI) 20.0 мг/кг в/б + CCl ₄	72.7	8/11	38.27 ± 0.15	36.28 ± 0.19	35.45 ± 0.25	33.66 ± 0.26	Нет (<i>p</i> > 0.05)	—	
(VII) 6.0 мг/кг в/б + CCl ₄	81.8	9/11	37.80 ± 0.27**	35.95 ± 0.26	35.20 ± 0.40	34.70 ± 0.29 <i>p</i> < 0.001	Нет (<i>p</i> > 0.05)	—	

Приведены средние и стандартные ошибки средних (*M* ± *m*); Жирным шрифтом выделены значения, показывающие улучшение исследованных соединений по сравнению с контролем ЧХУ.

Статистическую значимость различий значений температур между контрольной и опытными выборками определяли по *t*-тесту для независимых выборок (критерий Стьюдента) для объединенных выборок самцов и самок.

* Приведены цифровые значения величины снижения массы крыс в период затравки ЧХУ в сравнении с исходной массой на момент начала опыта, и статистическая значимость данных различий при *p* < 0.05, расчет по непараметрическому тесту Вилкоксона.

эффекта исследуемых соединений при токсическом поражении CCl_4 .

Аналогично контролю, в большинстве опытных групп, у самок за период затравки CCl_4 статистически значимых изменений массы не наблюдалось, поэтому анализ влияния соединений на данный показатель проведен по самцам.

Среди исследованных веществ, под действием которых средняя масса тела у самцов при токсическом воздействии CCl_4 сохранялась на уровне исходных значений, были Тиотриазолин, Ксимедон, а из новых производных пиримидина – соединения (III), (V), (VI) и (VII). В группах, которым вводили соединения (II) и (IV), масса тела после 2-го и 3-го введения CCl_4 снизилась, причем при введении соединения (II) снижение массы наблюдалось не только у самцов, но и у самок, а для соединения (IV) эффект был заметен уже после 1-го введения CCl_4 . Величины снижения массы тела у самцов в обеих группах были меньше, чем в контроле (табл. 2).

Исследование температуры тела у животных в период сочетанного введения тестируемых соединений и CCl_4 показало, что в контрольной группе в результате токсического воздействия выявляется прогрессирующее снижение температуры тела с $38.6^\circ C$ (до затравки) до $33.2^\circ C$ (на следующий день после последнего введения CCl_4), причем наиболее существенное снижение температуры было характерно для терминальной стадии отравления животных, предшествующей летальному исходу (табл. 2). Поэтому снижение температуры тела у животных было принято в качестве одного из критериев оценки токсического поражения CCl_4 . И, соответственно, уменьшение снижения температуры под действием исследуемых соединений – в качестве одного из критериев антитоксического действия.

При сочетанном введении исследуемых соединений и CCl_4 снижение температуры тела наблюдалось во всех группах, причем после 1-го и 2-го введения существенных различий между группами не было выявлено. После 3-го введения CCl_4 в контрольной группе снижение температуры было наиболее выраженным, и в этот же период отмечались наиболее существенные различия динамики изменения температуры между опытными и контрольной группами. Наиболее высокие значения температуры тела после 3-го введения CCl_4 ($34.76 \pm 0.47^\circ C$) были в группе, которой вводили соединение (III) (различия с контролем статистически достоверны при $p < 0.001$). Среди остальных исследованных соединений статистически достоверное положительное влияние на данный показатель оказали вещества (в порядке убывания эффекта): (VII), (I), (V) (табл. 2). Статистически достоверные различия температуры тела на 3-й день

введения CCl_4 ($p < 0.05$, t -тест для независимых выборок) по сравнению с контрольной группой выявлены также в группе, которой вводили соединение (II). Значения температуры в этой группе были $33.85 \pm 0.24^\circ C$. На том же уровне средняя температура тела после 3-го введения CCl_4 ($33.86 \pm 0.39^\circ C$) была в группе, которой вводили соединение (IV), но различия с контролем были статистически не достоверными (табл. 2).

Результаты исследования массы печени по отношению к массе тела показали, что под влиянием CCl_4 в 1.4 раза увеличивается масса печени, в 1.6 раз увеличивается масса левой и правой почки. Данные различия с референтными значениями интактных животных статистически достоверны при $p < 0.001$ (t -тест Стьюдента). В группах, которым вводили исследованные соединения производные пиримидина, относительная масса печени уменьшалась по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует об уменьшении патологических изменений и нормализации функции органа (табл. 3). Некоторые из исследованных соединений, кроме снижения относительной массы печени, вызывали снижение относительной массы почек. Это соединения (IV), (V), (VII), а также пиримидин (I) и Тиотриазолин. Сравнение выборок показателей относительной массы органов с контрольной группой показало, что по t -тесту Стьюдента различия статистически не достоверны.

При исследовании биохимических показателей в контрольной группе, которой не вводили с профилактической целью каких-либо препаратов, наблюдали повышение маркеров поражения печени АЛТ и АСТ в 7.4 и 7.7 раз соответственно (табл. 3). Среди исследованных соединений активными по отношению к маркерам цитолиза гепатоцитов оказались вещества (II), (IV) и (VII), под действием которых при данной схеме воздействия наблюдали снижение уровня трансминаз: АЛТ в 1.5–2.4 раза и АСТ на 15–60% по сравнению с контрольной группой, что указывает на их гепатопротекторную активность и преимущества по сравнению с препаратом сравнения Тиотриазолином и исходным веществом (I). Морфометрические исследования показали, что в контроле площадь поражений составила $36.30 \pm 2.71\%$, при введении пиримидина (I) $19.08 \pm 5.09\%$, (II) – $22.07 \pm 2.53\%$, (III) – 15.89 ± 2.16 , (IV) – $31.40 \pm 7.11\%$, (V) – $24.03 \pm 3.17\%$, (VI) – $38.14 \pm 2.25\%$, (VII) – $35.94 \pm 6.78\%$, Тиотриазолина $33.19 \pm 3.51\%$. Соединения, при введении которых наблюдали наименьшую площадь поражений печени, статистически значимо отличающуюся от контроля, были: пиримидин (I), (II), (III) и (V). Наиболее выраженное уменьшение площади поражения, меньшее по сравнению с пиримидином (I) на 17%, отмечалось при введении соединения (III).

Таблица 3. Влияние соединений и затравки ЧХУ на весовые коэффициенты печени и почек и биохимические маркеры цитолиза у крыс

Используемые вещества и воздействие	Печень, % от массы тела	Левая почка, % от массы тела	Правая почка, % от массы тела	АЛТ, U/L	АСТ, U/L	Площадь поражений печени, %
Интактные (нет воздействия)	2.98 ± 0.14	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.01	39.9 (33.9–47.6)	85.4 (73.2–105.0)	0.00 ± 0.00
Контроль: H ₂ O + ЧХУ	4.26 ± 0.15 ¹	0.47 ± 0.02 ¹	0.50 ± 0.02 ¹	296.6 ¹ (178.9–652.8)	659.4 ¹ (421.4–1392.2)	36.30 ± 2.71 ¹
Тиотриазолин 20.0 мг/кг в/б + ЧХУ	3.96 ± 0.17¹	0.44 ± 0.02¹	0.46 ± 0.02¹	590.9 ¹ (151.3–879.9)	715.5 ¹ (449.9–1807.0)	33.19 ± 3.51 ¹
Пиримидин (I) (Ксимедон) 20.0 мг/кг в/б + ЧХУ	4.01 ± 0.16¹	0.44 ± 0.02¹	0.46 ± 0.02¹	591.2 ¹ (334.0–1522.5)	1572.4 ¹ (669.2–2187.0)	19.08 ± 5.09^{1,2}
(II) 3.0 мг/кг в/б + ЧХУ	3.99 ± 0.15¹	0.47 ± 0.02 ¹	0.48 ± 0.02 ¹	192.8¹ (120.1–307.1)	519.9¹ (417.9–709.6)	22.07 ± 2.53^{1,2}
(III) 20.0 мг/кг в/б + ЧХУ	3.88 ± 0.22¹	0.46 ± 0.04 ¹	0.47 ± 0.04 ¹	1189.3 ¹ (227.2–1993.0)	755.4 ¹ (592.8–1389.1)	15.89 ± 2.16^{1,2}
(IV) 6.0 мг/кг в/б + ЧХУ	3.75 ± 0.21¹	0.42 ± 0.02¹	0.44 ± 0.02¹	122.3^{1,2} (110.4–308.6)	564.5¹ (430.5–1388.3)	31.40 ± 7.11 ¹
(V) 6.0 мг/кг в/б + ЧХУ	4.20 ± 0.19 ¹	0.43 ± 0.02¹	0.43 ± 0.02¹	421.1 ¹ (168.4–884.1)	772.8 ¹ (691.9–1038.3)	24.03 ± 3.17^{1,2}
(VI) 20.0 мг/кг в/б + ЧХУ	3.81 ± 0.24¹	0.47 ± 0.05 ¹	0.49 ± 0.05 ¹	254 (159–614.3)	3654 ^{1,2} (195.8–4914)	38.14 ± 2.25 ¹
(VII) 6.0 мг/кг в/б + ЧХУ	3.99 ± 0.19¹	0.48 ± 0.07 ¹	0.43 ± 0.03¹	184¹ (108.8–985.5)	393^{1,2} (35.5–393)	35.94 ± 6.78 ¹

Для весовых коэффициентов органов приведены средние значения и стандартная ошибка ($M \pm m$), для биохимических показателей – медиана (25–75 процентиль). Жирным шрифтом выделены значения, которые наиболее выражено улучшались по сравнению с контрольной группой.

¹ Различия с группой интактного контроля статистически достоверны при $p < 0.05$.

² Различия с контрольной группой статистически достоверны при $p < 0.05$.

Для весовых коэффициентов органов различия определены по t -тесту; для биохимических показателей площади поражений печени – по тесту Манн Уитни.

Таким образом, проведенный первичный скрининг новых производных пиримидина показал, что исследованная группа соединений отличается низкой токсичностью, причем лидирующие показатели ЛД₅₀, сопоставимые с эталонным препаратом веществом-сравнения Тиотриазолином, выявлены для соединений (III) и (VI) – конъюгатов пиримидина (I) с аскорбиновой кислотой и метионином.

Пиримидин (I) при остром отравлении CCl₄ оказал выраженный антиоксидантный эффект, проявляющийся в повышении выживаемости животных и нормализации интегральных параметров их клинического состояния – массы и температуры тела. По выраженности эффекта вы-

явлены преимущества пиримидина (I) по сравнению с лекарственным препаратом Тиотриазолин. Среди новых производных пиримидина наибольший антиоксидантный эффект по всем трем критериям оценки выявлен для соединения (V), для соединений (III) и (VII) – по нормализации массы и температуры тела.

В группах, которым вводили исследованные соединения-производные пиримидина, относительная масса печени, увеличенная под влиянием токсического воздействия CCl₄, была меньше, чем в контрольной группе, при этом наблюдался эффект, сопоставимый с действием лекарственного средства Тиотриазолин. Наибольшее снижение относительной массы печени выявлено для

соединений (IV), (III) и (VI). Снижение относительной массы почек, наряду со снижением массы печени, при токсическом поражении ЧХУ, выявлено для соединений (IV), (V), (VII), пиримидина (I) и Тиотриазолина.

Результаты проведенного исследования позволяют говорить о перспективности дальнейшего углубленного исследования гепатопротекторных свойств производных пиримидина на основе действующего вещества лекарственного средства Ксимедон и биогенных кислот. Выявлены соединения лидеры, оказывающие наиболее выраженное влияние на уровень активности трансаминаз — маркеров цитолиза гепатоцитов — соединения (II), (IV) и (VII), обладающие наиболее низкой токсичностью и выраженной антиоксидантной активностью при остром отравлении CCl_4 — соединения (III) и (V) и в наибольшей степени уменьшающие площадь пораженной ткани печени — соединения (III), (II), (V).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1,2-Дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)пиримидон-2 (Ксимедон, (I)) синтезировали, исходя из 1,2-дигидро-4,6-диметил-пиримид-2-она и 2-хлорэтанола по известной методике [9]. Также по известной методике получали 1-(2-гидроксиэтил)-1,2-дигидро-3,4,6-триметил-2-оксопиримидинийодид (VII) [10]. Янтарную кислоту и *L*-метионин (Acros Organics), *para*-аминобензойную, никотиновую (Fisher Chemicals) и *L*-аскорбиновую кислоты (ОАО “Татхимфармпрепараты”) использовали продажные.

¹D- и ²D-эксперименты ЯМР (¹H, ¹³C, δ , м.д., *J*, Гц) соединений (II)–(VI) проводились на Фурье-спектрометре AVANCE-500 (Bruker) с рабочей частотой 500.13 МГц (¹H) и 125.77 МГц (¹³C) в D₂O при температуре 30°C, внешний стандарт тетраметилсилан. ИК-спектры соединений (ν_{max} , см⁻¹) записаны в таблетках с KBr на Фурье-спектрометре Vector 22 (Bruker) при стандартных условиях в диапазоне 4000–400 см⁻¹ при разрешении 4 см⁻¹. Элементный анализ проводили на C,H,N-анализаторе. Температуры плавления соединений измеряли на приборе SMP10 “Stuart”.

Общая методика получения конъюгатов (II)–(VI). В спирте (метанол или этанол) или воде растворяли эквимольные количества пиримидина (I) и соответствующей кислоты, смесь перемешивали 8 ч при 40–50°C, охлаждали, выпавший осадок отфильтровывали, осадок растирали в ацетоне, растворитель декантировали, остаток сушили в вакууме.

Сукцинат 1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)пиримид-2-она (II) получали в 40 мл этанола из 5.05 г (30.0 ммоль) пиримидина (I) и 3.51 г (30.0 ммоль) янтарной кислоты. Выход конъюгата (II) 8.40 г (98%), т. пл. 96–97°C с разл.

ИК-спектр: 3420, 2953, 2693, 1761, 1671, 1639, 1601, 1428, 1142, 1110, 1038, 864. ЯМР ¹H: 6.60 (с, 1H, H5), 4.18 (т, 2H, H1', *J* 5.3), 3.86 (т, 2H, H2', *J* 5.3), 2.55 (с, 4H, H^{Suc2}), 2.53 (с, 3H, H6), 2.48 (с, 3H, H4). ЯМР ¹³C {¹H}: 177.6 (C^{Suc1}), 172.2 (C4), 165.1 (C6), 153.8 (C2), 108.03 (C5), 57.7 (C2'), 48.11 (C1'), 29.4 (C^{Suc2}), 20.7 (C4), 19.6 (C6). Найдено, %: C 50.21; H 6.27; N 9.80. C₁₂H₁₈N₂O₆. Вычислено, %: C 50.35; H 6.34; N 9.79.

***L*-Аскорбат 1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)пиримид-2-она (III)** получали в 80 мл метанола из 10 г (60.0 ммоль) пиримидина (I) и 10.48 г (60.0 ммоль) *L*-аскорбиновой кислоты. Выход 17.70 г (86%), т. пл. 117–118°C. ИК-спектр: 3430, 2990, 2653, 1729, 1695, 1420, 1311, 920, 638. ЯМР ¹H: 6.61 (с, 1H, H5), 4.70 (м, 1H, H^{Asc4}), 4.20 (т, 2H, CH1', *J* 5.3), 4.00 (т, 1H, CH^{Asc5}, *J* 6.1), 3.87 (т, 2H, H2', *J* 5.3), 3.70 (д, 1H, H^{Asc6}, *J* 6.1), 2.56 (с, 3H, H6), 2.39 (с, 3H, H4). ЯМР ¹³C {¹H}: 174.6 (C^{Asc1}), 172.25 (C4), 164.98 (C6), 163.72 (C^{Asc2}), 154.0 (C2), 115.32 (C^{Asc2}), 108.1 (C5), 76.7 (C^{Asc4}), 68.72 (C^{Asc5}), 61.8 (C^{Asc6}), 57.8 (C2'), 48.1 (C1'), 20.7 (C4CH₃), 19.5 (C6CH₃). Найдено, %: C 49.01; H 6.00; N 7.98. C₁₄H₂₀N₂O₈. Вычислено, %: C 48.85; H 5.85; N 8.14.

***para*-Аминобензоат 1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)пиримид-2-она (IV)** получали в 50 мл метанола из 5 г (29.8 ммоль) пиримидина (I) и 4.08 г (29.8 ммоль) *para*-аминобензойной кислоты. Выход (IV) 9.0 г (89%), т. пл. 113–114°C. ИК-спектр: 3461, 3364, 2675, 1664, 1625, 1442, 1423, 1313, 1292, 1174, 843, 772. ЯМР ¹H: 7.65 (д, 2H, H^{Ar2}, *J* 8.6), 6.70 (д, 2H, H^{Ar3}, *J* 8.6), 6.40 (с, 1H, H5), 4.06 (т, 2H, H1', *J* 5.4), 3.81 (т, 2H, H2', *J* 5.4), 2.39 (с, 3H, H6), 2.26 (с, 3H, H4). ЯМР ¹³C {¹H}: 173.91 (C4), 171.35 (COO), 161.98 (C6), 156.10 (C2), 150.36 (C^{Ar4}), 130.92 (C^{Ar2}), 120.53 (C^{Ar1}), 114.40 (C^{Ar3}), 108.13 (C5), 57.86 (C2'), 47.66 (C1'), 21.79 (C4CH₃), 19.29 (C6CH₃). Найдено, %: C, 59.15; H, 6.34; N, 13.64. C₁₅H₁₉N₃O₄. Вычислено, %: C, 59.01; H, 6.27; N, 13.76.

Никотинат 1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)пиримид-2-она (V) получали в 100 мл метанола из 5.05 г (30.0 ммоль) пиримидина (I) и 3.69 г (30.69 ммоль) никотиновой кислоты. Выход 7.85 г (89%), т. пл. 138–140°C. ИК-спектр: 3409, 3071, 2456, 1714, 1651, 1602, 1545, 1415, 1323, 1088, 1038, 775, 748. ЯМР ¹H: 8.98 (с, 1H, H^{Pyr1}), 8.70 (д, 1H, H^{Pyr5}, *J* 5.5), 8.63 (д, 1H, H^{Pyr3}, *J* 8.0), 7.85 (дд, 1H, H^{Pyr4}, *J* 8.0, 5.5), 6.52 (с, 1H, H5), 4.14 (т, 2H, H1', *J* 5.4), 3.84 (т, 2H, H2', *J* 5.4), 2.50 (с, 3H, H6), 2.31 (с, 3H, CH4). ЯМР ¹³C {¹H}: 173.1 (C4), 168.9 (C^{Pyr2}COO), 163.4 (C6), 155.1 (C2), 144.5 (C^{Pyr5}), 143.8 (C^{Pyr1}), 143.0 (C^{Pyr3}), 134.2 (C^{Pyr2}), 125.6 (C^{Pyr4}), 108.1 (C5), 57.8 (C2'), 47.9 (C1'), 21.2 (C4CH₃), 19.4 (C6CH₃). Найдено, %: C, 57.35;

H, 6.30; N, 14.54. $C_{12}H_{18}N_3O_4$. Вычислено, %: C, 57.52; H, 6.21; N, 14.38.

L-Метионат 1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)-пиримид-2-она (VI) получали в 100 мл воды из 5.64 г (33.6 ммоль) пиримидина (I) и 5.0 г (33.6 ммоль) L-2-амино-4-(метилтио)бутановой кислоты. Выход 9.54 г (90%), т. пл. 140–145°C с разл. ИК-спектр: 3410, 2917, 2605, 1651, 1606, 1512, 1410, 1348, 1244, 1088, 1022, 794. ЯМР 1H : 6.45 (с, 1H, H5), 4.11 (т, 2H, H1', J 5.2), 3.83 (т, 2H, H2', J 5.2), 3.80 (м, 1H, H^{Mt2}), 2.58 (т, 2H, H^{Mt4}, J 7.6), 2.44 (с, 3H, H6), 2.26 (с, 3H, CH4), 2.19–2.02 (м, 2H, H^{Mt2}), 2.07 (с, 3H, SCH₃). ЯМР ^{13}C { 1H }: 175.3 (C4), 173.6 (C^{Mt1}), 160.3 (C6), 157.8 (C2), 108.2 (C5), 58.0 (C2'), 53.4 (C^{Mt2}), 47.5 (C1'), 29.2 (C^{Mt3}), 28.4 (C^{Mt4}), 23.0 (C4SCH₃), 19.57 (C6SCH₃), 13.46 (SCH₃). Найдено, %: C, 49.33; H, 7.37; N, 13.08; S, 9.98. $C_{13}H_{23}N_3O_4S$. Вычислено, %: C, 49.19; H, 7.30; N, 13.24; S, 10.10.

Методика исследования гепатопротекторной активности веществ на лабораторных животных. Для индуцирования токсического поражения, после 11-дневного курса введения исследуемых соединений, 1 раз в день в течение 3 дней вводили 50%-й масляный раствор гепатотропного яда — четыреххлористого углерода в дозе 2 мл/кг подкожно (п/к), через 1–1.5 ч после введения исследуемых соединений. Показателями антитоксического эффекта тестируемых соединений считали выживаемость животных, изменение массы и температуры тела в период введения CCl_4 и после последнего введения (табл. 2). Для оценки гепатопротекторного действия соединений, в соответствии с работой [7], на следующий день после последнего сочетанного введения соединений и CCl_4 исследовали изменение массового коэффициента печени (масса печени относительно массы тела), морфометрические показатели гистологических срезов и биохимические показатели сыворотки крови — уровень АЛТ и АСТ, являющихся маркерами цитолиза. Животных подвергали эвтаназии под эфирным наркозом, извлекали печень и определяли ее массу, рассчитывали массовый коэффициент печени и сравнивали с показателями в контрольной группе. В качестве дополнительной оценки антитоксического действия соединений у тех же животных аналогично исследовали массу левой и правой почки (массовые коэффициенты почек) (табл. 3).

Температуру тела определяли ректально с помощью блока для прижизненного определения температуры у лабораторных животных TSE-Systems.

Биохимические исследования сыворотки крови выполнены на биохимическом анализаторе Cobas Integra 400 (производства Рош, Швейца-

рия) с использованием стандартных наборов реагентов по протоколу производителя. Для гистологических исследований парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином, морфометрический анализ проводили под микроскопом Nikon с цифровой камерой Nikon и программным обеспечением NIS В. На срезах определяли площадь печеночной ткани, пораженной стеатозом и некрозами, выражали в % по отношению к общей площади среза.

Статистический анализ результатов проводили в программах Origin 6.1 и SPSS. В случае нормального распределения выборки сравнивали по *t*-тесту для независимых выборок (критерий Стьюдента), в случае ненормального распределения — по непараметрическим тестам Вилкоксона и Манн–Уитни.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ грант № 14-50-00014.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мышкин В.А., Еникеев Д.А. // Медицинский вестник Башкортостана. Т. 4. Вып. 2. С. 147–151.
2. Nazarov N.G., Zobov V.V., Vyshtakalyuk A.B., Reznik V.S. // Research J. of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2015. V. 6. P. 1617–1623.
3. Vyshtakaliuk A.B., Nazarov N.G., Porfiriev A.G., Zueva I.V., Minnechanova O.A., Mayatina O.V., Reznik V.S., Zobov V.V., Nicol'skiy E.E. // Doklady Biochemistry and Biophysics. 2015. V. 462. P. 143–146.
4. Vyshtakalyuk A.B., Nazarov N.G., Zobov V.V., Semenov V.E., Galyametdinova I.V., Tcherepnev G.V., Reznik V.S. // Int. J. Risk & Safety in Medicine. 2015. V. 27. № 1. P. S78–S79.
5. Povysheva T.V., Semenov V.E., Galyametdinova I.V., Reznik V.S., Knni K.S., Kolesnikov P.E., Chelyshev Yu.A. // Bull. Exp. Biol. Med. 2016. V. 162. P. 220–224.
6. Povysheva T.V., Semenov V.E., Galyametdinova I.V., Reznik V.S., Knni K.S., Kolesnikov P.E., Kuznetsova S.V., Chelyshev Yu.A. // Eksp. Klin. Farmakol. 2016. V. 79. P. 3–9.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Ред. Миронов А.Н. М.: Гриф и Ко, 2012. 944 с.
8. Березовская И.В. // Хим.-фарм. журнал. 2003. Т. 37. № 3. С. 32–34.
9. Reznik V.S., Pashkurov N.G. Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of Chemical Science. 1965. V. 15. С. 1554–1557.
10. Litvinov I.A., Voronina Yu.K., Galyametdinova I.V., Shashin M.S., Semenov V.E., Reznik V.S. // J. Struct. Chem. 2016. V. 57. P. 549–556.

Synthesis and Primary Evaluation of Hepatoprotective Properties of New Pyrimidine Derivatives

A. B. Vyshtakalyuk^{*,#}, V. E. Semenov^{*,#}, V. V. Zobov^{*,**}, I. V. Galyametdinova^{*}, L. F. Gumarova^{*}, A. A. Parfenov^{*}, N. G. Nazarov^{*,**}, O. A. Lenina^{*}, S. A. Kondrashova^{*}, Sh. K. Latypov^{*}, G. V. Tcherepnev^{*}, M. S. Shashyn^{*}, and V. S. Reznic^{*}

^{*}*Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry of Kazan Scientific Center of Russian Academy of Sciences, ul. Arbuzova, 8, Kazan, 420088 Russia*

^{**}*Kazan Federal University*

The new derivatives of pyrimidines with biogenic acids (succinic, *L*-ascorbic, *para*-aminobenzoic, nicotinic, *L*-2-amino-4-(methylthio)butane (*L*-Methionine)) was synthesized on the base of active compound of Xymedon preparation (pyrimidine (**I**)). The acute toxicity parameters LD₅₀ and antitoxic effect under hepatotropic poison carbon tetrachloride damage as primary evaluation of hepatoprotective properties was investigated. It was found, that the synthesized compounds refer to III and IV classes of toxicity safety (moderately and little toxic). The least toxic compounds are conjugates of pyrimidine (**I**) with *L*-ascorbic acid and with *L*-Methionine (LD₅₀ is more than 5400 mg/kg). Pyrimidine (**I**) and its derivatives exhibit antitoxic effect at the acute poisoning by carbon tetrachloride in rats. The effect appears to increase survival of rats and normalize of integrated functional parameters – body mass and temperature that reduce under toxic carbon tetrachloride damage. The weight coefficients of liver and kidneys that is organs mass in relation to body mass as well the transaminases activity ALT and AST (cytolysis markers of hepatocytes), which increased under toxic carbon tetrachloride damage, decreased in groups of rats treated pyrimidine (**I**) and some derivatives (conjugates with succinic, *L*-ascorbic, *para*-aminobenzoic and nicotinic acids). The area of pathological lesions of steatosis and necrosis in liver decreased 2–3 times in groups treated pyrimidine (**I**) and conjugates with succinic, *L*-ascorbic and nicotinic acids. It was shown any advantages of effect of pyrimidine (**I**) and some derivatives in comparison with hepatoprotector preparation Thyotriazolol.

Keywords: pyrimidines, Xymedon hepatoprotectors, liver diseases, toxic hepatitis