

Конъюгат ксимедона с *para*-аминобензойной кислотой. Оценка гепатопротекторных свойств*

А. А. Парфенов,^{а*} А. Б. Выштакалюк,^{а*} Л. Ф. Гумарова,^а Л. Р. Хасаншина,^{а,б} Г. П. Беляев,^{а,б}
Н. Г. Назаров,^{а,б} Д. А. Кондрашина,^{а,б} И. В. Галяметдинова,^а В. В. Зобов,^{а,б} В. Э. Семенов^а

^аИнститут органической и физической химии им. А. Е. Арбузова,
Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук»,
Российская Федерация, 420088 Казань, ул. Арбузова, 8.

Факс: (843) 273 1872. E-mail: aimt66@gmail.com, alex.vysh@mail.ru

^бКазанский (Приволжский) федеральный университет,
Российская Федерация, 420097 Казань, ул. Кремлевская, 18

^вКазанский государственный медицинский университет,
Российская Федерация, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49

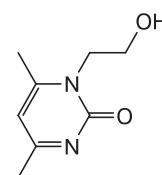
В ряду производных пиримидина синтезирован солеподобный конъюгат ксимедона с *para*-аминобензойной кислотой и изучены его гепатопротекторные свойства. В экспериментах *in vitro* показано, что исследованное соединение проявляет цитопротекторный эффект в концентрации 25 мкмоль · л⁻¹, приводя к повышению жизнеспособности клеток нормальных гепатоцитов человека линии *Chang Liver* на фоне воздействия токсиканта D-галактозамина в 2.1 раза. Цитотоксичность соединения (IC₅₀) составляет 20.7 мкмоль · л⁻¹. В экспериментах *in vivo*, выполненных по терапевтической схеме на модели CCl₄-индуцированного токсического гепатита, получены данные, свидетельствующие о проявлении гепатопротекторного эффекта, в наибольшей степени выраженного на ранних сроках терапии. Выявлена способность конъюгата оказывать репаративный и протекторный эффекты, так как площадь деструктивно-дегенеративных и некротических повреждений, выявляемых на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, на третий день внутрибрюшинного введения исследованного соединения в дозе 0.7 мг · кг⁻¹ снизилась в 1.5 раза. Области детекции липидных включений на замороженных срезах, окрашенных суданом черным, на третьи сутки при дозе соединения 1.7 мг · кг⁻¹ снизились в четыре раза, на седьмые сутки при дозе 0.7 мг · кг⁻¹ — в 3.2 раза по сравнению с контрольной группой животных, которой в качестве терапевтического воздействия вводили физиологический раствор. По биохимическим показателям при терапии животных конъюгатом отмечен положительный эффект на секреторную и синтетическую функции печени, обмен билирубина, а также на метаболизм железа и магния.

Ключевые слова: пиримидин, конъюгаты, гепатопротекторы, токсическое повреждение печени, гепатоциты.

Учитывая повышение техногенной нагрузки в современном мире, а также частое применение среди населения различных лекарственных препаратов, все большую значимость приобретают заболевания печени вследствие воздействия токсикантов¹. По данным Всемирной организации здравоохранения, на 2015 г. зарегистрированы около 2 млрд человек с различными заболеваниями печени. Поэтому изучение и поиск потенциальных гепатопротекторов является одной из важнейших задач современного мира.

Ксимедон (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)пиримидин-2-он) (1) — это оригинальное отечественное лекарственное средство, созданное на базе Института органической и физической химии им. А. Е. Арбузова в 1966 г. Он относится к препара-

там с широким спектром действия и оказывает мембраностабилизирующий, регенераторный, иммуностимулирующий и другие эффекты^{2,3}. Нами было показано, что ксимедон и его производные обладают гепатопротекторными, антиоксидантными, нейропротекторными и другими свойствами^{4–8}.



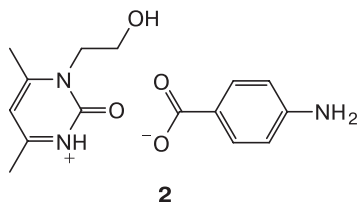
Ксимедон (1)

В настоящее время проводятся исследования по созданию фармацевтических сокристаллов и конъюгатов, что позволяет улучшить биодоступность лекарственных молекул^{9,10} в результате увеличения

* По материалам IV Междисциплинарного симпозиума по медицинской, органической, биологической химии и фармацевтике (МОБИ-ХимФарма 2018) (23–26 сентября 2018 г., пос. Новый Свет, Крым).

скорости растворения лекарств, а также проявления дополнительных биологических свойств^{11–13}. Кроме того, создание конъюгатов используется как перспективный подход в разработке способов направленной доставки лекарств к биомишеням, в том числе к клеткам печени¹⁴. В связи с этим на протяжении последних нескольких лет нами выполняются работы по получению и исследованию биологических свойств солеподобных конъюгатов **1** с биогенными кислотами, которые в твердом (нерастворенном виде) представляют собой сокристаллы.

Выбор *para*-аминобензойной кислоты для синтеза конъюгата обусловлен ее пролиферативными, антикоагуляционными, антиоксидантными и другими свойствами^{15–17}. Создание конъюгата проводилось с целью улучшения биодоступности и придания новых биологических свойств уже известному препарату ксимедон¹⁸. По своей химической структуре конъюгат **2**, образованный соединением **1** и *para*-аминобензойной кислотой, является сокристаллом в молярном соотношении *para*-аминобензойная кислота : **1** = 1 : 1.



Для конъюгата **2** показана способность стимулировать регенерацию нервной ткани спинного мозга при контузионной травме¹⁹. В работах^{5,7} приведены полученные нами ранее результаты первичной оценки гепатопротекторных свойств соединения **2**, согласно которым это соединение обладает гепатопротекторными свойствами, проявляющимися в снижении активности маркера цитолиза аланинаминотрансферазы (АЛТ) и концентрации билирубина на модели CCl₄-индуцированного токсического гепатита у крыс при профилактической схеме введения.

Для получения полных научных данных о гепатопротекторных свойствах соединения **2** в настоящей работе было проведено углубленное исследование его эффективности при токсическом CCl₄-индуцированном гепатите при терапевтической схеме введения.

Цель данной работы — изучение гепатопротекторных свойств конъюгата ксимедона с *para*-аминобензойной кислотой (**2**) в исследованиях *in vitro* на клеточной линии *Chang Liver* и на крысах *in vivo* при терапии токсического повреждения печени.

Обсуждение полученных результатов

Цитотоксичность и цитопротекторный эффект конъюгата **2 в экспериментах *in vitro*.** В результате проведения серии экспериментов на клеточной линии нормальных гепатоцитов человека *Chang Liver* определена полумаксимальная ингибирующая доза (IC₅₀) соединения **2**, составляющая 20.7 ммоль · л⁻¹, или 6.3 г · л⁻¹,

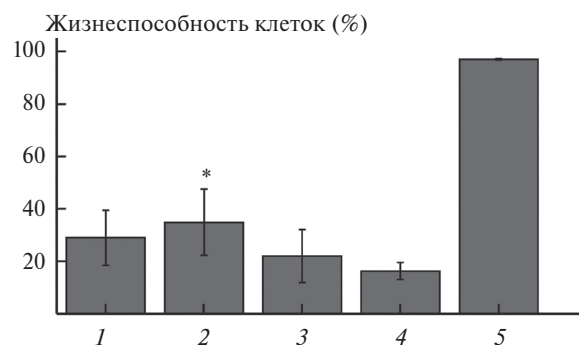


Рис. 1. Цитопротекторный эффект соединения **2** на фоне токсического повреждения D-ГЛА клеток линии *Chang Liver*: 1–4 — 150 ммоль · л⁻¹ D-ГЛА; концентрация **2** — 50 (1), 25 (2) и 12.5 мкмоль · л⁻¹ (3), 4 — контроль; 5 — интактные клетки. Здесь и на рисунках 3 и 4 звездочкой отмечено статистически достоверное отличие от показателей контрольной группы клеток (тест Манна—Уитни, $p < 0.05$).

для клеток этой линии. Исследован также цитопротекторный эффект соединения **2** на фоне индукции повреждений клеток линии *Chang Liver* D-галактозамином (D-ГЛА) в концентрации 150 ммоль · л⁻¹. Результаты исследований представлены на рисунке 1.

Из полученных данных следует, что соединение **2** в концентрации 25 мкмоль · л⁻¹ проявляет цитопротекторный эффект. Количество жизнеспособных клеток в этой группе по сравнению с контрольной группой, подвергнутой аналогичному воздействию D-ГЛА, увеличилось примерно в два раза.

Влияние соединения **2 на динамику изменения массового коэффициента печени крыс при токсическом CCl₄-индуцированном гепатите.** В ходе эксперимента, в динамике наблюдений в течение 21 сут терапии соединением **2**, была измерена масса печени и определен ее массовый коэффициент. Результаты представлены на рисунке 2.

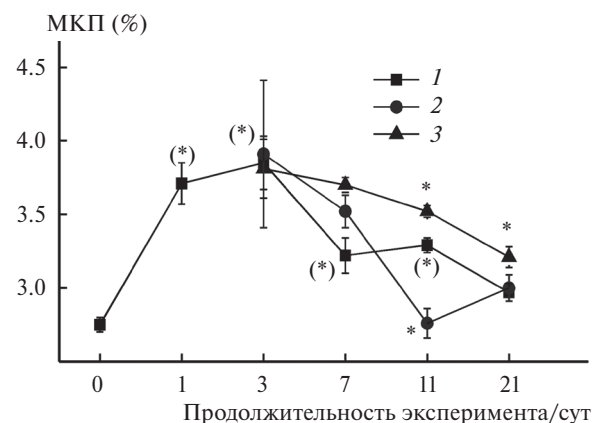


Рис. 2. Динамика изменения массового коэффициента печени (МКП): 1 — контроль, 2 и 3 — введение **2** в дозе 0.7 и 1.7 мг · кг⁻¹ соответственно. Здесь и на рисунках 5–8 звездочкой отмечены статистически достоверные различия с контрольной группой ($p < 0.05$, *t*-тест); звездочкой в скобках — то же между контрольной и референсной (интактной) группой.

Вследствие гепатотоксического воздействия CCl_4 в результате его 5-дневного перорального введения через один день выявлено повышение массового коэффициента печени (МКП) в сравнении с референсными значениями интактных животных («нулевой» день). На седьмые сутки и в последующие дни после последнего введения CCl_4 в контрольной группе отмечено постепенное восстановление (снижение) данного показателя в течение 21 сут. Однако восстановление МКП в контрольной группе было не полным и на 21-е сутки наблюдения коэффициент оставался повышенным, превышая соответствующие показатели интактных животных на 16.7%. Данные различия были статистически достоверными ($p < 0.05$, t -тест).

При введении крысам соединения **2** в дозе $0.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ статистически достоверное снижение массы печени относительно контроля наступило на 11-е сутки (статистически достоверные отличия от контроля по t -тесту, $p < 0.05$), однако на 21-е сутки различия с контролем не наблюдали (см. рис. 2).

Введение конъюгата **2** в дозе $1.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ не привело к нормализации данного показателя. На 7-е, 11-е и 21-е сутки в данной группе наблюдалось увеличение МКП по сравнению с контрольной группой животных, которым в качестве терапевтического воздействия вводили физиологический раствор, при этом на 11-е и 21-е сутки повышение было статистически достоверным ($p < 0.05$, t -тест), т.е. увеличение дозы соединения **2** привело к снижению его гепатопротекторной активности.

Влияние соединения 2 на патоморфологические изменения печеночной ткани на фоне повреждений, вызванных CCl_4 . В ходе эксперимента на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, были проведены подсчеты площадей повреждений печеночной ткани. Результаты представлены на рисунке 3.

Показано, что на третьи сутки после последнего введения CCl_4 (третьи сутки введения препаратов) на гистологических срезах ткани печени, окрашенных гематоксилином и эозином, выявляются существенные повреждения ткани, которые составляют 92.2%.

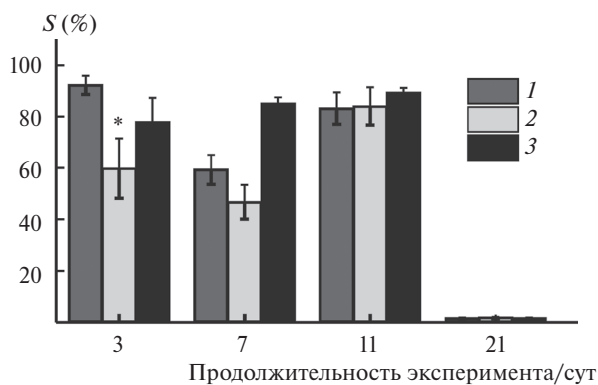


Рис. 3. Средние площади повреждений (S) ткани печени крыс после введения соединения **2** на фоне CCl_4 -индуцированного гепатита: 1 — контроль, 2 и 3 — введение **2** в дозе 0.7 и $1.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ соответственно.

В свою очередь, введение животным соединения **2** в дозе $0.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ способствовало протекторному эффекту, поскольку на третьи сутки площадь поврежденной ткани составила 59.8% (статистически достоверные отличия от контроля по t -тесту, $p < 0.05$). При использовании соединения **2** в дозе $1.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ на третьи сутки введения положительный эффект не наблюдали. На 7-е, 11-е и 21-е сутки при использовании соединения **2** в дозах 0.7 и $1.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ статистически достоверного снижения площадей повреждений ткани печени также не наблюдали.

Для некоторых групп животных были приготовлены замороженные срезы тканей, которые затем были окрашены суданом черным для выявления липидных включений (ЛВ) в гепатоцитах. Результаты представлены на рисунке 4.

Как следует из рисунка 4, на третьи сутки соединения **2** (на фоне CCl_4 -индуцированных повреждений) в дозе $1.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ способствует существенному снижению накопления липидов в гепатоцитах (на третьи сутки введения площадь выявления гепатоцитов с повышенными жировыми включениями в четыре раза меньше, чем в контрольной группе). На седьмые сутки снижение площадей выявления липидов в печени под действием соединения **2** в дозе $0.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ было вдвое меньше, чем в контрольной группе, однако в группе, которой вводили вещество в дозе $1.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$, снижение было не столь существенным. На 11-е сутки снижение площадей выявления липидов в печени в группе, которой вводили **2** в дозе $0.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$, было вдвое меньше, чем в контрольной, но различия между этими группами были недостоверными, а на 21-е сутки показатели были одинаковыми в опытной и контрольной группах.

Если сопоставить результаты, полученные при анализе срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, с результатами анализа замороженных срезов, окрашенных суданом черным, можно заключить, что соединение **2** в большей степени способствует уменьшению накопления липидов в гепатоцитах, чем снижению некротических повреждений. Положительный

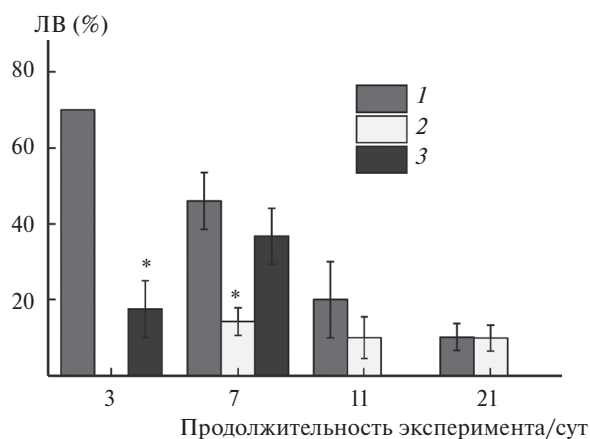


Рис. 4. Количество липидных включений (ЛВ) после введения соединения **2** на фоне CCl_4 -индуцированных повреждений: 1 — контроль, 2 и 3 — введение **2** в дозе 0.7 и $1.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ соответственно.

эффект был более выражен на ранних стадиях токсического повреждения печени CCl_4 (на 3-и—11-е сутки).

Влияние соединения 2 на биохимические показатели крови крыс на фоне CCl_4 -индуцированного повреждения печени. Через 1 сут после последнего введения CCl_4 , т.е. после индукции токсического повреждения печени, у крыс были выявлены выраженные изменения биохимических показателей крови, характеризующие цитолиз гепатоцитов (повышение АЛТ в 8.2 раза, аспаратаминотрансферазы (АСТ) в 4.8 раза, снижение коэффициента де Ритиса в два раза), нарушение синтетической функции печени (снижение концентрации общего белка на 20%, альбумина на 25%, глобулинов на 11%, глюкозы на 32%, холестерина в 3.75 раза и активности холинэстеразы вдвое, а также снижение железа в 1.7 раза и магния вдвое (параметров, характеризующих обмен минеральных веществ, регулирующих важные функции в организме и входящих в состав специфических белков)). Все изменения биохимических маркеров, указанные выше, статистически достоверно отличались от нулевого дня эксперимента, т.е. от референсных значений интактных животных, по *t*-тесту ($p < 0.05$). В контрольной группе, которой вместо лечения вводили физиологический раствор, к 21-м суткам терапии (26-е сутки опыта) наблюдали восстановление до уровня нормы некоторых биохимических показателей — маркеров цитолиза (АЛТ, АСТ), с повышением коэффициента де Ритиса до 2.8 ± 0.3 и некоторых маркеров синтетической функции (глобулинов, глюкозы). В то же время

основная часть маркеров синтетической функции печени (общий белок, альбумин, сывороточное железо, холестерин, холинэстераза) в контрольной группе оставались пониженными до конца наблюдения. Повышения маркеров холестаза (щелочная фосфатаза, γ -глутамилтрансфераза (ГГТ), билирубин общий) после введения CCl_4 не наблюдалось. Начиная с 3-х суток терапии (8-е сутки опыта) в контрольной группе, наоборот, выявлено снижение щелочной фосфатазы, ГГТ и общего билирубина, что связано с нарушением функциональной активности клеток печени. Уровень активности ГГТ на 21-е сутки терапии повысился до $3.0 \text{ ЕД} \cdot \text{л}^{-1}$ (отличие от уровня интактных животных недостоверное). На 7-е сутки терапии (12-е сутки опыта) в контрольной группе наблюдалась нормализация уровня общего билирубина, но при этом значительно снизилась концентрация фракции прямого билирубина и повысилась концентрация токсичной фракции непрямого билирубина, что говорит о нарушении билирубинового обмена, в частности, о способности гепатоцитов утилизировать и конъюгировать непрямо билирубин. Таким образом, в данном опыте развития холестаза в контрольной группе у животных не наблюдалось, но выявлено нарушение экскреторной функции гепатоцитов, связанной с инактивацией непрямого билирубина.

На изменение маркеров цитолиза гепатоцитов, по сравнению с контрольной группой в соответствующие дни эксперимента, существенного влияния соединения 2 не выявлено (рис. 5). Лишь на третьи

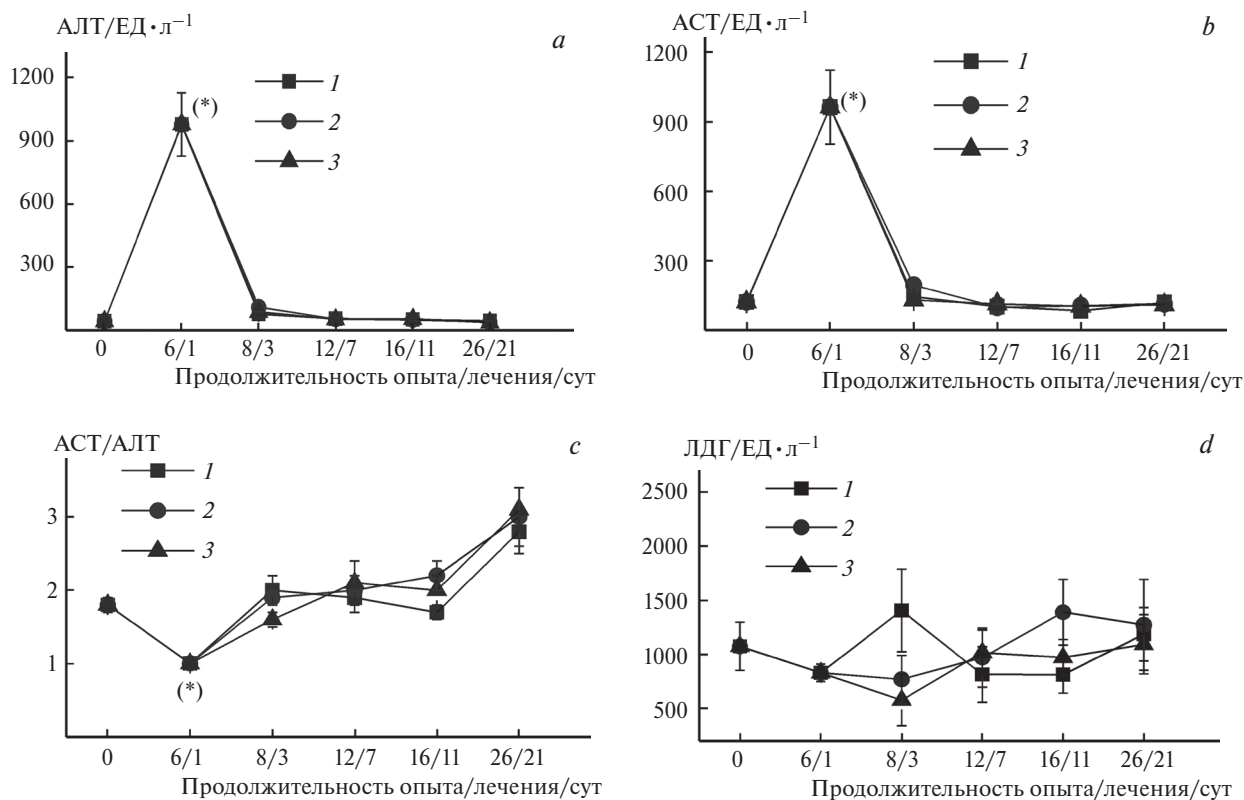


Рис. 5. Влияние соединения 2 на динамику изменения биохимических маркеров цитолиза у крыс при токсическом CCl_4 -индуцированном гепатите: активность ферментов АЛТ (а), АСТ (б), коэффициент де Ритиса (соотношение АСТ/АЛТ) (с), активность фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ) (д); 1 — контроль, 2 и 3 — введение 2 в дозе 0.7 и 1.7 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ соответственно.

сутки эксперимента в группе, в которой вводили **2** в дозе $1.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$, коэффициент де Ритиса был достоверно ниже (t -тест, $p < 0.05$), чем в контроле (см. рис. 5, с).

Как следует из результатов исследования маркеров холестатических повреждений печени, соединение **2** (в дозах 0.7 и $1.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$) не оказало эффекта на динамику изменения активностей ГГТ и щелочной фосфатазы, но привело к нормализации билирубинового обмена, показатели которого приведены на рисунке 6.

Из рисунка 6 видно, что в контрольной группе на третьи сутки лечения физиологическим раствором

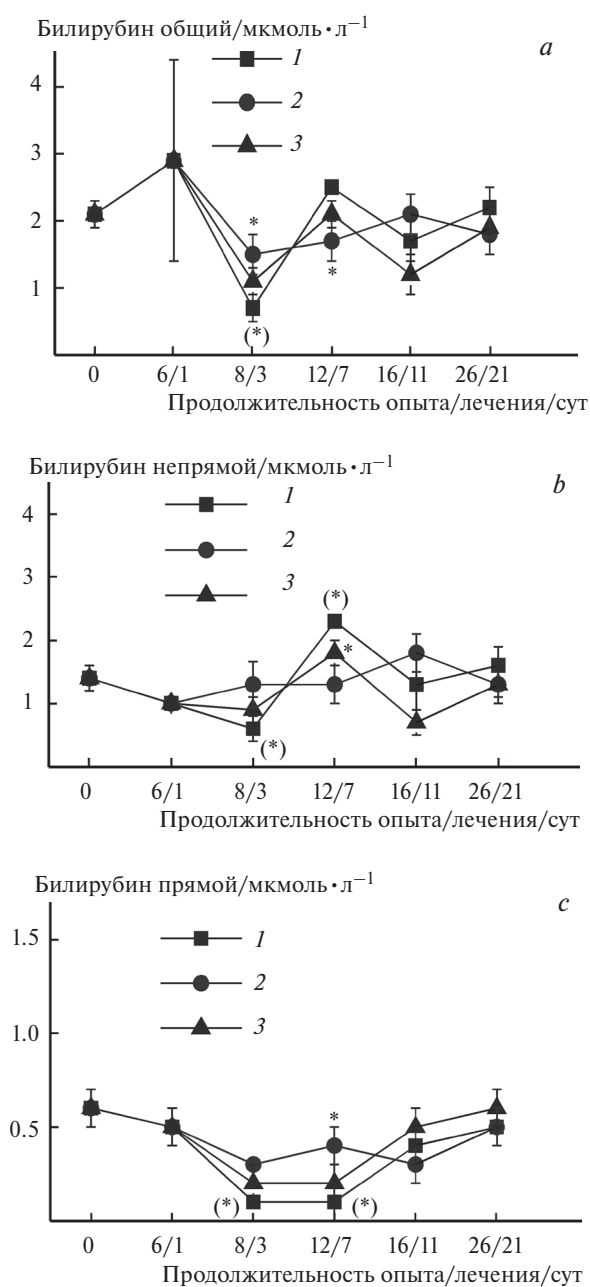


Рис. 6. Влияние соединения **2** на обмен билирубина у крыс при токсическом CCl_4 -индуцированном гепатите: уровень общего билирубина (а), уровень непрямого билирубина (б), уровень прямого билирубина (с); 1 — контроль, 2 и 3 — введение **2** в дозе 0.7 и $1.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ соответственно.

выявлено резкое снижение общего билирубина, а также фракций прямого и непрямого билирубина, что является признаком патологических нарушений в организме. На 7-е сутки терапии (12-е сутки опыта) в контрольной группе уровень общего билирубина нормализовался, однако концентрация прямого билирубина оставалась значительно сниженной, а непрямого билирубина — повышенной по сравнению с показателями нормы. Такое изменение соотношения фракций билирубина является показателем нарушения экскреторной функции гепатоцитов, или способности поглощать и связывать непрямо билирубин и выделять прямой билирубин. Полное восстановление показателей билирубинового обмена в контрольной группе наблюдалось на 11-е сутки терапии (16-е сутки опыта).

При введении соединения **2**, в отличие от контрольной группы, снижение концентрации общего билирубина на третьи сутки терапии было менее выраженным (при дозе $0.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ различия с контролем статистически достоверны при $p < 0.05$). В то же время на 7-е сутки при введении соединения **2** в дозе $0.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ общий билирубин был ниже контроля: 1.7 ± 0.3 и $2.5 \pm 0.1 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$ соответственно ($p < 0.05$) (см. рис. 6, а). По соотношению концентраций прямого (см. рис. 6, а) и непрямого билирубина (см. рис. 6, б) экскреторная функция гепатоцитов при использовании соединения **2** в дозе $0.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ значительно улучшалась по сравнению с контрольной группой: на 7-е сутки терапии, когда в контрольной группе выявлялись наибольшие изменения, при введении соединения **2** в дозе $0.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ концентрации обеих фракций билирубина практически не отличались от уровня нормы (нулевой день эксперимента), но статистически достоверно ($p < 0.05$) отличались от соответствующих контрольных показателей (см. рис. 6, а, б). На 11-е и 21-е сутки по уровню прямого и непрямого билирубина отличий от контрольной группы не наблюдалось. При применении соединения **2** в дозе $1.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ не выявлено влияния вещества на билирубиновый обмен и улучшения секреторной функции печени.

Как было сказано выше, после индукции токсического повреждения печени наблюдалось снижение концентрации общего белка, а также его фракций — альбумина и глобулинов — и снижение активности сывороточной холинэстеразы. В период 21-дневного наблюдения во время терапевтического воздействия препаратами в контрольной группе уровни общего белка, альбумина и активности холинэстеразы оставались пониженными (рис. 7, а, б, д), а концентрация глобулинов восстанавливалась на 11-е сутки (рис. 7, с). Применение соединения **2** привело к нормализации белкового обмена, а именно к восстановлению уровня общего белка, прежде всего за счет повышения фракции глобулинов (см. рис. 7, а, с). Динамика изменения концентрации альбумина и активность холинэстеразы в группе животных, которым вводили соединение **2**, незначительно отличалась от контрольной группы (см. рис. 7, б, д).

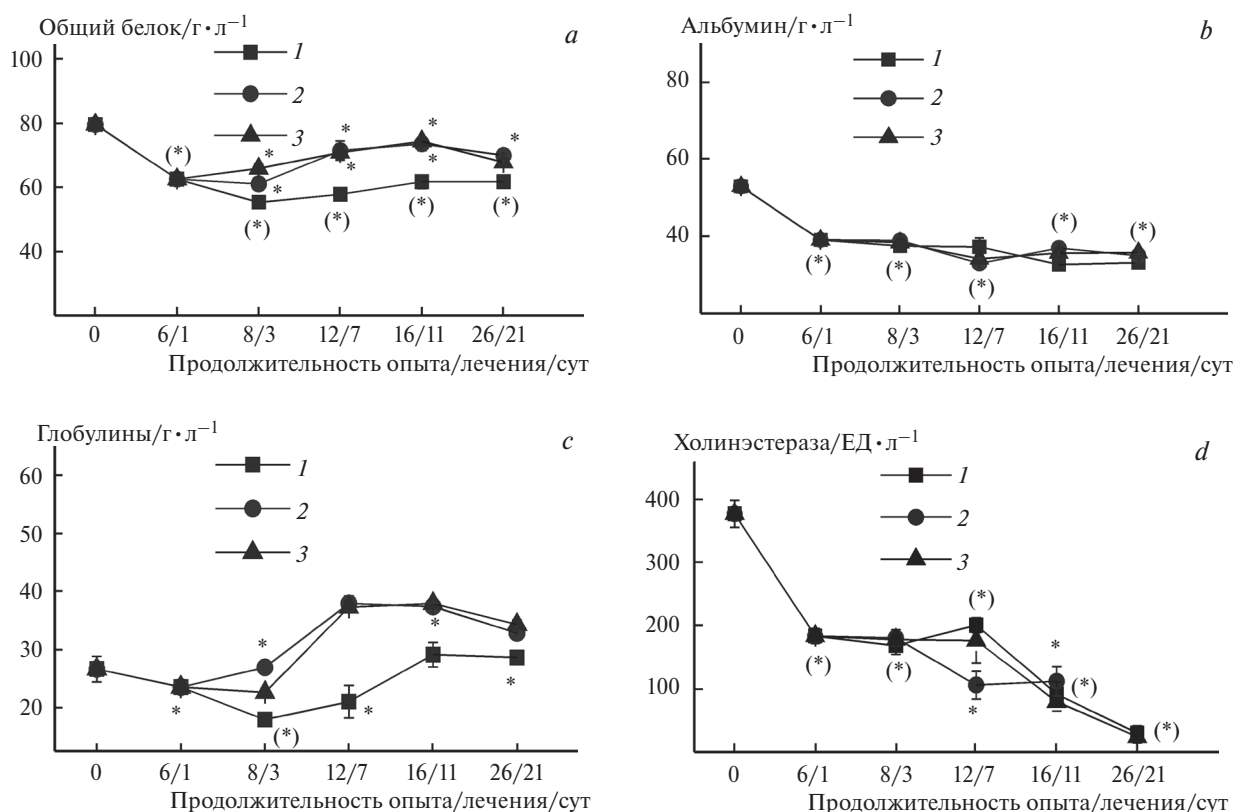


Рис. 7. Влияние соединения **2** на показатели белкового обмена и синтетической функции печени у крыс при CCl_4 -индуцированном гепатите: уровень общего белка (a), уровень альбумина (b), уровень глобулинов (c), активность фермента сывороточной холинэстеразы (d); 1 — контроль, 2 и 3 — введение **2** в дозе 0.7 и 1.7 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ соответственно.

В динамике наблюдения в контрольной группе уровень глюкозы нормализовался к третьему дню терапии (рис. 8, a), а уровни холестерина, сывороточного железа и магния оставались пониженными (рис. 8, b—d). По уровню глюкозы в группах животных, которым вводили соединение **2**, статистически достоверных различий с контрольной группой в соответствующие дни замеров не выявлено (см. рис. 8, a).

Концентрация холестерина (см. рис. 8, b) при введении соединения **2** в дозах 0.7 и 1.7 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ на третьи сутки введения повышалась по сравнению с контролем (t -тест, $p < 0.05$), однако оставалась ниже референсных значений, что свидетельствует о нормализации липидного обмена и синтеза желчных кислот. На седьмые сутки и на дальнейших сроках наблюдения уровень холестерина в опытных группах также снижался и был на уровне контрольной группы.

После курса введения тетрахлорметана наблюдалась гипоферремия, усиливающаяся в течение 21 сут наблюдения (см. рис. 8, c), что означает нарушение метаболизма гемовых белков в печени, так как железо в организме находится только в связанном с белками состоянии. На третьи сутки введения соединения **2** в дозах 0.7 и 1.7 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ и на 11-е сутки в дозе 0.7 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ отмечено повышение содержания железа в сыворотке крови до уровня нормы, при этом различия с контрольной группой животных были статистически достоверны (t -тест, $p < 0.05$). При введении соединения **2** в дозе 1.7 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ начиная с седьмых суток, а также в дозе 0.7 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ на 7-е и 21-е сутки

терапии различий уровня железа с контрольной группой не было выявлено, и данный показатель был снижен по сравнению с нормативными интактными значениями.

Магний играет важную роль в обмене нуклеиновых кислот и нуклеотидов в клетках. Он активирует ДНК- и РНК-полимеразу, полинуклеотидазу, рибонуклеазу, дезоксирибонуклеазу и ряд других ферментов нуклеинового обмена. В результате токсического воздействия CCl_4 выявлено снижение содержания магния в сыворотке крови (см. рис. 8, d), прогрессирующее в течение 21 сут наблюдения, что может быть причиной серьезных нарушений обмена нуклеиновых кислот в клетках и, как следствие, нарушения синтеза белка. При лечении животных соединением **2** в обеих дозах уровень магния в сыворотке крови достоверно повышался по сравнению с контролем на 3-е и 11-е сутки введения в дозе 1.7 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ и на 11-е и 21-е сутки — в дозе 0.7 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$. Однако при этом под действием соединения **2** полного восстановления уровня магния не наблюдалось и данный показатель в опытных группах оставался ниже нормативных референсных значений.

Таким образом, получен солеподобный конъюгат **2** лекарственного препарата ксимедон с *para*-аминобензойной кислотой. В экспериментах *in vitro* на клеточной линии нормальных гепатоцитов человека *Chang Liver* изучена цитотоксичность и цитопротекторные свойства соединения **2**. Установлено, что IC_{50} исследованного конъюгата на гепатоцитах *Chang Liver* составляет 20.7 $\text{ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$. Выявлено, что исследуе-

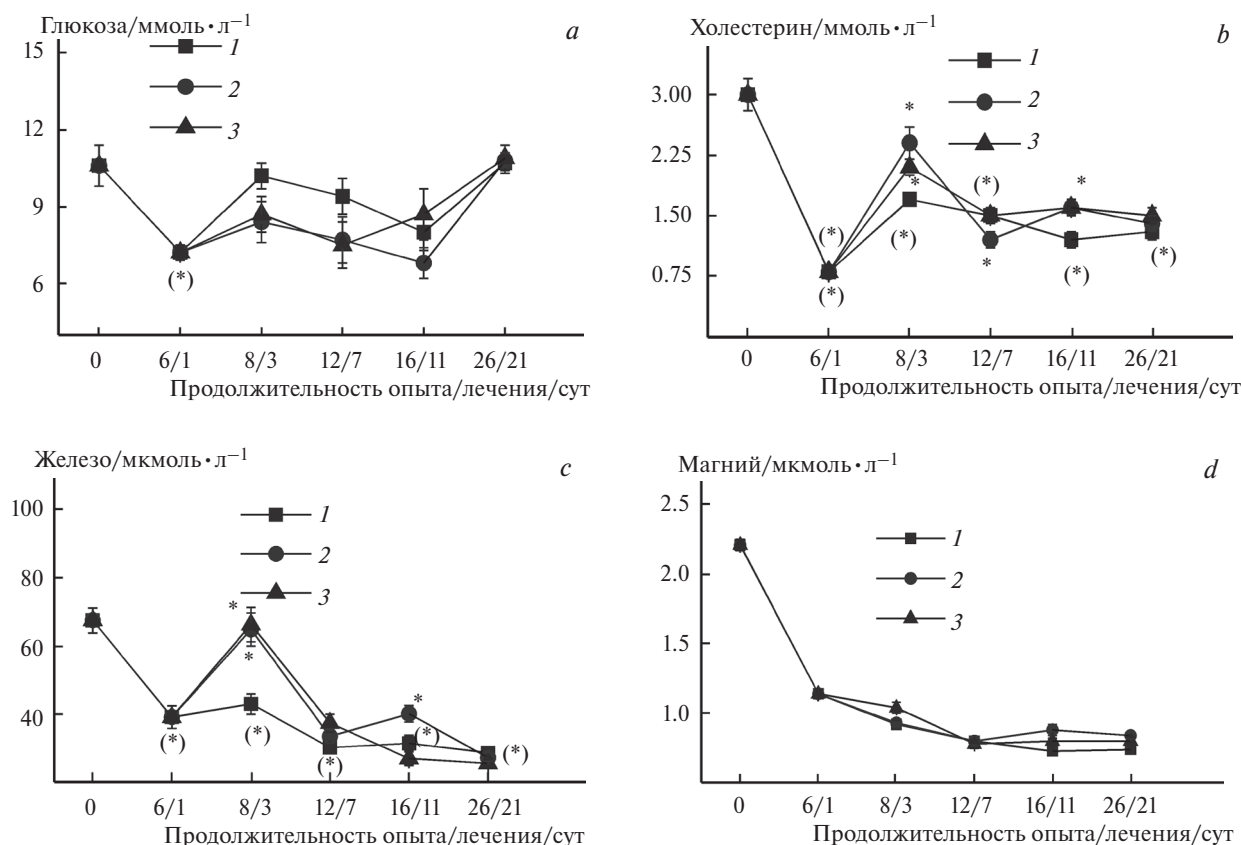


Рис. 8. Влияние соединения **2** на динамику изменения биохимических показателей: уровень глюкозы (а), уровень холестерина (б), уровень железа (с), уровень магния при токсическом CCl_4 -индуцированном гепатите (д); 1 — контроль, 2 и 3 — введение **2** в дозе 0.7 и 1.7 $\text{мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ соответственно.

мое соединение способствует повышению жизнеспособности клеток линии *Chang Liver* в концентрации 25 $\text{мкмоль} \cdot \text{л}^{-1}$ на фоне воздействия токсиканта D-ГЛА в сравнении с контрольной группой клеток, подвергнутых аналогичному воздействию D-ГЛА. В исследованиях *in vivo* на крысах выявлено проявление гепатопротекторных свойств соединения **2**, в наибольшей степени выраженных на ранних сроках терапии CCl_4 -индуцированного токсического гепатита. Выявлена способность соединения **2** снижать площадь некротических повреждений, выявляемых на срезах, окрашенных гематоксилином и эозином на третьи сутки введения, а также уменьшать количество детектируемой инфильтрации гепатоцитов липидами на замороженных срезах, окрашенных суданом черным, на третьи и седьмые сутки введения исследуемого соединения, в сравнении с контрольной группой животных, которой в качестве терапевтического воздействия вместо раствора препаратов вводили физиологический раствор. По биохимическим показателям при лечении животных соединением **2** отмечен положительный эффект на секреторную, синтетическую функции печени, на обмен билирубина, а также на метаболизм железа и магния. Таким образом, конъюгат лекарственной субстанции ксимедон с *para*-аминобензойной кислотой оказывает цитопротекторный *in vitro* и гепатопротекторный *in vivo* эффекты.

Экспериментальная часть

Синтез конъюгата ксимедона с *para*-аминобензойной кислотой (2). Ксимедон (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)пиримидин-2-он) синтезирован по описанной ранее методике²⁰ из 1,2-дигидро-4,6-диметилпиримидин-2-она и 2-хлорэтанола. Изученный конъюгат (соединение **2**) получали согласно методу, описанному в работе⁵: растворением в 50 мл метанола 5 г (29.8 ммоль) соединения **1** и 4.08 г (29.8 ммоль) *para*-аминобензойной кислоты. Выход соединения **2** составил 9.0 г (89%), т.пл. 113–114 °С. Для полученного конъюгата были установлены следующие физико-химические характеристики, описанные в работе⁵. ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3461, 3364, 2675, 1664, 1625, 1442, 1423, 1313, 1292, 1174, 843, 772. Спектр ЯМР ^1H (δ , м.д., $J/\text{Гц}$): 7.65 (д, 2 H, Ar2, $J = 8.6$); 6.70 (д, 2 H, Ar3, $J = 8.6$); 6.40 (с, 1 H, H(5)); 4.06 (т, 2 H, H(1'), $J = 5.4$); 3.81 (т, 2 H, H(2'), $J = 5.4$); 2.39 (с, 3 H, H(6)); 2.26 (с, 3 H, H(4)). Спектр ЯМР ^{13}C (δ , м.д.): 173.91 (C(4)), 171.35 (COO), 161.98 (C(6)), 156.10 (C(2)), 150.36 (C, Ar4), 130.92 (C, Ar2), 120.53 (C, Ar1), 114.40 (C, Ar3), 108.13 (C(5)), 57.86 (C(2')), 47.66 (C(1')), 21.79 (C(4)CH₃), 19.29 (C(6)CH₃). Найдено (%): C, 59.15; H, 6.34; N, 13.64. $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$. Вычислено (%): C, 59.01; H, 6.27; N, 13.76.

Определение цитотоксичности и цитопротекторных свойств *in vitro*. Эксперименты проводили на клеточной линии нормальных гепатоцитов человека *Chang Liver*, полученных из коллекции клеточных культур Научно-исследовательского института вирусологии им. Д. И. Иванковского РАМН. Культивирование клеток осуществляли в среде ИГЛА-МЕМ

с добавлением 10% бычьей сыворотки FBS, 1% незаменимых аминокислот и антибиотика гентамицина²¹.

Клетки открепляли от флакона смесью трипсина и версена в соотношении 1 : 3 и готовили клеточную суспензию с концентрацией 10^5 клеток на 1 мл, распределяли по каплям по 200 мкл суспензии в 96-луночный планшет и инкубировали 24 ч. Для исследования гепатопротекторного эффекта, согласно работе²², вместе с исследуемым соединением вносили токсикант — D-ГЛА в концентрации $150 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$. В качестве референсного контроля интактной группы клеток в ростовую среду при культивировании клеток не вносили соединение 2 и D-ГЛА. В ростовую среду контрольной группы клеток вносили только D-ГЛА. Эксперимент выполняли в трех повторностях.

Для определения количества жизнеспособных клеток готовили полную ростовую среду с флуоресцентными красителями из расчета на одну лунку 198 мкл полной ростовой среды + 2 мкл DAPI либо Hoechst 33342 (концентрация $1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) + 0.5 мкл иодида пропидия. Далее культуральную жидкость заменяли на приготовленную ростовую среду с красителями и инкубировали в течение 45 мин. После инкубирования проводили подсчет жизнеспособных и мертвых клеток на клеточном анализаторе «Cytell Cell Imaging System» («GE Healthcare») с использованием стандартного протокола.

Изучение гепатопротекторной активности *in vivo*. Эксперименты проводили на беспородных взрослых самцах белых крыс с массой тела 300—350 г. Животных содержали в соответствии с положениями^{23,24} в стандартных условиях вивария с 12-часовым световым днем и неограниченным доступом к еде и воде. Животных кормили комплексным кормом, изготовленным в соответствии со Спецификацией (белок 22%, клетчатка не более 4%, жир не более 5%, зола не более 9%, влажность не более 13.5%, калорийность 295 ккал на 100 г). Все исследования и протоколы по работе с животными были одобрены локальным этическим комитетом Казанского (Приволжского) федерального университета (Протокол № 4 от 18 мая 2017 г.).

Схема эксперимента представлена на рисунке 9. Для моделирования повреждения печени согласно методике, указанной в работе²², четыреххлористый углерод вводили перорально в виде 35%-ного масляного раствора, в дозе $1.5 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$. Исследуемое соединение 2 вводили внутривентриально в дозах 0.7 и $1.7 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$, составляющих $1/2500$ и $1/1000$ от ЛД₅₀ соответственно, в течение 21 сут после моделирования токсического повреждения печени. Забор образцов крови и печени осуществляли в соответствии со схемой, представленной на рисунке 9.

Отбор образцов крови осуществляли либо прижизненно, из кончика хвоста, либо при эвтаназии. Сыворотку крови готовили путем двукратного центрифугирования крови при $3000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ и температуре 4°C . Сыворотку до анализа хранили в морозильной камере при температуре -25°C .

Печень для исследований извлекали сразу после эвтаназии животных. Образцы печени для проведения гистологических исследований фиксировали в 4%-ном забуференном формалине. Затем проводили гистологическую проводку на автоматическом гистопроцессоре «Sakura Tissue-Tek® VIP™ 5 Jг». Образцы заливали в парафин и формировали блоки. Делали срезы толщиной 4—5 мкм на микротоме «Sakura Accu-Cut SRM200», после чего их окрашивали гематоксилином и эозином. Для выявления липидов делали замороженные срезы на криотоме «Sakura Tissue-Tek CriO₃» толщиной 5—7 мкм, которые окрашивали суданом черным. В качестве монтирующей среды использовали смесь глицерина и 15%-ного желатина в соотношении 1 : 2 соответственно.

Морфометрический анализ препаратов проводили на прямом световом микроскопе «Nikon H550S» с цифровой камерой «Nikon» и программным обеспечением «NIS Basic Research», как описано в работе⁶. На срезах, окрашенных гематоксилином и эозином, подсчитывали площадь деструктивно-дегенеративных и некротических изменений ткани печени в квадратных микрометрах и считали долю (в процентах) поврежденной области относительно всей видимой площади среза по формуле

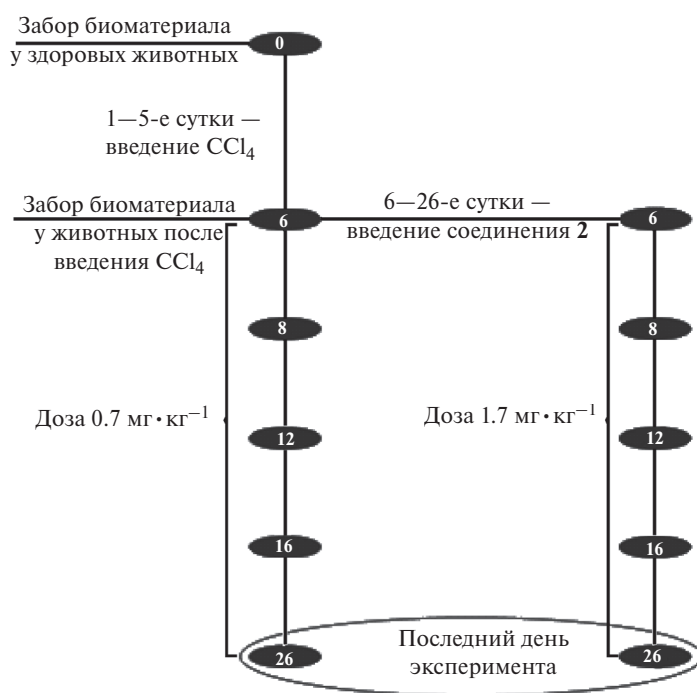


Рис. 9. Схема эксперимента. Контрольные точки эксперимента (продолжительность в сутках от его начала) — забор биоматериала (кровь, печень).

$$\text{Области повреждений печени (\%)} = \frac{\text{Сумма площадей повреждений}}{\text{Общее поле зрения}} \cdot 100\%.$$

На замороженных срезах, окрашенных суданом черным, аналогично определяли площади детекции липидных включений относительно всей видимой площади среза по формуле

$$\text{Области выявления липидов (\%)} = \frac{\text{Сумма площадей выявления липидов}}{\text{Общее поле зрения}} \cdot 100\%.$$

Спектры ЯМР регистрировали на фурье-спектрометре «Avance-500» («Bruker») с рабочей частотой 500.13 МГц (^1H) и 125.77 МГц (^{13}C) в D_2O при температуре 30 °С, внешний стандарт — тетраметилсилан.

Биохимические показатели исследованы в сыворотках крови на автоматическом биохимическом анализаторе «Cobas Integra 400» («Рош», Швейцария) с использованием оригинальных наборов реагентов по протоколу производителя. Были определены следующие показатели сыворотки крови: активности АЛТ, АСТ, лактатдегидрогеназы, ГГТ, сывороточной холинэстеразы, щелочной фосфатазы, концентрации общего и прямого билирубина, альбумина, общего белка, глюкозы, железа и магния, рассчитаны сумма глобулинов, непрямой билирубин²⁵ и коэффициент де Ритиса²⁶.

Список литературы

1. S. Li, H. Y. Tan, N. Wang, Z. J. Zhang, L. Lao, C. W. Wong, *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, **16**, 26087.
2. С. Г. Измайлов, В. В. Паршиков, *Нижегородский медицинский журн.*, 2002, **3**, 81.
3. В. Х. Фазылов, И. Э. Кравченко, А. И. Фазульязнова, Ф. С. Гилмуллин, *Методические рекомендации для врачей (научный обзор клинических исследований)*, Изд-во КГМУ, Казань, 2010, 40 с.
4. А. Б. Выштакалюк, В. Э. Семенов, И. А. Судаков, К. Н. Бушмелева, Л. Ф. Гумарова, А. А. Парфенов, Н. Г. Назаров, И. В. Галяметдинова, В. В. Зобов, *Изв. АН. Сер. хим.*, 2018, 705 [A. B. Vyshtakalyuk, V. E. Semenov, I. A. Sudakov, K. N. Bushmeleva, L. F. Gumarova, A. A. Parfenov, N. G. Nazarov, I. V. Galyametdinova, V. V. Zobov, *Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.)*, 2018, **67**, 705].
5. 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, *Биоорганическая химия*, 2017, **43**, 572 [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. Cherepnev, M. S. Shashin, V. S. Reznik, *Russ. J. Bioorg. Chem. (Engl. Transl.)*, 2017, **43**, 604].
6. A. Vyshtakalyuk, A. Parfenov, L. Gumarova, N. Nazarov, V. Zobov, I. Galyametdinova, V. Semenov, *BioNanoScience*, 2017, **7**, 616.
7. A. Vyshtakalyuk, A. Parfenov, N. Nazarov, L. Gumarova, G. V. Cherepnev, I. V. Galyametdinova, V. V. Zobov, V. E. Semenov, *BioNanoScience*, 2018, **8**, 845.
8. Т. В. Пovyшева, В. Э. Семенов, И. В. Галяметдинова, В. С. Резник, К. С. Кнни, Р. Е. Колесников, Ю. А. Чельшев, *Бюл. экп. биол. мед.*, 2016, **162**, № 8, 183 [T. V. Povyshov, V. E. Semenov, I. V. Galyametdinova, V. S. Reznik, K. S. Knni, P. E. Kolesnikov, Y. A. Chelyshev, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2016, **162**, No. 8, 220].
9. N. J. Babu, A. Nangia, *Cryst. Growth. Des.*, 2011, **11**, 2662.
10. Z. Li, A. J. Matzger, *Mol. Pharm.*, 2016, **13**, 990.
11. R. Thakuria, B. Sarma, *Crystals*, 2018, **8**, 101.
12. K. V. Drozd, A. N. Manin, A. V. Churakov, G. L. Perlovich, *CrystEngComm*, 2017, **19**, 4273.
13. L. Roy, M. P. Lipert, N. Rodriguez-Hornedo, in *Pharmaceutical Salts and Co-crystals*, Eds J. Wouters, L. Quere, Royal Society of Chemistry, 2012, p. 247.
14. Я. А. Иваненков, С. Ю. Маклакова, Е. К. Белоглазкина, Н. В. Зык, А. Г. Назаренко, А. Г. Тоневитский, В. Э. Котелянский, А. Г. Мажуга, *Успехи химии*, 2017, **86**, 750 [Ya. A. Ivanenkov, S. Yu. Maklakova, E. K. Beloglazkina, N. V. Zyk, A. G. Nazarenko, A. G. Tonevitsky, V. E. Kotelianski, A. G. Majouga, *Russ. Chem. Rev.*, 2017, **86**, 750].
15. Н. Н. Дрозд, В. А. Макаров, Н. Т. Мифтахова, С. А. Калугин, О. Г. Строева, С. И. Акберова, *Онтогенез*, 2000, **31**, 265 [N. N. Drozd, V. A. Makarov, N. T. Miftakhova, S. A. Kalugin, O. G. Stroeve, S. I. Akberova, *Russ. J. Development. Biol.*, 2000, **31**, 217].
16. Т. П. Гальбинур, Е. А. Новикова, *Офтальмология*, 2012, **9**, 57.
17. А. Л. Киселев, Г. М. Воробьев, *Вестн. Рос. гос. заочного аграрного ун-та*, 2006, **1**, 129.
18. R. Mugunthu, A. Jill, C. Bykowski, G. Jeffrey, H. Ando, W. Paul, *J. Chromatogr. B*, 2008, **867**, 247.
19. Т. В. Пovyшева, В. Э. Семенов, И. В. Галяметдинова, В. С. Резник, К. С. Кнни, П. Е. Колесников, С. В. Кузнецова, Ю. А. Чельшев, *Эксперим. и клин. фармакология*, 2016, **79**, № 8, 3.
20. В. С. Резник, Н. Г. Пашкуров, *Изв. АН. Сер. хим.*, 1966, 1613 [V. S. Reznik, N. G. Pashkurov, *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci. (Engl. Transl.)*, 1966, **15**, 1554].
21. R. I. Freshney, *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, 7th ed., Wiley-Blackwell, 2016, 728 pp.
22. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I*, под ред. А. Н. Миронова, Гриф и К, Москва, 2012, 944 с.
23. *National Research Council et al. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, National Academies Press, 2010, 246 pp.
24. *EC Committee Guidance on Management and Care of Animals Used for Experiments and Other Research Purposes*, 2007/526/EC, of June 18th 2007.
25. Е. С. Северин, Т. Л. Алейникова, Л. В. Авдеева, Л. Е. Андрианова, Н. Н. Белушкина, Н. П. Волкова, С. А. Воробьева, В. А. Голенченко, А. Е. Губарева, О. В. Корлякова, Н. В. Лихачева, Н. А. Павлова, Г. В. Рубцова, С. А. Силаева, С. Н. Силюянова, Т. А. Титова, *Биохимия: Учебник*, под ред. Е. С. Северина, 2-е изд., ГЭОТАР-МЕД, Москва, 2004, с. 472.
26. Г. Р. Колоколов, Е. В. Герасина, О. Л. Ананьев, С. Ю. Шашлова, В. Н. Шилов, О. В. Ананьева, А. Ю. Полянина, *Анализы. Полный справочник*, Эскмо, Москва, 2008, с. 218.

Поступила в редакцию 5 марта 2019;
после доработки — 31 июля 2019;
принята к публикации 4 октября 2019