

Сравнительная оценка гепатопротекторных свойств «сдвоенных» производных 4,6-диметил-1,2-дигидро-1-(2-гидроксиэтил)пиримидин-2-она*

Г. П. Беляев,^{*} А. Б. Выштакалюк, А. А. Парфенов, М. С. Шашин,
И. В. Галяметдинова, В. Э. Семенов, В. В. Зобов

Институт органической и физической химии имени А. Е. Арбузова
Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук»,
Российская Федерация, 420088 Казань, ул. Академика Арбузова, 8.
Факс: (843) 273 1872. E-mail: gregoir4@gmail.com; alex.vysh@mail.ru

Проведено углубленное сравнительное исследование *in vitro* и *in vivo* гепатопротекторных свойств некоторых «сдвоенных» производных 4,6-диметил-1,2-дигидро-1-(2-гидроксиэтил)пиримидин-2-она (лекарственное средство «Ксимедон», **1**), в которых фрагменты **1** соединены между собой сложноэфирными мостиками с различным содержанием метиленовых групп (сукцинат (**2a**), адипинат (**2b**), суберат (**2c**)). Определено влияние «сдвоенных» производных соединения **1** на клеточный цикл культуры клеток Chang Liver. В исследованиях *in vivo* на крысах линии Wistar изучены гепатопротекторные свойства соединений **2a** и **2b**. Показано, что соединения **2a**—с восстанавливают пролиферативную активность клеток Chang Liver на фоне воздействия токсиканта D-галактозамина, причем **2a** и **2b** — в наиболее широком диапазоне концентраций, проявляя большую активность по сравнению с **2c**. Соединение **2b** оказалось наиболее эффективным, вызывая максимальное повышение числа клеток в фазе G₂/M клеточного цикла и действуя в диапазоне концентраций от 62.5 до 250 мкмоль·л⁻¹ аналогично соединению **1**. В исследованиях *in vivo* показано, что «сдвоенные» производные **2a** и **2b** обладают менее выраженными гепатопротекторными свойствами по сравнению с исходным соединением **1**, поскольку аналогичный эффект проявляется при их применении в дозах, превышающих минимальную эффективную дозу «Ксимедона» (0.24 мг·кг⁻¹) в 7.5 и 2.7 раза соответственно.

Ключевые слова: пиримидины, «Ксимедон», четыреххлористый углерод, токсический гепатит, гепатопротекторы.

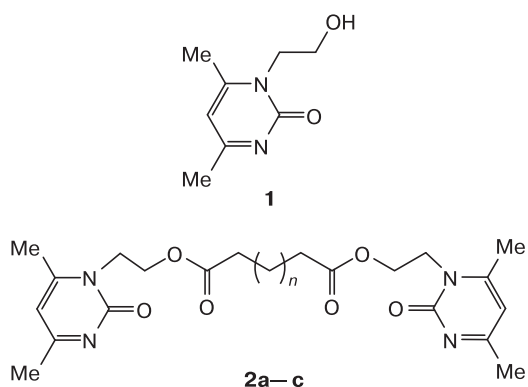
Несмотря на прогресс медицины, заболевания печени остаются тяжелым бременем для системы здравоохранения и являются причиной смерти около 2 млн человек в мире в год¹. Широкое распространение ожирения, диабета, вирусных гепатитов и потребления алкоголя остаются важными факторами развития хронических заболеваний печени, а применение человеком различных лекарственных средств является основной причиной острого поражения печени². Кроме того, прогнозируется увеличение как острых, так и хронических заболеваний печени¹. Таким образом, поиск эффективных гепатопротекторов остается актуальной задачей и поможет улучшить здоровье населения.

Пиримидины и их производные известны своей высокой биологической активностью^{3,4}, показана их противоопухолевая, антибактериальная актив-

ность^{5,6}. Для некоторых производных пиримидинов также выявлена антигепатотоксическая активность⁷. Одним из таких производных пиримидина является «Ксимедон» — отечественное лекарственное средство. «Ксимедон», 4,6-диметил-1,2-дигидро-1-(2-гидроксиэтил)пиримидин-2-он (**1**), известен своей способностью активировать регенерацию тканей⁸. Кроме того, показаны⁹ гепатопротекторные эффекты «Ксимедона», однако не угасает интерес к модификациям соединения **1**, способным усилить его свойства. Цель данной работы — углубленное сравнительное исследование гепатопротекторных свойств новых «сдвоенных» производных соединения **1**, две молекулы которого связаны сложноэфирным мостиком с различным числом метиленовых групп в его составе. Синтез «сдвоенных» производных **1** и первичная оценка гепатопротекторных свойств впервые описаны в работе¹⁰, где выявлены соединения, проявившие наибольшую активность при первичной оценке, — это «сдвоенные» производные, в которых фрагменты **1** соединены сукци-

* По материалам 5-й Российской конференции по медицинской химии «МедХим-Россия 2022» с международным участием (г. Волгоград, 16—19 мая 2022 г.).

натным, адипинатным и субератным мостиками (соединения **2a–c** соответственно).



2: $n = 0$ (a), 2 (b), 4 (c)

Обсуждение полученных результатов

Оценка влияния соединений на клеточный цикл *in vitro*. Концентрации веществ для углубленной оценки влияния «сдвоенных» производных соединения **1** на клеточный цикл культуры клеток Chang Liver выбраны на основании предыдущего исследования по оценке цитопротекторных свойств данных соединений¹⁰. Влияние «сдвоенных» пиримидинов на клеточный цикл оценено как в отсутствие токсиканта D-галактозамина (ГЛА) (рис. 1), так и при его добавлении (рис. 2).

Изучение влияния «сдвоенных» пиримидинов на клеточный цикл в отсутствие токсиканта показало, что под воздействием этих соединений происходит статистически значимое увеличение числа клеток в фазе G_2/M (постсинтетической/мито-

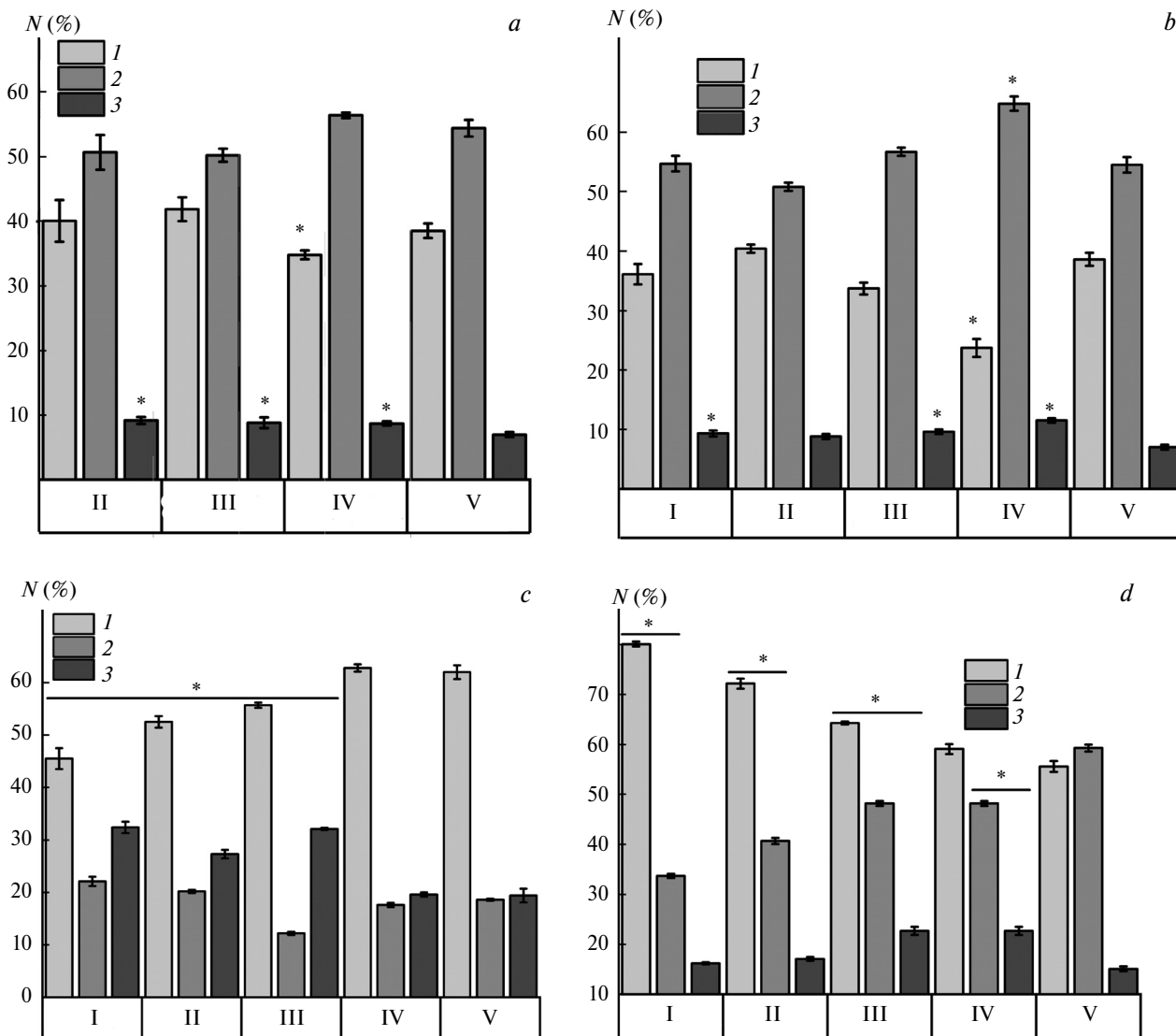


Рис. 1. Влияние соединений **1** (a) и **2a–c** (b–d соответственно) на фазы клеточного цикла (1 – фаза G_0/G_1 (покоя/пресинтетическая), 2 – фаза S (синтетическая), 3 – фаза G_2/M (постсинтетическая/митотическая)) в отсутствие токсиканта; N – число клеток. Концентрация соединений **1** и **2a–c**: 62.5 (I), 125 (II), 250 (III) и 500 мкмоль·л⁻¹ (IV); V – интактная группа клеток. * Различия с интактной группой достоверны по тесту ANOVA с апостериорным критерием Тьюки при $p < 0.05$.

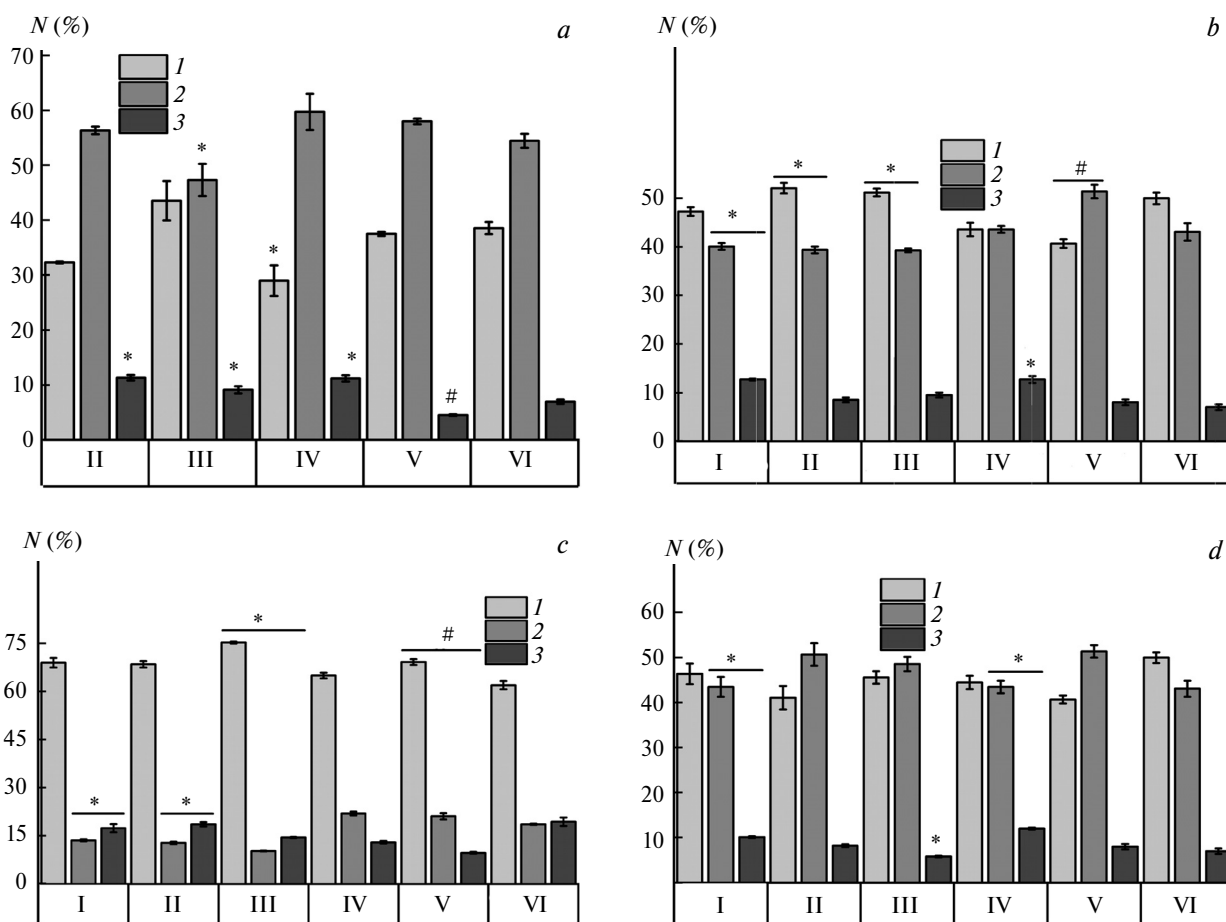


Рис. 2. Влияние соединений **1** (a) и **2a–c** (b–d соответственно) на фазы клеточного цикла (1 — G_0/G_1 -фаза, 2 — S-фаза, 3 — G_2/M -фаза) при воздействии токсиканта ГЛА; N — число клеток. Концентрация соединений **1** и **2a–c**: 62.5 (I), 125 (II), 250 (III) и 500 $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$ (IV); V — контрольная группа (токсикант ГЛА); VI — интактная группа клеток. * Различия с контрольной группой ГЛА достоверны по ANOVA с апостериорным критерием Тьюки при $p < 0.05$. # Различия с интактной группой достоверны по ANOVA с апостериорным критерием Тьюки при $p < 0.05$.

тической) клеточного цикла по сравнению с интактной группой клеток, что говорит об активации клеточного деления под воздействием изучаемых соединений. При этом соединения **2a** и **2b** проявили эффект в более широком диапазоне концентраций (**2a**: 62.5, 250 и 500 $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$, и **2b**: 62.5, 125 и 250 $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$) по сравнению с соединением **1**, которое демонстрирует пролиферирующий эффект в трех дозах (125, 250 и 500 $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$). Соединение **2c** показало достоверное увеличение числа клеток в G_2/M -фазе клеточного цикла по сравнению с интактной группой клеток лишь в двух максимальных дозах — 250 и 500 $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$, что говорит о его меньшей эффективности. Как следует из рисунка 1, соединение **2b** вызвало наибольшее увеличение числа клеток в фазе G_2/M , т.е. проявило больший эффект даже по сравнению с исходным соединением **1**.

При воздействии токсиканта ГЛА в концентрации 55 $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$ выявлено достоверное увеличение числа клеток в S-фазе и уменьшение клеток в G_2/M -фазе клеточного цикла в отличие от интактной группы, что показывает ингибирование

пролиферативной активности. Тогда как при воздействии соединения **2b** в трех изучаемых концентрациях — 62.5, 125 и 250 $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$ наблюдается обратный статистически значимый эффект перехода клеток из S-фазы в G_2/M -фазу клеточного цикла, что говорит о восстановлении пролиферативной активности клеток. Аналогично для исходного соединения **1** наблюдается увеличение числа клеток в G_2/M -фазе клеточного цикла в трех изучаемых концентрациях — 125, 250 и 500 $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$, однако соединение **1** оказывает более выраженный цитопротекторный эффект¹⁰. При этом соединения **2a**, **2c** приводят к достоверному усилению перехода клеток в G_2/M -фазу клеточного цикла лишь в двух дозах — 62.5 и 500 $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$. Кроме того, при воздействии соединения **2c** в дозе 250 $\mu\text{моль} \cdot \text{л}^{-1}$ наблюдалось даже снижение числа клеток в фазе G_2/M .

Таким образом, в результате углубленной оценки цитопротекторных свойств, а именно влияния «сдвоенных» пиримидинов на клеточный цикл *in vitro*, для дальнейшей оценки гепатопротекторных свойств *in vivo* отобраны соединения **2a** и **2b**,

поскольку **2a** обладает самой высокой цитопротекторной активностью и наименьшей цитотоксичностью¹⁰ и при этом достаточно эффективно восстанавливает пролиферативную активность клеток после воздействия ГЛА *in vitro*, а **2b** проявляет наиболее выраженное влияние на пролиферативную активность.

Изменение массы тела и массового коэффициента (МК) печени. В процессе выполнения эксперимента *in vivo* серьезных различий в массе тела животных контрольных и опытных групп не наблюдалось. При исследовании воздействия соединения **2a** на МК печени крыс существенных различий между группами не обнаружено (данные не представлены).

При изучении влияния соединения **2b** на МК печени крыс показано (рис. 3), что при дозах 0.24, 0.65 и 1.94 мг·кг⁻¹ наблюдается тенденция к снижению МК печени (3.12±0.07, 3.21±0.13 и 3.11±0.06% соответственно) по сравнению с контрольной группой (3.51±0.13%). Введение исходного соединения **1** в дозе 0.24 мг·кг⁻¹ оказало наибольшее влияние на МК печени, приводя к его достоверному ($p = 0.003$) снижению (2.88±0.12%) по сравнению с контролем.

Оценка патоморфологических изменений ткани печени. Анализ срезов ткани печени крыс, окрашенных гематоксилином и эозином, показал нарушения структуры ткани после воздействия СС₁₄. Наблюдаются очаги стеатоза и некроза гепатоцитов, распространяющиеся от центра дольки печени к ее периферии.

При воздействии соединения **2a** выявлено, что с увеличением дозы вещества уменьшается площадь повреждения ткани печени (рис. 4 и 5).

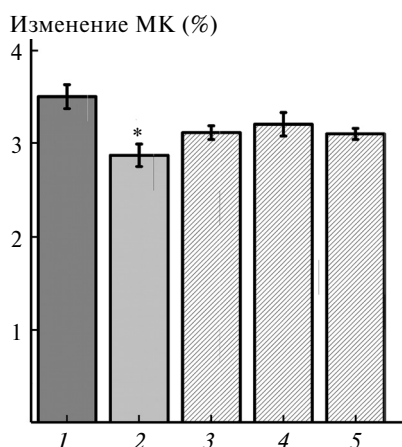


Рис. 3. Изменение МК печени крыс с острым токсическим гепатитом при введении **1** и **2b**: 1 — контрольная группа, 2 — соединение **1** в дозе 0.24 мг·кг⁻¹, 3—5 — соединение **2b** в дозе 0.24, 0.65 и 1.94 мг·кг⁻¹ соответственно. * Различия с контрольной группой достоверны по ANOVA с апостериорным критерием Тьюки при $p^* < 0.05$.

Показано, что соединение **2a** в дозе 0.24 мг·кг⁻¹ не оказало достоверного ($p = 0.43$) гепатопротекторного эффекта (площадь повреждений 76.82±2.95%) по сравнению с контрольной группой (81.57±6.42%). Однако при введении соединения **2a** в дозе 0.6 мг·кг⁻¹ наблюдается тенденция ($p = 0.02$) к уменьшению площади повреждения печени (61.02±5.9%) по сравнению с контролем, тогда как при введении соединения **2a** в дозе 1.8 мг·кг⁻¹ показано статистически значимое ($p < 0.0001$) снижение площади повреждения печени (36.5±2.41%) по сравнению с контрольной группой. При введении исходного соединения **1** в дозе 0.24 мг·кг⁻¹ также показано достоверное ($p < 0.0001$) снижение площади повреждения печени (32.09±2.66%) по сравнению с контролем. Интересно отметить, что эффекты соединения **2a** в дозе 1.8 мг·кг⁻¹ и соединения **1** в дозе 0.24 мг·кг⁻¹ не отличаются. Полученные результаты показывают, что эффективная доза соединения **2a**, приводящая к достоверному снижению площади повреждения ткани печени, в 7.5 раза выше, чем доза соединения **1**, проявляющая аналогичное действие.

При введении соединения **2b** в дозе 0.24 мг·кг⁻¹ (рис. 6 и 7) также не наблюдается достоверное ($p = 0.28$) снижение площади повреждения печени (71.22±3.47%) по сравнению с контрольной группой (79.69±4.32%). Однако с увеличением дозы вещества происходит уменьшение площади повреждения печени: при введении соединения **2b** в дозе 0.65 мг·кг⁻¹ наблюдается усиление гепатопротекторного эффекта и достоверное ($p < 0.0001$) снижение площади поражения печени (50.7±4.12%) по сравнению с контролем. При этом эффект соединения **2b** в дозе 0.65 мг·кг⁻¹ сопоставим с эффектом исходного соединения **1** в дозе 0.24 мг·кг⁻¹, приводящим к достоверному ($p < 0.0001$) уменьшению площади повреждения печени (42.12±2.15%). При увеличении дозы соединения **2b** до 1.94 мг·кг⁻¹ наблюдается достоверное ($p = 0.0046$) снижение площади поражения печени (60.0±3.1%) по сравнению с контролем, однако этот эффект менее выражен, чем при дозе 0.65 мг·кг⁻¹. Таким образом, эффективная доза соединения **2b** (0.65 мг·кг⁻¹) в 2.7 раза выше, чем доза соединения **1** (0.24 мг·кг⁻¹), проявляющая аналогичное действие. Следовательно, соединение **2b** проявляет гепатопротекторный эффект в более низкой дозе по сравнению с соединением **2a**.

Таким образом, в проведенной работе выполнено углубленное исследование влияния «сдвоенных» производных пиримидинов **2a—c** на регенерацию и репарацию клеток печени *in vitro* и *in vivo*. Для изучения влияния соединений на клеточный цикл выбрана клеточная линия Chang Liver, так как

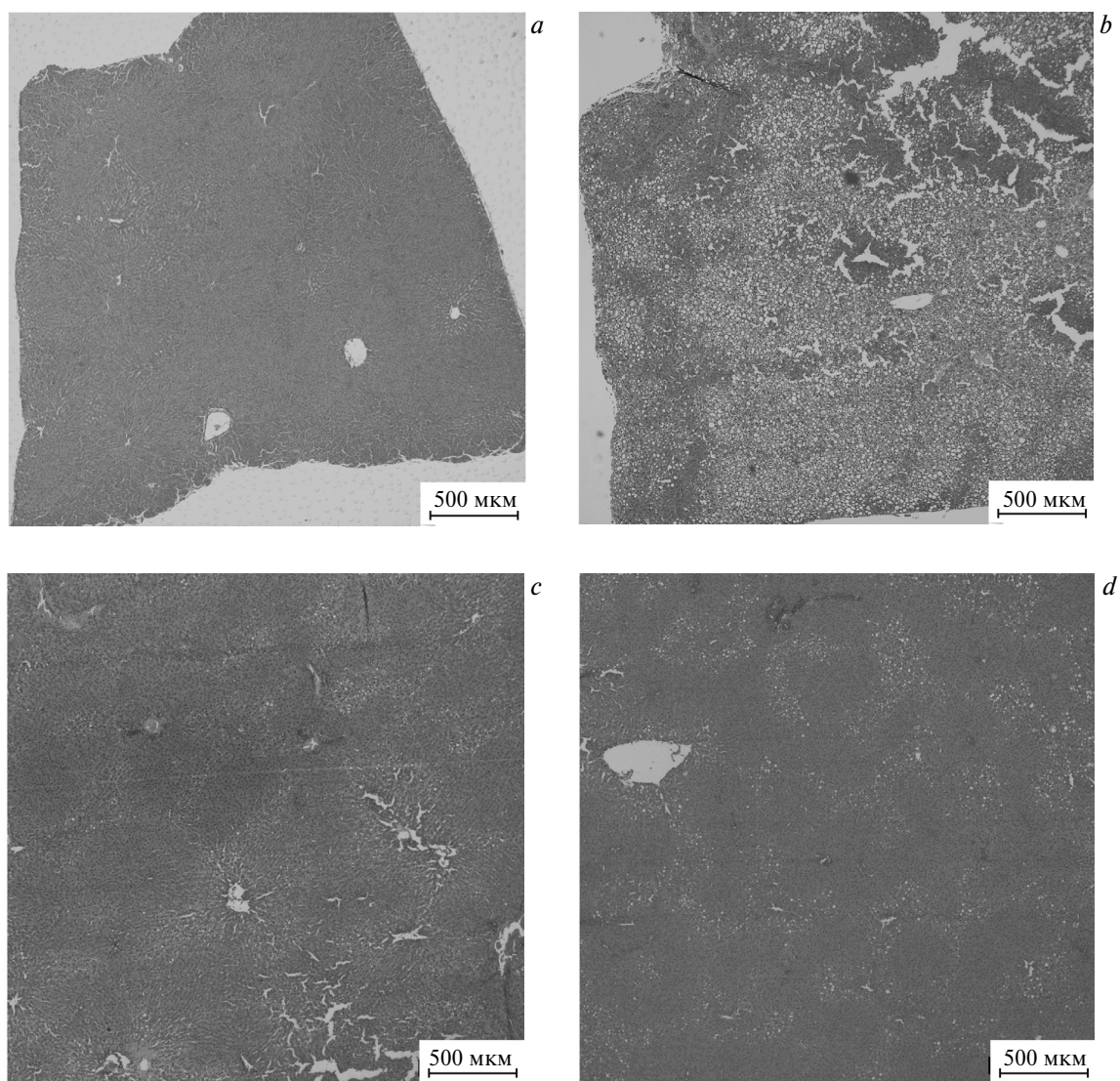


Рис. 4. Влияние соединений **1** и **2a** на морфологию ткани печени крыс: *a* — группа интактного контроля, *b* — контрольная группа, *c* — соединение **1** в дозе $0.24 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$, *d* — эффективная доза $1.8 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ соединения **2a**. Окраска гематоксилином и эозином; увеличение $\times 40$.

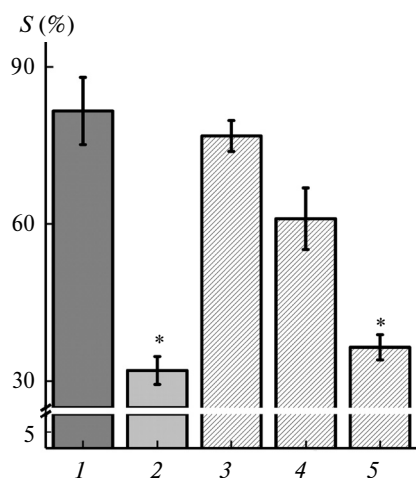


Рис. 5. Изменение площади повреждения (*S*) ткани печени крыс с острым токсическим гепатитом при введении соединений **1** и **2a**: *1* — контрольная группа, *2* — соединение **1** в дозе $0.24 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$, *3–5* — соединение **2a** в дозе 0.24 , 0.6 и $1.8 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ соответственно. * Различия с контрольной группой достоверны по критерию Крускала—Уоллиса и апостериорному тесту Данна с поправкой Бонферрони при уровне значимости $p^* < 0.0051$.

для данной линии отмечена экспрессия белков, свойственных гепатоцитам человека, в частности щелочной фосфатазы печеночного типа¹¹. Показано, что соединения **2a–c** активируют пролиферацию клеток на фоне воздействия токсиканта ГЛА, механизм действия которого связан с ингибированием синтеза белка и остановкой клеточного цикла на стадии S-фазы^{12,13}. При этом соединение **2b** восстанавливает пролиферацию клеток сравнимо с исходным соединением **1**. Такая активация пролиферации клеток может объяснять полученный ранее цитопротекторный эффект этих соединений¹⁰, однако цитопротекторный эффект исходного соединения **1** более выражен¹⁰, чем у его производных. Возможно, это связано с тем, что соединение **1** не только усиливает пролиферацию клеток, но и оказывает цитопротекторный эффект *in vitro*.

Для соединений **2a** и **2b** изучена гепатопротекторная активность *in vivo*. В ходе моделирования у крыс токсического гепатита, вызванного введе-

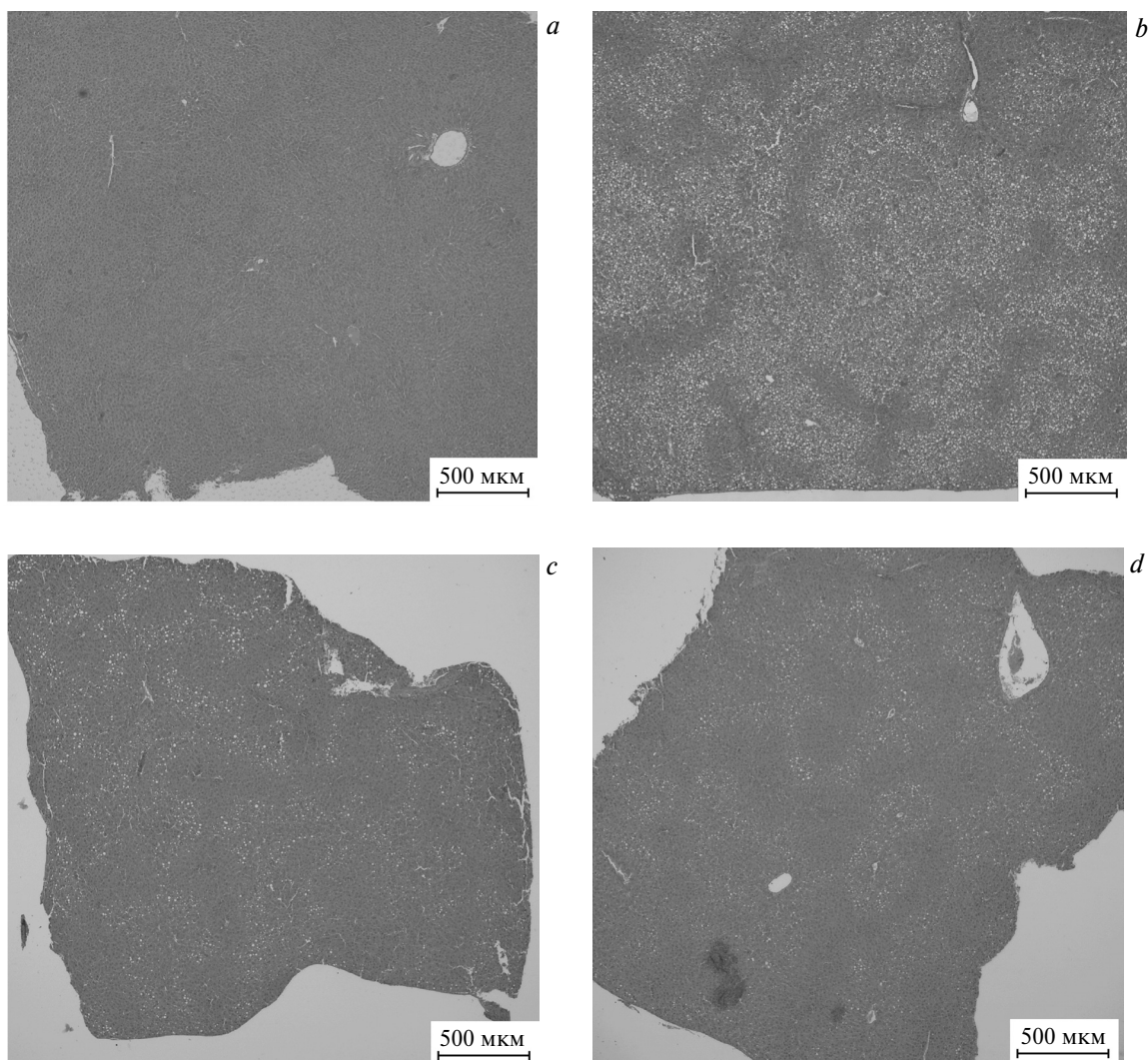


Рис. 6. Влияние соединений **1** и **2b** на морфологию ткани печени крыс: *a* — группа интактного контроля, *b* — контрольная группа, *c* — соединение **1** в дозе $0.24 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$, *d* — эффективная доза соединения **2b** $0.65 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 40$.

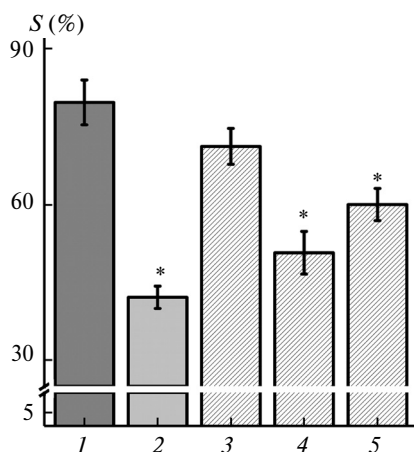


Рис. 7. Изменение площади повреждения (*S*) ткани печени крыс с острым токсическим гепатитом при введении соединений **1** и **2b**: *1* — контрольная группа, *2* — соединение **1** в дозе $0.24 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$, *3–5* — соединение **2b** в дозе 0.24, 0.65 и $1.94 \text{ мг} \cdot \text{кг}^{-1}$ соответственно. * Различия с контрольной группой достоверны по критерию Крускала—Уоллиса и апостериорному тесту Данна с поправкой Бонферрони при уровне значимости $p^* < 0.0051$.

нием четыреххлористого углерода, наблюдались изменения, соответствующие литературным данным, связанные с нарушениями ткани печени^{14–16}. Под воздействием соединений **2a**, **2b** наблюдается уменьшение площади повреждения печени, но для того, чтобы изучаемые соединения оказали гепатопротекторный эффект, аналогичный эффекту при применении соединения **1**, необходимо введение дозы соединения **2a** в 7.5 раза выше, а соединения **2b** — в 2.5 раза выше дозы **1**, что говорит об их меньшей эффективности.

Как известно, основным механизмом повреждающего действия CCl_4 на печень является окислительный стресс и последующее перекисное окисление липидов¹⁷. Поэтому первым механизмом гепатопротекторного эффекта соединения **1** можно предположить его антиоксидантную активность. Однако в работе¹⁸ отмечено, что соединение **1** не оказывает прямого антирадикального воздействия; при этом для соединения **1** показано некоторое замедление перекисного окисления липидов

по маркеру малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови крыс после воздействия CCl_4 ¹⁸. Такое опосредованное действие соединения **1** на антиоксидантную систему организма, возможно, связано с изменением уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в гепатоцитах и последующей модификацией экспрессии генов. Так, в работе¹⁹ показано, что соединение **1** оказывает регулирующее влияние на аденилатциклазу и приводит к изменению уровня цАМФ в иммунокомпетентных клетках. Кроме того, известно, что повышение уровня цАМФ в гепатоцитах снижает оксидативный стресс при алкогольном гепатите²⁰. Также цАМФ как вторичный посредник способен влиять на множество других важных процессов в клетках²¹, таких как гибель (путем апоптоза или аутофагии)^{22,23} и рост клеток^{24,25}. Однако влияние цАМФ во многом зависит от типа клетки. Так, есть данные, что цАМФ активирует пролиферацию гепатоцитов, эпителиальных клеток, но ингибирует деление фибробластов и клеток гладких мышц^{26,27}. Таким образом, моделируя регуляцию роста или гибели клеток через цАМФ, можно разработать новые стратегии лечения заболеваний²⁸. Однако «сдвоенные» производные соединения **1** не усилили эффект исходной молекулы, а наоборот, показали меньшую способность к активации регенерации клеток печени, что объясняет их меньший гепатопротекторный эффект. Можно предположить, что данное снижение эффективности «сдвоенных» производных связано с подавлением активности молекулы **1** из-за закрытия активного центра соединения в ходе ее модификации. Кроме того, «сдвигание» молекул **1** увеличило молекулярную массу полученных соединений, что могло повлиять на биодоступность веществ *in vivo*. Однако «сдвоенные» производные все же оказали гепатопротекторный эффект, аналогичный эффекту соединения **1**, но при больших дозах. Возможно, что это связано с распадом «сдвоенной» молекулы на части внутри организма, из-за чего активный центр исходной молекулы стал снова доступен, однако для такого эффекта необходима большая доза изучаемых веществ, что делает такую модификацию соединения **1** нецелесообразной для дальнейшего применения в качестве гепатопротектора.

Таким образом, несмотря на выявленное цитопротекторное¹⁰ и пролиферирующее действие «сдвоенных» производных соединения **1** на культуру клеток Chang Liver, при введении в организм животных данные соединения оказываются менее эффективными по сравнению с исходной молекулой.

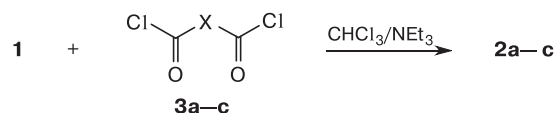
В результате углубленного изучения некоторых «сдвоенных» пиримидинов, полученных в результате модификации **1**, являющегося основой отече-

ственного лекарственного средства «Ксимедон», выявлены их гепатопротекторные свойства. При оценке влияния «сдвоенных» пиримидинов на клеточный цикл *in vitro* показано, что соединения **2a–c** способны ускорять пролиферацию клеток как при воздействии токсиканта ГЛА, так и в отсутствие последнего. При этом соединение **2b** проявляет наиболее выраженный эффект на пролиферативную активность клеток, сходный с воздействием «Ксимедона», вызывая максимальное повышение числа клеток в фазе G_2/M клеточного цикла и проявляя эффект в диапазоне концентраций от 62.5 до 250 мкмоль \cdot л⁻¹. Показано, что на модели токсического гепатита *in vivo* под воздействием «сдвоенных» пиримидинов происходит уменьшение площади повреждения ткани печени. Однако выявленные гепатопротекторные свойства исследованных «сдвоенных» производных соединения **1** менее выражены по сравнению с исходной молекулой. Так, эффективная доза соединения **2a** в 7.5 раза, а соединения **2b** — в 2.7 раза выше, чем эффективная доза исходного «Ксимедона», приводящая к аналогичному снижению площади повреждения печени. Таким образом, в ходе проведенного исследования выявлено, что модификация «Ксимедона» путем «сдвигания» исходной молекулы **1** не привела к «удвоению» эффекта «Ксимедона». Это говорит о том, что для повышения гепатопротекторной эффективности необходимы другие модификации данного соединения с учетом его возможного взаимодействия с рецепторами клетки.

Экспериментальная часть

Синтез «сдвоенных» пиримидинов впервые описан в работе¹⁰ (схема 1). Исходное соединение **1** получили из 1,2-дигидро-4,6-диметилпиримидин-2-она и 2-хлорэтанола по известной методике²⁹. Структуры полученных соединений подтверждены методами ЯМР- и ИК-спектроскопии и масс-спектрометрии.

Схема 1



X = $(\text{CH}_2)_n$, n = 0 (**a**), 2 (**b**), 3 (**c**)

Спектры ЯМР ¹H записывали на фурье-спектрометре «Avance-400» («Bruker», Германия) с рабочей частотой 400 МГц при 30 °С, в качестве внутреннего стандарта использовали Me₄Si.

Масс-спектры MALDI-TOF регистрировали на спектрометре «ULTRAFLEX III» («Bruker»), матрица — паранитроанилин.

ИК-спектры соединений записывали в тонком слое или в таблетках с KBr на фурье-спектрометре «Vector 22» («Bruker»).

Содержание C, N, H определяли на CHNS-анализаторе «Vario MACRO Cube» («Elementar Analysensysteme», Германия).

1,4-Бис[2-(1,2-дигидро-4,6-диметил-2-оксопиримидин-1-ил)этил]бутандиоат (2a)¹⁰. Кристаллы красного цвета, выход 2.50 г (34%), т.пл. 143–144 °С. Найдено (%): C, 57.52; H, 6.19; N, 13.43. C₂₀H₂₆N₄O₆. Вычислено (%): C, 57.41; H, 6.26; N, 13.39. ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3052, 2961, 1736, 1649, 1608, 1541, 1305, 1151, 1042, 1025, 931, 796. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д.): 6.10 (с, 1 H, H(5)); 4.40–4.36 (м, 4 H, H(2')); 4.24–4.20 (м, 4 H, H(1')); 3.13–3.05 (м, 4 H, H(4'), H(5')); 2.39 (с, 6 H, H(6)); 2.33 (с, 6 H, H(4)). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 175.0 (C(3')), 172.3 (C(4)), 157.4 (C(6)), 155.7 (C(2)), 105.9 (C(5)), 60.7 (C(2')), 45.9 (C(1')), 35.0 (C(4')), C(5'), 25.0 (C(4)C), 24.4 (C(6)C). Масс-спектр (MALDI-TOF): найдено m/z 418.8 [M + H]⁺, 440.8 [M + Na]⁺, 456.8 [M + K]⁺; вычислено для C₂₀H₂₆N₄O₆ 419.2, 441.2, 457.2.

1,6-Бис[2-(1,2-дигидро-4,6-диметил-2-оксопиримидин-1-ил)этил]гександиоат (2b)¹⁰. Масло красного цвета, выход 2.70 г (35%). Найдено (%): C, 59.22; H, 6.89; N, 12.43. C₂₂H₃₀N₄O₆. Вычислено (%): C, 59.18; H, 6.77; N, 12.55. ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 2970, 1736, 1654, 1606, 1543, 1176, 1040, 941, 795. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д.): 6.06 (с, 1 H, H(5)); 4.40–4.35 (м, 4 H, H(2')); 4.22–4.17 (м, 4 H, H(1')); 2.37 (с, 6 H, H(6)); 2.30 (с, 6 H, H(4)); 2.26–2.23 (м, 4 H, H(4'), H(9')); 1.59–1.56 (м, 4 H, H(5'), H(6')). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 174.8 (C(3')), 173.0 (C(4)), 157.1 (C(6)), 155.1 (C(2)), 105.8 (C(5)), 61.5 (C(2')), 46.0 (C(1')), 33.6 (C(4'), C(7')), 24.9 (C(4)C), 24.4 (C(5')), C(6')), 24.0 (C(6)C). Масс-спектр (MALDI-TOF): найдено m/z : 447.2 [M + H]⁺, 469.2 [M + Na]⁺; вычислено для C₂₂H₃₀N₄O₆ 447.2, 469.2.

1,8-Бис[2-(1,2-дигидро-4,6-диметил-2-оксопиримидин-1-ил)этил]октандиоат (2c)¹⁰. Кристаллы красного цвета, выход 3.75 г (47%), т.пл. 105–106 °С. Найдено (%): C, 60.82; H, 7.29; N, 11.73. C₂₄H₃₄N₄O₆. Вычислено (%): C, 60.74; H, 7.22; N, 11.81. ИК-спектр, $\nu/\text{см}^{-1}$: 2978, 1737, 1656, 1608, 1543, 1172, 1037, 939, 796. Спектр ЯМР ¹H (CDCl₃, δ , м.д.): 6.09 (с, 1 H, H(5)); 4.41–4.37 (м, 4 H, H(2')); 4.25–4.21 (м, 4 H, H(1')); 2.39 (с, 6 H, H(6)); 2.32 (с, 6 H, H(4)); 2.28–2.25 (м, 4 H, H(4'), H(9')); 1.60–1.50 (м, 4 H, H(5'), H(8')); 1.26–1.21 (м, 4 H, H(6'), H(7')). Спектр ЯМР ¹³C (CDCl₃, δ , м.д.): 175.2 (C(3')), 173.1 (C(4)), 156.9 (C(6)), 156.0 (C(2)), 106.2 (C(5)), 61.2 (C(2')), 45.9 (C(1')), 33.6 (C(4'), C(9')), 28.6 (C(5'), C(8')), 25.1 (C(4)C), 24.4 (C(6)C), 20.3 (C(6'), C(7')). Масс-спектр (MALDI-TOF): найдено m/z : 475.0 [M + H]⁺, 497.0 [M + Na]⁺, 512.9 [M + Na]⁺; вычислено для C₂₄H₃₄N₄O₆ 475.3, 497.2, 513.2.

Изучение клеточного цикла *in vitro*. Эксперименты *in vitro* проводили на клеточной линии Chang Liver, полученной из коллекции клеточных культур НИИ вирусологии имени Д. И. Ивановского. Клетки культивировали в среде ИГЛА-МЕМ с добавлением 10% бычьей сыворотки FBS, 1% незаменимых аминокислот и антибиотика гентамицина³⁰. Для изучения клеточного цикла клетки открепляли от флакона смесью трипсина и версена в соотношении 1 : 3 и готовили клеточную суспензию с концентрацией 1–1.5 · 10⁵ клеток на 1 мл, распределяли по 250 мкл суспензии в 48-луночный планшет

и инкубировали 24 ч. Затем вносили изучаемые соединения (либо изучаемые соединения совместно с токсикантом ГЛА в концентрации 55 мкмоль · л⁻¹) и инкубировали еще 24 ч. В качестве референсного контроля (интактной группы клеток) в ростовую среду при культивировании клеток не вносили изучаемые соединения и ГЛА, в ростовую среду контрольной группы клеток вносили только ГЛА. Эксперимент выполняли в трех повторностях. На третьи сутки клетки открепляли, инкубировали в цитратном буфере 5 мин, затем окрашивали раствором тритона с иодидом пропидия (PI, «Merck», Германия) в течение 45 мин. Клеточный цикл изучали с помощью проточного цитофлуориметра Guava easyCyte («Merck», Германия).

Методы *in vivo*. Эксперимент проводили на взрослых самцах крыс линии Wistar с массой тела 300–400 г, полученных из Питомника лабораторных животных филиала Института биоорганической химии РАН (Пушино). Животных содержали в соответствии с положениями^{31,32} в стандартных условиях вивария с 12-часовым световым днем и неограниченным доступом к еде и воде. Животные получали комплексный корм, изготовленный 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).

У животных моделировали острый токсический гепатит путем введения 35%-ного масляного раствора CCl₄ в дозе 1.5 мг · кг⁻¹ в течение 5 суток. Затем животных разделяли на группы и проводили внутрибрюшинное введение изучаемых соединений в течение еще 5 суток. Препаратом сравнения для «сдвоенных» пиримидинов выступало соединение **1**, гепатопротекторные свойства которого уже были показаны ранее⁹. Соединение **1** вводили внутрибрюшинно в дозе 0.24 мг · кг⁻¹ (1.45 ммоль · кг⁻¹). Соединение **2a** вводили внутрибрюшинно в трех дозах: 0.24 мг · кг⁻¹, или 0.58 ммоль · кг⁻¹ (аналогично дозе соединения **1** по массе), 0.6 мг · кг⁻¹, или 1.45 ммоль · кг⁻¹ (эквивалентная доза к эффективной дозе соединения **1**), и 1.8 мг · кг⁻¹, или 4.35 ммоль · кг⁻¹ (в три раза больше предполагаемой оптимальной эффективной дозы). Аналогично соединение **2b** вводили внутрибрюшинно в трех дозах: 0.24 мг · кг⁻¹, или 0.54 ммоль · кг⁻¹, 0.65 мг · кг⁻¹, или 1.45 ммоль · кг⁻¹, и 1.94 мг · кг⁻¹, или 4.35 ммоль · кг⁻¹. Растворы соединений для инъекций готовили непосредственно перед введением. В контрольной группе вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. На 11-е сутки эксперимента животных эвтаназировали и осуществляли забор биоматериала.

Гистологический анализ. Образцы печени крыс, отобранные после эвтаназии животных, фиксировали в 4%-ном забуференном формалине в течение 24 ч. Парафиновые срезы печени получали согласно стандартным гистологическим методикам и окрашивали гематоксилином и эозином. Морфометрическую обработку срезов проводили на прямом световом микроскопе «Nikon H550S» с программным обеспечением NIS-Elements Basic Research. На гистологических срезах определяли площадь повреждения печени (участки стеатоза, некротических изменений) в виде доли (в процентах) от общей площади среза.

Для всех полученных значений рассчитаны средние значения и стандартные ошибки среднего. Для статистического анализа нормальность распределения опре-

деляли при помощи критерия Колмогорова—Смирнова. В случае нормального распределения для статистического анализа полученных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки, при этом уровень $p < 0.05$ считали значимым. При распределении, отличном от нормального, для анализа данных использовали непараметрический критерий Краскела—Уоллиса с апостериорным критерием Данна и с поправкой Бонферрони для множественного сравнения; новый критический уровень значимости в соответствии с поправкой Бонферрони указан в тексте статьи как p^* . Для статистической обработки применяли программу SPSS 13.0.

Авторы выражают благодарность сотрудникам Коллективного спектро-аналитического центра изучения строения, свойств и состава веществ и материалов Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр РАН» за техническую поддержку проведенных исследований.

Работа выполнена в рамках финансирования государственного задания Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр РАН».

Все исследования и протоколы по работе с животными одобрены локальным этическим комитетом Казанского (Приволжского) федерального университета (Протокол от 18 мая 2017 г. № 4).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Список литературы

1. A. A. Mokdad, A. D. Lopez, S. Shahraz, R. Lozano, A. H. Mokdad, J. Stanaway, C. J. Murray, M. Naghavi, *BMC Med.*, 2014, **12**, 1; DOI: 10.1186/s12916-014-0145-y.
2. S. K. Asrani, H. Devarbhavi, J. Eaton, P. S. Kamath, *J. Hepatol.*, 2019, **70**, 151; DOI: 10.1016/j.jhep.2018.09.014.
3. L. H. S. Matos, F. T. Masson, L. A. Simeoni, M. Homemde-Mello, *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **18**, 1779; DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.10.073.
4. S. Khasimbi, F. Ali, K. Manda, A. Sharma, G. Chauhan, S. Wakode, *Curr. Org. Synth.*, 2021, **18**, 270; DOI: 10.2174/1570179417666201207215710.
5. U. Soumyanarayanan, V. G. Bhat, S. S. Kar, J. A. Mathew, *Org. Med. Chem. Lett.*, 2012, **2**, 1; DOI: 10.1186/2191-2858-2-23.
6. M. Bhat, A. Al-Dhfyhan, M. Al-Omar, *Molecules*, 2016, **21**, 1746; DOI: 10.3390/molecules21121746.
7. M. A. Bhat, M. A. Al-Omar, A. A. Khan, A. M. Alanazi, A. M. Naglah, *Drug Des. Devel. Ther.*, 2019, **13**, 2393; DOI: 10.2147/dddt.s198865.
8. С. Г. Измайлов, В. В. Паршиков, *Нижегород. мед. журн.*, 2002, **3**, 81.
9. А. Б. Выштакалюк, Н. Г. Назаров, И. В. Зуева, А. В. Ланцова, О. А. Миннеханова, Д. В. Бусыгин, А. Г. Порфирьев, В. Г. Евтюгин, В. С. Резник, В. В. Зобов, *Бюл. эксперим. биол. мед.*, 2013, **155**, 595 [А. В. Vyshtakalyuk, N. G. Nazarov, I. V. Zueva, A. V. Lantsova, O. A. Minnehanova, D. V. Busygin, A. G. Porfiriyev, V. G. Evtyugin, V. S. Reznik, V. V. Zobov, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2013, **155**, 643; DOI: 10.1007/s10517-013-2215-0].
10. А. Б. Выштакалюк, В. Э. Семенов, А. А. Парфенов, М. С. Шашин, Г. П. Беляев, И. В. Галяметдинова, В. В. Зобов, *Биоорг. химия*, 2020, **46**, 693 [А. В. Vyshtakalyuk, V. E. Semenov, A. A. Parfenov, M. S. Shashyn, G. P. Belyaev, I. V. Galyametdinova, V. V. Zobov, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2020, **46**, 1067; DOI: 10.1134/s1068162020060369].
11. M. A. Ludueña, G. M. Iverson, H. H. Sussman, *J. Cell Physiol.*, 1977, **91**, 119; DOI: 10.1002/jcp.1040910112.
12. R. Lesch, W. Bachmann, W. Reutter, *Cell Prolif.*, 1973, **6**, 315; DOI: 10.1111/j.1365-2184.1973.tb01620.x.
13. D. O. R. Keppler, J. Pausch, K. Decker, *J. Biol. Chem.*, 1974, **249**, 211; DOI: 10.1016/s0021-9258(19)43113-x.
14. A. Eidi, P. Mortazavi, J. Z. Moghadam, P. M. Mardani, *Pharm. Biol.*, 2015, **53**, 1042; DOI: 10.3109/13880209.2014.957783.
15. A. P. Ravan, M. Bahmani, H. R. Ghasemi Basir, I. Salehi, E. A. Oshaghi, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 2017, **28**, 463; DOI: 10.1515/jbcpp-2016-0181.
16. V. J. Navarro, J. R. Senior, *N. Engl. J. Med.*, 2006, **354**, 731; DOI: 10.1056/nejmra052270.
17. H. Aramjoo, P. Mohammadparast-Tabas, T. Farkhondeh, M. Zardast, M. Makhdoumi, S. Samarghandian, Z. Kiani, *BMC Complement. Med. Ther.*, 2022, **22**, 76; DOI: 10.1186/s12906-022-03554-9.
18. 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 [А. В. 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.*, 2018, **67**, 705; DOI: 10.1007/s11172-018-2126-3].
19. Ю. Д. Слабнов, Г. В. Черепнев, Ф. Г. Каримова, Р. С. Гараев, *Бюл. эксперим. биол. мед.*, 1998, **125**, 663 [Yu. D. Slabnov, G. V. Cherepnev, F. G. Karimova, R. S. Garaev, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 1998, **125**, 588; DOI: 10.1007/bf02445248].
20. B. Wahlang, C. McClain, S. Barve, L. Gobejishvili, *Cell. Signal.*, 2018, **49**, 105; DOI: 10.1016/j.cellsig.2018.06.005.
21. J. Hanoune, N. Defer, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2001, **41**, 145; DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.145.
22. P. A. Insel, L. Zhang, F. Murray, H. Yokouchi, A. C. Zambon, *Acta Physiol.*, 2012, **204**, 277; DOI: 10.1111/j.1748-1716.2011.02273.x.
23. H. Uglund, S. Naderi, A. Brech, P. Collas, H. K. Blomhoff, *Autophagy*, 2011, **7**, 1199; DOI: 10.4161/auto.7.10.16649.
24. D. Hochbaum, K. Hong, G. Barila, F. Ribeiro-Neto, D. L. Altschuler, *J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 4464; DOI: 10.1074/jbc.c700171200.
25. U. K. Misra, S. V. Pizzo, *J. Cell Biochem.*, 2009, **108**, 998; DOI: 10.1002/jcb.22333.
26. G. Borland, B. O. Smith, S. J. Yarwood, *Br. J. Pharmacol.*, 2009, **158**, 70; DOI: 10.1111/j.1476-5381.2008.00087.x.
27. T. C. Chen, D. R. Hinton, R. Zidovetzki, F. M. Hofman, *Lab. Invest.*, 1998, **78**, 165.
28. Yu. Ladilov, A. Appukuttan, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.*, 2014, **1842**, 2646; DOI: 10.1016/j.bbadis.2014.06.034.

29. В. С. Резник, Н. Г. Пашкуров, *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, 1966, 1613 [V. S. Reznik, N. G. Pashkurov, *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.*, 1966, **15**, 1554; DOI: 10.1007/BF00848915].
30. A. Capes-Davis, R. I. Freshney, *Freshney's Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*, Wiley-Blackwell, New Jersey, 2021, 832 pp.
31. А. Н. Миронов, Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильев, О. Л. Верстакова, М. В. Журавлева, В. К. Лепахин, Н. В. Коробов, В. А. Меркулов, С. Н. Орехов, И. В. Сакаева, Д. Б. Утешев, А. Н. Яворский, *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Гриф и К, Москва, 2012, 944 с.
32. E. U. Recommendation, *Of. J. Eur. Union L.*, 2007, **197**, 1.

Поступила в редакцию 27 мая 2022;
после доработки — 28 сентября 2022;
принята к публикации 6 октября 2022