

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 040359

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2022.05.24

(21) Номер заявки

202000108

(22) Дата подачи заявки

2020.03.26

(51) Int. Cl. C07D 213/65 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

(54) НОВОЕ ПРОИЗВОДНОЕ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ГИДРОКСИПИРИДИНА,
ОБЛАДАЮЩЕЕ АНТИГИПОКСИЧЕСКОЙ И ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЙ
АКТИВНОСТЯМИ

(43) 2021.09.30

(96) 2020000032 (RU) 2020.03.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ООО "ФАРМАМЕД" (RU)

(72) Изобретатель:

Гомжин Андрей Михайлович, Каршин

Александр Владимирович, Плиско

Григорий Алексеевич, Оковитый

Сергей Владимирович (RU)

(56) COBURN STEPHEN P., "In Vivo Metabolism of 4'-Deoxyribose in Rat and Man", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 251, No. 6. Issue of March 25, 1976, pp. 1646-1652, соединение III, весь документ.

WO-A1-2007017713

RU-C1-2304142

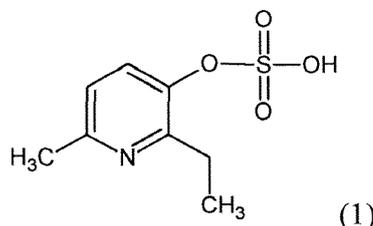
A JERFY, "Sulphated derivatives of some hydroxypyridines", Aust. J. Chem., 23, 1970, 847-62, весь документ.

N.I. ANDREEVA et al., "Antioxidants L-tocopherol, emoxypine and mexidol modify the effect of antidepressants in mice", Pharmaceutical Chemistry Journal, Vol. 38, No. 12, 2004, pp. 648-650, весь документ.

RU-C1-2095350

NIKITIN E., "Physiological Activity of Hindered Phenols with Pyridine Moiety", MedChem Russia 2019, June 10-14, 2019, Ekaterinburg, Russia, p382.

(57) Настоящее изобретение относится к области фармакологии и медицины, а именно к новому антиоксиданту, 2-этил-6-метил-3-сульфопиридину формулы (1), производному 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина,



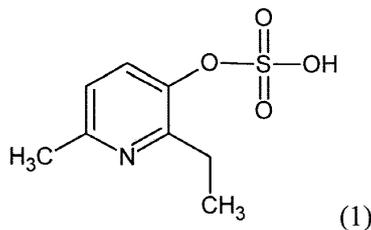
обладающему антигипоксической и гепатопротекторной активностями, а также к способу получения указанного соединения. Технический результат: получено и изучено новое соединение, обладающее антигипоксической и гепатопротекторной активностями, которое может быть использовано при разработке новых лекарственных препаратов, относящихся к классу антиоксидантов.

B1

040359

040359 B1

Настоящее изобретение относится к области фармакологии и медицины, а именно к новому антиоксиданту, 2-этил-6-метил-3-сульфопиридину формулы (1), производному 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина,



обладающему антигипоксической и гепатопротекторной активностями, а также к способу получения указанного соединения.

Указанные свойства нового соединения позволяют предполагать его применение для профилактики и лечения сердечно-сосудистых и неврологических заболеваний, в том числе хронической сердечной недостаточности, ишемической болезни сердца, ишемии головного мозга вследствие нарушения кровообращения, и прочих заболеваний, возникающих вследствие окислительного стресса и сопровождающей его гипоксии тканей, а также при заболеваниях печени, относящихся к классу свободнорадикальной патологии, в том числе неалкогольной и алкогольной жировой болезни печени, метаболических, лекарственно индуцированных, токсических поражениях печени, восстановлении после физических нагрузок.

Технический результат: получено и изучено новое соединение, обладающее антигипоксической и гепатопротекторной активностями, которое может быть использовано при разработке новых лекарственных препаратов, относящихся к классу антиоксидантов.

Уровень техники

Под термином "гипоксия" понимают недостаточное снабжение тканей организма кислородом или нарушение его утилизации в процессе биологического окисления. В широком толковании этого термина под гипоксией понимают несоответствие между энергозатратами организма и образованием энергии в виде высокоэнергетических фосфатных соединений [1].

Главным патогенетическим звеном при кислородном голодании тканей любой природы является дефицит энергии в клетках. В основе энергообеспечения клеток лежит тканевое дыхание, которое происходит на внутренней мембране митохондрий и заключается в многоэтапном переносе электронов от субстрата к кислороду, восстанавливающемуся до воды. Параллельно из митохондрий выкачиваются протоны, создавая разность потенциалов на мембране, что используется для аккумуляции высвобождающейся энергии путем синтеза АТФ (окислительное фосфорилирование). Нарушение митохондриального дыхания и окислительного фосфорилирования, какими бы причинами они не вызывались (недостаток субстратов, дефицит кислорода, разобщение ферментов дыхательной цепи и т.д.) приводит к истощению запасенной в макроэргических связях энергии, необходимой для поддержания всего разнообразия биохимических реакций живого организма. Повреждающее действие гипоксии усугубляется лавинообразным накоплением недоокисленных продуктов с появлением высокотоксичных свободных радикалов [1].

При интенсивном образовании свободных радикалов и при недостаточной активности эндогенной антиоксидантной системы возникает окислительный стресс, который может явиться причиной многочисленных патологий. Наиболее широко освещается участие свободнорадикального окисления в развитии таких заболеваний как атеросклероз, ишемические болезни сердца и мозга, нейродегенеративные заболевания: деменции, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др., дисциркуляторная энцефалопатия, церебральные инсульты и гипертония, стресс, невроз, судорожные состояния. Последствиями активности свободнорадикального окисления могут быть также болезни почек, печени и легких, остеоартрит, амилоидоз, холецистит, панкреатит, воспалительные процессы, заболевания крови, глаз (катаракта и др.), кожи, сахарный диабет, аллергические и иммунодефицитные состояния и др. [2].

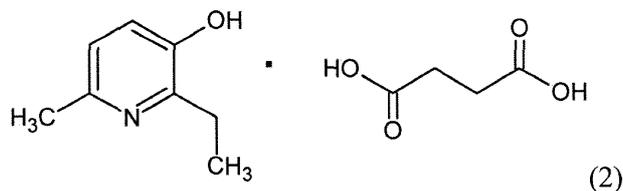
Печень как главный орган метаболизма и гомеостаза в организме непосредственно подвержена патологическому воздействию свободных радикалов, которые нарушают структурно-функциональную целостность и свойства мембран гепатоцитов, митохондрий и других органелл клетки, изменяя белковый, липидный, углеводный обмен.

Регулятором уровня свободно-радикального окисления в организме является антиоксидантная система, в составе которой достаточно условно можно выделить эндогенные антиоксиданты (неферментативные и ферментативные), металл-связывающие белки и пищевые антиоксиданты. Однако по мере истощения фонда эндогенных антиоксидантов и подавления энергозависимых процессов синтеза антиоксидантных ферментов, ее потенциал значительно снижается, что делает одним из ключевых экзогенный путь восполнения дефицита антиоксидантов.

Препараты на основе производных 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (ЭМГП), а именно гидрохлорид ЭМГП (эмоксипин) и сукцинат ЭМГП (мексидол), достаточно известны в медицине и широко

используются в клинической и амбулаторной практике в качестве антиоксидантов и антигипоксантов. Эти соединения относятся к водорастворимым антиоксидантам биогенного типа в ряду производных 3-оксипиридина, являющихся структурными аналогами соединений группы витамина В6 [2].

Наиболее близким по структуре и фармакологическому действию аналогом заявляемого соединения является соединение 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат формулы (2),



известный под названием мексидол. Препарат разрешен для широкого медицинского применения и показан для лечения острых нарушений мозгового кровообращения, энцефалопатий различного генеза, вегетососудистой дистонии, атеросклеротических нарушений функции мозга, тревожных расстройств и невротических состояний, острых интоксикаций антипсихотическими средствами, астенических состояний, а также для профилактики развития соматических заболеваний и др. Механизм действия мексидола обусловлен его антиоксидантным, антигипоксическим и мембранопротекторным свойствами [3].

В ряде доклинических исследований показана гепатопротекторная активность мексидола на моделях острого стресса [4], длительного иммобилизационного стресса [5], интоксикации тетрахлорметаном [5, 6], туберкулоstaticами [6], на модели неалкогольной жировой болезни печени [7]. В клиническом исследовании [5] показано, что введение мексидола в схему лечения больных с хроническим гепатитом потенцирует эффект стандартной терапии, что проявляется в сокращении времени достижения начала редукции клинической картины и более быстрой регрессии активности аланинаминотрансферазы (АлАТ).

Способность влиять на процессы перекисного окисления липидов мембран гепатоцитов является важным условием эффективности новых соединений с гепатопротекторной активностью. Действие большинства применяемых в настоящее время гепатопротекторных средств (синтетических гепатопротекторов, эссенциальных фосфолипидов, препаратов, содержащих флавоноиды растений) направлено на устранение одного из ведущих механизмов патогенеза повреждения печени - дестабилизации мембран гепатоцитов, зависящей от инициирования свободнорадикального перекисного окисления липидов.

Поиск новых высокоэффективных антиоксидантов на основе производных ЭМГП путем направленного химического синтеза с целью повышения гепатопротекторной, антигипоксической и других биологических активностей ЭМГП является актуальным.

Так, например, из уровня техники известно множество солей ЭМГП [8-19]. Анализ указанных документов показывает, что предпосылкой для синтеза новой соли было желание усилить и/или расширить биологические эффекты введением второго активного компонента. Спектр активностей новых соединений ЭМГП при этом был различен, каждое вновь синтезированное соединение имело новые свойства. Из уровня техники известны не только соли, но и производные ЭМГП, обладающие антиоксидантной и антигипоксической активностями: 3-(N,N-диметилкарбамоилокси)-2-этил-6-метилпиридина сукцинат (проксипин) с антигипоксической активностью [20] и сульфопроизводные ЭМГП с антиоксидантными свойствами, обуславливающими гепатопротекторную активность [21]. По антигипоксической активности проксипин уступает мексидолу [22], по антиоксидантной/гепатопротекторной активности сульфопроизводные ЭМГП сопоставимы с мексидолом [21].

Одним из перспективных направлений химической модификации соединений с биологической активностью является синтез их фармакологически активных метаболитов с целью получения новых более активных соединений. Так, например, при изучении метаболизма транквилизатора диазепам было установлено, что в печени из него образуется вещество с транквилизирующей активностью N-метилированный 3-оксиметаболит диазепам - оксазепам. В настоящее время оксазепам синтезируется и выпускается как отдельное лекарственное средство. К таким химически синтезированным активным метаболитам можно отнести также N-дезметильный метаболит имипрамина (дезимипрамин) и N-ацетильный метаболит новокаинамида (ацекаинид) [23].

Сущность изобретения

Предпосылкой для изобретения явилось обнаружение нами в процессе изучения фармакокинетики и метаболизма мексидола методами высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией неизвестного фармакологически активного метаболита мексидола, ранее не описанного в литературе. Анализ масс-спектров нового метаболита мексидола позволил предположить существование химического соединения, представляющего собой новое производное ЭМГП - 2-этил-6-метил-3-сульфопиридин (ЭМСП) формулы (1), что явилось основанием для целенаправленного химического синтеза ЭМСП.

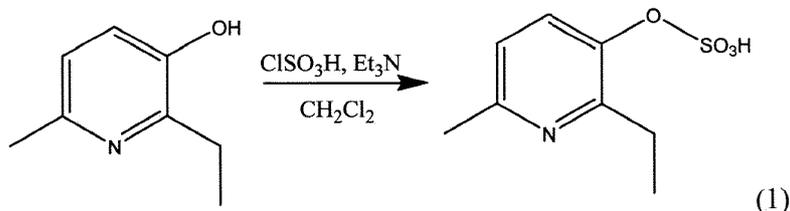
Полученное путем химического синтеза соединение ЭМСП было использовано нами в качестве

стандартного вещества в методике определения вышеупомянутого нового метаболита, что позволило подтвердить химическую структуру нового метаболита не только на основании масс-спектров, но и по совпадению на хроматограммах времен удерживания неизвестного метаболита и стандартного вещества.

Цель изобретения - получение нового производного ЭМГП, а именно 2-этил-6-метил-3-сульфопиридина (ЭМСП), являющегося метаболитом мексидола и обладающего по сравнению с мексидолом большей фармакологической активностью.

Осуществление изобретения

Пример 1. Получение 2-этил-6-метил-3-сульфопиридина (ЭМСП) формулы (1) Новое соединение формулы (1) получают по схеме синтеза:



К 100 мл дихлорметана при перемешивании добавляют 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин (12.5 г) и триэтиламин (55.3 г). Реакционную массу охлаждают до -15°C . Отдельно приготовленный раствор хлорсульфоновой кислоты (20.9 г) в 50 мл дихлорметана дозируют к реакционной массе, поддерживая температуру -15°C . После окончания дозировки температуру реакционной массы медленно поднимают до $20-25^{\circ}\text{C}$ и выдерживают в течение 24 ч. Полученную суспензию отфильтровывают через складчатый фильтр, фильтрат упаривают досуха. Полученный кубовый остаток последовательно кристаллизуют из этанола, а затем из воды.

Выход, % в расчете на исходный 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин: 9,9 г (50%).

Найдено, %: С 44.52; Н 5.40; N 6.32; О 29.15; S 14.83. $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_4\text{S}$.

Вычислено, %: С 44.23; Н 5.10; N 6.45; О 29.46; S 14.76.

Спектр ЯМР ^1H (ДМСО- d_6), δ м. д.: 1,27 (3H, триплет); 2,66 (3H, синглет); 2,95 (2H, квадруплет); 7,71 (1H, дуплет); 8,33 (1H, дуплет).

Химическая структура полученного образца подтверждена методом ВЭЖХ-МС на приборе Thermo Scientific TSQ Quantum AccessTM. Хроматографическое разделение проводили на колонке Zorbax CB-C18 (150×2,1×1,8 μm). Во время анализа колонку термостатировали при 35°C . Растворитель образца - метанол. Скорость потока 0,25 мл/мин. Подвижная фаза: 0,1% водный раствор муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил (В). Анализ проводили в режиме градиентного элюирования: 0 мин - 1% В, 1 мин - 1% В, 18 мин - 95% В, 20 мин - 95% В, 20.01 мин - 1% В, 25 мин - 1% В. В этих условиях время удерживания анализируемого образца составило 5.57 мин.

Данные по матричной фотодиодной детекции: время сканирования 0,00-25,00 мин, тип сканирования - оптическая плотность, диапазон сканирования 200-800 нм, шаг сканирования - 1 нм, ширина полосы сканирования - 1 нм, частота сканирования - 80 Hz.

Данные по MS-детекции: ионизация электрораспылением (HRESI), время сканирования 0.00-25.00 мин, диапазон сканирования 50-1000 m/z, частота сканирования 0.500 с, полярность сканирования - положительная.

В масс-спектре исследуемого образца наблюдается протезированный молекулярный ион $[\text{M}+\text{H}]^+$ с m/z 217.92 (68%). Фрагментация протонированного молекулярного иона приводит к образованию дочерних ионов, представленных в табл. 1.

Таблица 1. Основные характеристичные дочерние ионы 2-этил-6-метил-3-сульфопиридина

m/z (интенсивность в %)	Фрагменты	Возможный путь образования
138.09 (100%)		Элиминирование сульфогруппы
123.11 (4%)		Элиминирование метильной и сульфогруппы
354.92 (18%)		Ассоциация дочернего иона (m/z 138.09) с молекулярным ионом (m/z 217.92).

ИК-спектр (cm^{-1}): 3700-3250 (валентн. -ОН, ассоцииров. группа); 3060-3020 (валентн. Ar-H); 2950-2900 (валентн. $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$); 2400-2200 и 2200-1800 (валентн. C-H пиридин); 1645 (валентн. C=N пиридин); 1620, 1550, 1460 ($-\text{C}=\text{C}-$ пиридин); 1430 (ножнич. $-\text{CH}_2$); 1385 (деформ. симм. $-\text{CH}_3$); 1365 (валент. ассим. SO_2 и деформ. ассим. $-\text{CH}_3$); 1305 (валентн. $-\text{C}-\text{O}-$ пиридин); 1290 (вер., крутильн. $-\text{CH}_2-$); 1230 (валент. симм. SO_2); 1170, 1145, 1045, 990, 950, 915 (плоск. деформ. C-H пиридин); 870, 825, 790 (неплоск. деформ. C-H пиридин); 720 (маятн. $-\text{CH}_2-$).

Антигипоксическую активность ЭМСП формулы (1) изучали на моделях гипоксий различного генеза: гистотоксической, гемической и нормобарической гипоксии. Используемые модели являются стандартизированными и рекомендованы для выявления антигипоксических свойств новых препаратов [1].

Во всех моделях в качестве препарата сравнения был выбран мексидол.

Исследование антигипоксической активности было проведено *in vivo*. В качестве тест-системы были выбраны лабораторные аутбредные мыши-самцы массой 18-20 г. Были сформированы 9 групп по 10 особей в каждой группе, всего 90 мышей.

Испытуемый образец вводился мышам однократно в первой половине дня внутривентриально в виде растворов за 60 мин до начала моделирования гипоксии. Контрольным группам животных аналогичным образом вводилось контрольное вещество - вода для инъекций в эквивалентных количествах. В исследовании была использована одна доза испытуемого образца, эквивалентная 100 мг/кг этилметилгидрокси-пиридина (мексидола).

В отношении всех количественных данных применялись методы описательной статистики: подсчитывались средние выборочные значения (M) и стандартная ошибка среднего (SM), согласно рекомендациям Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [24, 25], которые вместе со значением n (количество животных в группе) представлены в итоговых таблицах.

Межгрупповые различия анализировали непараметрическими методами для множественного сравнения - критерий Манна-Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Использовалось программное обеспечение "Statistica 6.1".

Пример 2. Определение антигипоксической активности соединения ЭМСП на модели острой гистотоксической гипоксии.

Для моделирования острой гистотоксической гипоксии (ОГТГ), которая является следствием инактивации цитохромоксидазы - фермента терминального участка дыхательной цепи, использовали 0,4% натрия нитропруссид, который вводили животным внутривентриально в дозе 20 мг/кг. Затем регистрировали продолжительность жизни животных в минутах, которые переводили для расчетов в секунды [26].

Результаты по продолжительности жизни представлены в табл. 2 в секундах как среднее значение (M) \pm средняя ошибка (SM) в каждой группе (n=10).

Таблица средних значений 2. Влияние однократного внутрибрюшинного введения испытуемых субстанций на длительность жизни мышей-самцов при ОГТГ ($M \pm SM$, $n=10$)

Испытуемая субстанция	Дозировка (мг/кг)	Время жизни, с $M \pm SM$
ЭМСП	85	733,6±60,4 ^{*,#}
Мексидол	100	635,3±31,1 [*]
Вода для инъекций	-	433,6±41,0

Примечания:

* - достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,05$)

- достоверное отличие от группы, получавшей мексидол ($p < 0,05$)

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что животные контрольной группы, получавшие эквивалентное количество воды для инъекций, погибли через 433,6±41,0 с после инъекции ингибитора тканевого дыхания натрия нитропрусида; наиболее выраженным антигипоксическим эффектом обладает ЭМСП; время жизни при его применении увеличивалось на 69,2% по сравнению с контрольной группой и на 15,5% по отношению к группе мексидола соответственно.

Такая высокая активность соединения ЭМСП на модели тканевой гипоксии может оказаться полезной, в частности при заболеваниях, сопровождающихся локальной дезорганизацией или блокадой дыхательной цепи. Классическим примером тканевой гипоксии, при которой происходит инактивация дыхательных ферментов, является отравление цианидами. Тканевая гипоксия может возникнуть также и при отравлении некоторыми лекарственными веществами.

Пример 3. Определение антигипоксической активности соединения ЭМСП на модели острой гемической гипоксии.

В основе острой гемической гипоксии (ОГемГ) лежит уменьшение кислородной емкости гемоглобина (метгемоглобинемия). Для создания модели острой гемической гипоксии животным вводили внутрибрюшинно натрия нитрит (300 мг/кг), предварительно растворенный в воде для инъекций, а затем фиксировали продолжительность жизни мышей в минутах, которые переводили для расчетов в секунды [26].

Результаты по продолжительности жизни представлены в табл. 3 в секундах как среднее значение (M) ± средняя ошибка (SM) в каждой группе ($n=10$).

Таблица средних значений 3. Влияние однократного внутрибрюшинного введения испытуемых субстанций на продолжительность жизни мышей-самцов при ОГемГ ($M \pm SM$, $n=10$)

Испытуемая субстанция	Дозировка (мг/кг)	Время жизни, с $M \pm SM$
ЭМСП	85	711,8±39,2 ^{*,#}
Мексидол	100	671,6±41,5 [*]
Вода для инъекций	-	601,7±33,5

Примечания:

* - достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,05$)

- достоверное отличие от группы, получавшей мексидол ($p < 0,05$)

Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что внутрибрюшинное введение натрия нитрита вызывает гипоксию у животных контрольной группы и их смерть через 601,7±33,5 с;

наиболее выраженным антигипоксическим эффектом обладает ЭМСП, время жизни при его применении увеличивалось на 18,3% по сравнению с контрольной группой и на 6,0% по сравнению с группой мексидола соответственно.

Активность соединения ЭМСП на модели гемической гипоксии может оказаться полезной при гипоксии, вызванной отравлениями различными химическими веществами (такими как, например, угарный газ, сера, нитраты и нитриты), которые приводят к образованию форм гемоглобина, не способных переносить кислород.

Пример 4. Определение антигипоксической активности соединения ЭМСП на модели острой норабарической гипоксии.

Моделирование острой нормобарической гипоксии (ОНГ) подразумевает создание обедненной азотно-кислородной газовой смеси, подаваемой при нормальном барометрическом давлении для дыхания животным.

Исследования проводились в гипоксикамере "БИО-НОВА-204" (ООО "НТО Био-Нова", Россия).

В гипоксическую камеру помещались 10 мышей. Для каждого животного регистрировали критический процент кислорода в гипоксической газовой смеси (ГГС), который вызывал его гибель [27].

Результаты по продолжительности жизни представлены в табл. 4 в секундах как среднее значение (M) \pm средняя ошибка (SM) в каждой группе ($n=10$).

Таблица средних значений 4. Влияние однократного внутрибрюшинного введения испытуемых субстанций на процент содержания кислорода в ГГС, вызывающий гибель мышей самцов при ОНГ ($M \pm SM$, $n=10$)

Испытуемая субстанция	Дозировка (мг/кг)	Процент содержания кислорода в ГГС, % $M \pm SM$
ЭМСП	85	3,70 \pm 0,20*
Мексидол	100	3,80 \pm 0,10*
Вода для инъекций	-	4,30 \pm 0,10

Примечание: - достоверное отличие от контрольной группы ($p < 0,05$)

На основании данных, представленных в табл. 4, можно сделать следующие выводы: гипоксическая газовая смесь вызывала гибель животных контрольной группы при содержании кислорода 4,30 \pm 0,10%;

препарат сравнения мексидол приводил к развитию антигипоксического эффекта и гибели животных при содержании кислорода во вдыхаемом воздухе в 1,13 раза меньшем, чем в контроле ($p < 0,05$);

ЭМСП обладает достоверным антигипоксическим эффектом, сопоставимым с мексидолом.

Пример 5. Этот пример показывает, что соединение ЭМСП формулы (1) настоящего изобретения защищает печень при неалкогольной жировой болезни (НАЖБП).

Для исследования гепатопротекторного эффекта была использована модель НАЖБП у мышей. В качестве препарата сравнения был использован мексидол, гепатопротекторная активность которого показана в ряде исследований [4-7]. НАЖБП моделировали, сочетая высокожировую диету и введение токсиканта (тетрахлорметан). Введение токсиканта в сочетании с гиперкалорийной диетой способствовало развитию лобулярного гепатита и баллонной дистрофии гепатоцитов с последующим формированием фиброза печени [28]. Это сочеталось с развитием синдрома цитолиза, а также с метаболическими нарушениями в виде гиперхолестеринемии и гипертриглицеридемии (табл. 5), не коррелировавшими со степенью морфологических изменений, что описано в литературе. Так, например, в ряде крупных клинических исследований показано, что связь между повышением активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и выраженностью воспалительной реакции и фиброза печени не всегда прослеживается [29].

В состав корма входили 21% жира, 41% фруктозы, 1,25% холестерина и 36,75% лабораторного корма. Интактные животные получали стандартный комбикорм. Животным исследуемых групп, кроме интактных, внутрибрюшинно 1 раз в неделю вводили 0,1 мл раствора тетрахлорметана в 1,9 мл миндального масла (2 мл раствора/кг). В ходе эксперимента оценивали летальность, а также массу тела животных (1 раз в 2 недели). Дополнительно в точках, соответствующих 2, 4 и 6 месяцам эксперимента (1, 2 и 3-я контрольные точки), брали кровь из ретроорбитального синуса с последующим биохимическим анализом (определяли активность АлАТ, аспартатаминотрансферазы - АсАТ, щелочной фосфатазы - ЩФ, концентрацию общего холестерина - ОХС и триглицеридов - ТГ). Для гистологического исследования печени в 1-й и 2-й точках случайным образом выводили по 5 животных из каждой группы. В 3-й точке (6 месяц наблюдения) были выведены все оставшиеся животные. Животных подвергали аутопсии, печень помещали в формалин с последующим приготовлением срезов и их окраской гематоксилином и эозином и по Ван Гизону (для уточнения визуальной картины фиброзных изменений). Оценивали следующие признаки: выраженность некроза, лобулярного воспаления и баллонной дистрофии (0 - отсутствие признака, 1 - слабо выраженный, 2 - умеренно выраженный, 3 - выраженный признак). Оценку фиброза проводили по шкале METAVIR (F0-F4).

Таблица 5. Динамика активности маркерных ферментов печени и показателей липидного обмена у животных исследуемых групп

Показатель	Месяц терапии	Группа				p
		Интактные животные	Контроль	ЭМСП	Мексидол	
		1	2	3	4	
АлАТ, МЕ/л	2-й	19,6 (10,8)	118,9 (23,5)	83,3 (3,6)	90,4 (286,9)	$p_{1-2,3,4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,01$
	4-й	18,7 (7,6)	57,1 (5,1)	88,2 (33,7)	102,5 (20,8)	$p_{1-2,3,4} < 0,001$ $p_{2-4} < 0,01$
	6-й	24,6 (3,5)	–	51,0 (18,4)	62,5 (12,0)	
p*			$p_{2-4} < 0,01$	$p_{2-6} < 0,05$	$p_{2-6} < 0,05$ $p_{4-6} < 0,05$	
АсАТ, МЕ/л	2-й	53,3 (35,7)	312,6 (183,2)	178,4 (21,1)	278,9 (275,3)	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3,4} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$
	4-й	69,0 (34,0)	93,5 (27,7)	122,9 (34,6)	110,9 (16,2)	
	6-й	78,4 (50,1)	–	124,6 (33,3)	79,8 (2,0)	$p_{3-4} < 0,05$
p*			$p_{2-4} < 0,05$	$p_{2-4} < 0,05$	$p_{2-6} < 0,05$ $p_{4-6} < 0,05$	
ЩФ	2-й	127,9 (33,6)	273,8 (91,8)	199,3 (96,3)	264,1 (45,4)	$p_{1-2,3,4} < 0,05$
	4-й	117,3 (21,8)	151,3 (41,5)	156,9 (21,5)	226,2 (42,7)	$p_{1-4} < 0,05$ $p_{2,3-4} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$
	6-й	115,3 (17,4)	–	181,1 (40,5)	174,8 (8,0)	
p*					$p_{4-6} < 0,05$	
ОХС	2-й	0,99 (0,32)	2,02 (0,67)	1,60 (0,29)	1,99 (0,45)	$p_{1-3,4} < 0,01$ $p_{2-3} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$
	4-й	1,33 (0,54)	2,20 (1,01)	1,53 (0,15)	1,92 (0,27)	$p_{1-2} < 0,05$
	6-й	1,18 (0,63)	–	2,51 (0,61)	2,49 (0,51)	$p_{1-3,4} < 0,05$
p*					$p_{2-6} < 0,05$ $p_{4-6} < 0,05$	
ТГ	2-й	0,25 (0,29)	1,31 (0,67)	1,08 (0,3)	1,18 (1,3)	$p_{1-2,3,4} < 0,05$ $p_{3-4} < 0,05$
	4-й	0,49 (0,23)	0,89 (0,42)	1,52 (0,05)	1,58 (0,5)	$p_{1-2,3} < 0,05$
	6-й	0,37 (0,41)	–	1,40 (0,3)	1,30 (0,03)	$p_{1-3,4} < 0,05$
p*					$p_{2-6} < 0,05$	

* - внутригрупповое различие с учетом месяца терапии: p_{2-4} ; p_{2-6} ; p_{4-6}

Исследование проведено на 100 инбредных мышах-самцах линии C57BL/6, массой тела 18-20 г. Методом рандомизации животные были разделены на 4 группы (по 25 мышей в каждой): 1-я группа - интактные животные, 2-я - контроль без лечения (модель НАЖБП), 3-я - модель НАЖБП + ЭМСП (испытуемый препарат), 4-я - модель НАЖБП + мексидол (препарат сравнения). Исследуемый препарат и препарат сравнения вводили в течение всего эксперимента 1 раз в день внутривентриально в объеме 0,1 мл, что соответствует пересчету суточной дозы с человека на мышь.

С учетом распределения количественных данных, которое не удовлетворяло критериям нормальности, значения представлены как медиана (межквартильный интервал). Статистическую обработку количественных показателей (масса тела, биохимические маркеры) проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса для множественных сравнений. Сопоставление частотных характеристик качественных показателей осуществлено с помощью непараметрического критерия Фишера. Анализ выживаемости выполнялся методом Каплана-Мейера. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты представлены в табл. 5.

Как видно из таблицы, активность индикаторных ферментов цитолиза (АлАТ и АсАТ) к концу 2-го месяца эксперимента повышалась как в группе контроля, так и в группах животных, получавших исследуемый препарат и препарат сравнения; при этом на фоне введения ЭМСП не отмечено достоверного снижения показателя, что сопоставимо с препаратом сравнения. С 4-го месяца наблюдения регистрировалась разнонаправленная динамика активности АлАТ и АсАТ: активность АлАТ оставалась повышен-

ной во всех группах, получавших терапию, в сравнении с интактной группой животных, однако ЭМСП уступал препарату сравнения по антицитолитическому действию (по сравнению с показателем в группе контроля). В то же время в указанный срок наблюдения активность АсАТ статистически значимо не менялась. К 6-му месяцу терапии активность обоих ферментов не отличалась от таковой в интактной группе. Важно отметить внутригрупповое снижение активности АлАТ в 3-4-й группах с увеличением длительности применения препаратов. Межгрупповые колебания активности ЩФ к моменту окончания эксперимента статистически значимо не отличались от показателя в интактной группе.

По гипохолестеринемическому действию исследуемое соединение ЭМСП не уступает препарату сравнения. В то же время на ранних сроках терапии ЭМСП превосходил препарат сравнения. Во всех экспериментальных группах к концу 2-го месяца наблюдалось повышение уровня ОХС, однако только у животных, получавших ЭМСП, показатель был достоверно ниже аналогичного как в группе контроля, так и в группах, получавшей препарат сравнения. С 4-го месяца эксперимента статистически значимых межгрупповых различий показателя ОХС не наблюдалось. К моменту окончания эксперимента оба показателя липидного обмена (ОХС и ТГ) значимо превышали аналогичные у интактных животных.

Показатель общей смертности (включая выводимых из эксперимента в контрольных точках) животных к окончанию 6-го месяца эксперимента в 3-й и 4-й группах (группы ЭМСП и мексидола соответственно) составил 75 и 72 % (фиг. 1). В то же время в контрольной группе показатель летальности, равный 88%, отмечался к концу 4-го месяца, а оставшиеся животные (n=3) были выведены из эксперимента уже во 2-й контрольной точке; к 3-й контрольной точке все животные контрольной группы погибли.

Масса тела экспериментальных животных статистически значимо не изменялась на протяжении эксперимента как внутри групп, так и между группами животных, получавшими исследуемый препарат, препарат сравнения, интактными животными и группой контроля.

По антинекротическому действию ЭМСП превосходит препарат сравнения на ранних сроках терапии. При оценке данных гистологического исследования печени во всех контрольных точках выявлено наличие некроза гепатоцитов у 100% животных (1-2 балла) контрольной группы ($p < 0,05$ по сравнению с интактными мышами). На фоне 2-месячного применения изучаемого ЭМСП некроз не регистрировался; для сравнения в группе мексидола некроз гепатоцитов выявлен у 1 животного (1 балл). На фоне 4-х месячного применения ЭМСП некроз по-прежнему не выявлялся, в то же время в группе сравнения его появление регистрировалось у 100% мышей ($p < 0,05$ по сравнению с интактными мышами). На фоне 6 месяцев применения у всех животных, как в группе ЭМСП, так и в группе мексидола, отмечено появление некротических очагов выраженностью 1 балл.

Появление баллонной дистрофии на фоне 2 месячной терапии с выраженностью 1-3 балла отмечено у животных контрольной группы и группы препарата сравнения (60% - в группе препарата сравнения против 100% в группе контроля), при этом в интактной группе, как и на фоне введения ЭМСП, указанный гистологический признак не регистрировался. Однако уже к 4-му месяцу, с сохранением тенденции и к окончанию эксперимента, рост частоты встречаемости дистрофических изменений гепатоцитов отмечен у всех животных, получавших исследуемые препараты ($p < 0,05$ по сравнению с интактными), что полностью совпадало с данными группы контроля (фиг. 2, в, г).

Частота выявления воспалительных изменений в печеночных дольках (лобулярный гепатит) у животных исследуемых групп варьировала на протяжении исследования при отсутствии внутригрупповых статистически значимых различий; у мышей интактной группы воспалительные изменения не выявлялись.

Фиброзные изменения паренхимы печени определялись в контрольной группе (степень F1-F2) к концу 4-го месяца эксперимента (фиг. 2, б). На фоне введения ЭМСП фиброз F1 был выявлен у 1 животного ($p < 0,05$ по сравнению с контролем), при этом при применении препарата сравнения фибротические процессы отмечались у 40% животных (без статистически достоверной разницы с контрольными животными). К окончанию эксперимента в 3-й и 4-й группах (группа ЭМСП и группа мексидола) фиброза не отмечалось, что свидетельствует о его обратимом характере у животных данных групп.

Полученные нами данные позволяют сделать вывод о положительном влиянии нового изучаемого соединения ЭМСП на течение экспериментальной НАЖБП. В эксперименте прослеживается сопоставимая с мексидолом эффективность влияния данного соединения на твердые конечные точки, отражающие течение НАЖБП - смертность животных и морфологическую картину печени [29]. Изучаемое соединение, как и препарат сравнения, к концу терапии сопоставимо препятствовало развитию фиброза печени, а также уменьшало его тяжесть, существенно не влияя на проявления баллонной дистрофии и лобулярного воспаления. В то же время на ранних сроках терапии ЭМСП превосходил мексидол по антинекротическому и антифибротическому действию. На используемой модели все применяемые препараты оказывали слабое антицитолитическое действие, снижая в то же время активность индикаторных ферментов печени к окончанию терапии. По гипохолестеринемическому действию исследуемое соединение на ранних сроках терапии превосходило препарат сравнения. Полученные данные позволяют рекомендовать соеди-

нение ЭМСП для дальнейшего изучения в экспериментах.

Список литературы.

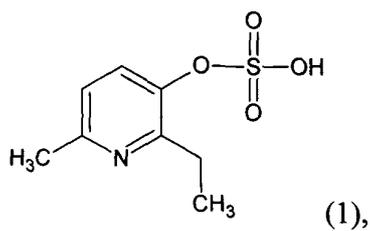
1. Методические рекомендации "Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств" под ред. Н.Н. Каркищенко. М., 2017. 98 с.
2. Воронина Т.А. Антиоксидант мексидол. Психофармакология и биологическая наркология. 2001; 1 (1): 2-12.
3. Государственный реестр лекарственных средств. <http://grls.rosminzdrav.ru/>
4. Девяткина Т.А., Луценко Р.В., Важничая Е.М., Смирнов Л.Д.. Влияние мексидола и его структурных компонентов на содержание углеводов и перекисное окисление липидов при остром стрессе. Вопросы медицинской химии. 1999; 45(3): 246-249.
5. Клейникова Т.Т. Изучение гепатопротекторной активности мексидола при острых и хронических повреждениях печени. Автореферат на соискание ученой степени кандидата мед. наук. Саранск, 1998 г.
6. RU 2189817 опублик. 27.09.2002.
7. Катикова О.Ю. Влияние мексидола на функции и структуру печени, параметры перекисного окисления липидов при длительной гиподинамии. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2009; 2: 51-4.
8. Патент RU 2365582, опублик. 27.08.2009.
9. Патент RU 2377237, опублик. 27.12.2009.
10. Патент RU 2454406, опублик. 27.06.2012.
11. Патент RU 2690674, опублик. 05.06.2019.
12. Патент RU 2442774, опублик. 20.02.2012.
13. Патент RU 2652891, опублик. 03.05.2018.
14. Патент RU 2664453, опублик. 17.08.2018.
15. Патент RU 2357955, опублик. 10.06.2009.
16. Патент RU 2540070, опублик. 27.01.2015.
17. Патент RU 2394815, опублик. 20.08.2009.
18. Патент RU 2284993, опублик. 10.10.2006.
19. Патент RU 2394816, опублик. 20.07.2010.
20. Патент RU 2095350, опублик. 10.11.1997.
21. Патент RU 2706692, опублик. 20.11.2019.
22. Воронина Т. А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2012; 112(12): 86-90.
23. Холодов Л. Е., Яковлев В. П. Клиническая фармакокинетика. М.: Медицина, 1985. 464 с.
24. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012.
25. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях под ред.: Каркищенко Н.Н. и Грачева СВ. М.: Профиль, 2010. 358 с.
26. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств под ред. Лукьяновой Л. Д. М., 1990. 18 с.
27. Титович И. А., Болотова В. Ц. Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминокетанола. Биомедицина. 2016; 2: 77-83.
28. Castro RE, Deihl AM. Towards a definite mouse model of NAFLD. J. Hepatol. 2018; 69 (2): 272-274.
29. Ивашкин В.Т., Майевская М.В., Павлов Ч.С., Тихонов И.Н., Широкова Е.Н., Буеверов А.О., Драпкина О.М., Шульпекова Ю.О., Цуканов В.В., Маммаев С.Н., Маев И.В., Пальгова Л.К. Клинические рекомендации по диагностике и лечению неалкогольной жировой болезни печени Российского общества по изучению печени и Российской гастроэнтерологической ассоциации. Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. 2016; 2: 24-42.

Перечень фигур, чертежей и иных материалов

- Фиг. 1. Выживаемость животных в исследуемых группах.
- Фиг. 2. Морфологические изменения печени к концу 4-го месяца эксперимента:
- а) интактная группа: отсутствие патологических изменений в печени;
 - б) контрольная группа: участки фиброза (степень F2 по METAVIR); лобулярное воспаление, распространенная баллонная дистрофия гепатоцитов;
 - в) группа животных, получавшая исследуемое соединение ЭМСП: умеренно выраженное лобулярное воспаление; распространенная баллонная дистрофия гепатоцитов;
 - г) группа животных, получавшая препарат сравнения мексидол: умеренно выраженное лобулярное воспаление; распространенная баллонная дистрофия гепатоцитов.
- Окраска: гематоксилином и эозином ×400.

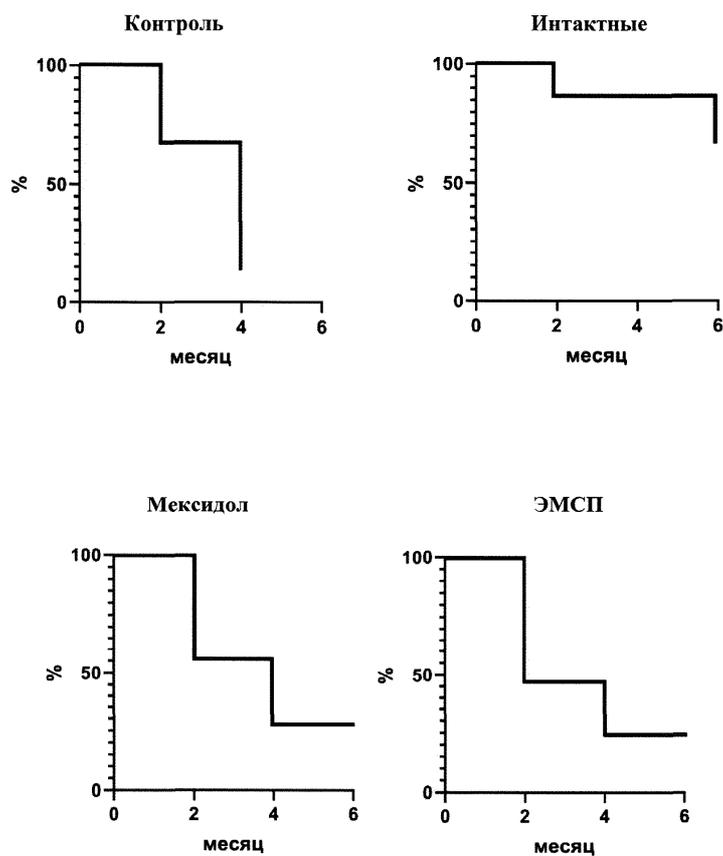
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (1),

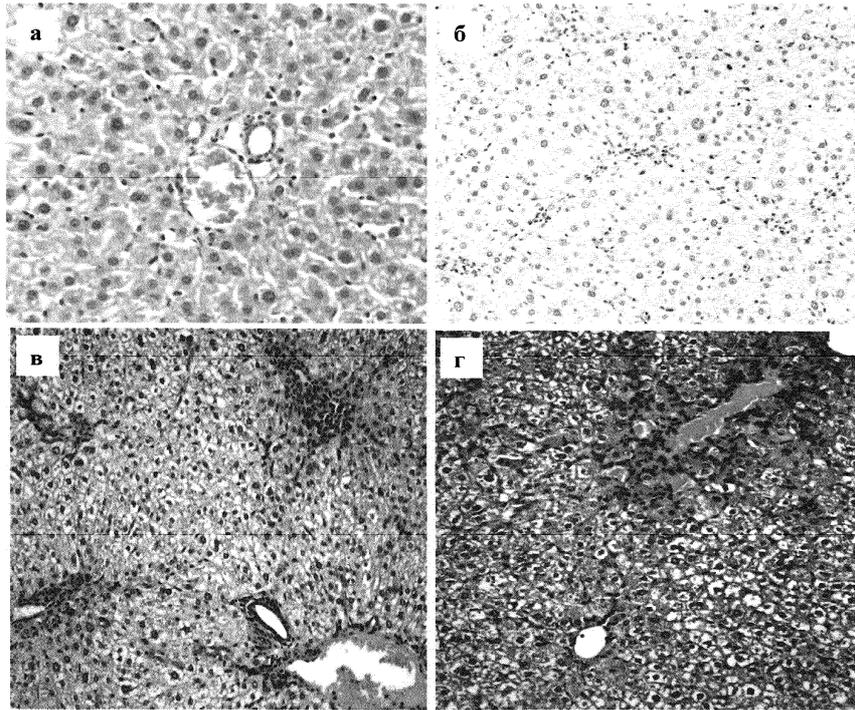


обладающее антигипоксической активностью.

2. Способ синтеза соединения по п.1, включающий взаимодействие 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина с хлорсульфоновой кислотой в присутствии триэтиламина в среде растворителя дихлорметана.



Фиг. 1



Фиг. 2

