

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК ТАДЖИКИСТАНА
ГНУ «ИНСТИТУТ ХИМИИ ИМ. В. И. НИКИТИНА»

На правах рукописи

АБДУЛЛОЗОДА Санавбари Исуф

**СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НОВЫХ СТРУКТУРНЫХ
РАЗНОВИДНОСТЕЙ ПРОИЗВОДНЫХ ХОЛАНОВЫХ КИСЛОТ**

Специальность 1.4.3 - Органическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Рахмонов Рахмон Охонович

Душанбе – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Список сокращений.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХОЛАНОВЫХ КИСЛОТ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	12
1.1. Известные пути синтеза ряда производных холановых кислот.....	14
1.2. Сферы использования холановых кислот и их производных.....	27
1.3. Применение газохроматографического метода для определения холановых кислот в биоматериалах.....	33
ГЛАВА 2. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ ХОЛАНОВЫХ КИСЛОТ В РЕАКЦИЯХ РАЗЛИЧНОГО ТИПА (ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ).....	37
2.1. Синтез сложных эфиров 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β - и 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановых кислот.....	42
2.2. Превращения сложных эфиров 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты в условиях ацилирования.....	60
2.3. Синтез некоторых производных тиосемикарбазидов холановых кислот.....	70
2.4. Исследование процесса окисления ацильных производных тиосемикар- базидов холановой кислоты.....	77
2.5. Исследование реакций нуклеофильного замещения для некоторых соеди- нений 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксидгидразидов холановой кис- лоты.....	83
2.6. Применение масс- и ЯМР-спектроскопии для определения строения синтезированных соединений.....	92
ГЛАВА 3. ПОИСК ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ПОЛУЧЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ.....	109
3.1. Изучение токсичности и противомикробной активности некоторых тио- семикарбазидов холановых кислот.....	110
3.2. Оценка гепатопротективного и холелитолитического потенциала про- пан-1,2-дионового эфира 3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты.....	112

3.3. Применение газохроматографического анализа холяновых и жирных кислот в диагностике жировой болезни печени.....	114
ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	127
4.1. Техника эксперимента, используемые реактивы и условия синтеза.....	127
4.2. Синтез 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холяновой кислоты.....	128
4.3. Синтез 3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холяновой кислоты.....	129
4.4. Синтез 3 α -гидрокси-5 β -холяновой кислоты.....	129
4.5. Синтез 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холяновой кислоты.....	130
4.6. Синтез 3 α ,7 α ,12 α -трикетто-5 β -холяновой кислоты.....	130
4.7. Синтез метилового эфира 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холяновой кислоты.....	131
4.8. Синтез метилового эфира 3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холяновой кислоты..	132
4.9. Синтез метилового эфира 3 α ,7 α ,12 α -трикетто-5 β -холяновой кислоты...	132
4.10. Получение гидразида 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холяновой кислоты..	133
4.10.1. Получение 6-хлор-2-метилбензо(b)тиофен-1,1-диоксид-гидразида 3 α ,7 α ,12 α - тригидрокси-5 β -холяновой кислоты.....	133
4.10.2. Синтез пропан-1,2-диолового эфира 3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холяновой кислоты.....	134
4.10.3. Получение 6-хлор-2-метилбензо(b)тиофен-1,1-диоксид-гидразида 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холяновой кислоты (XLI).....	134
4.10.4. Синтез 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холяновой кислоты из 3 α -ацетто-7 α -гидроксиметилхолата.....	135
4.10.5. Синтез 3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холяновой кислоты из 3 α ,12 α - дигидрокси-7-кетометилхолата.....	135
4.10.6. Синтез 3 α ,7 α -диацетокси-метилхолата из 3 α -ацетокси-7 α -гидроксиметилхолата.....	136
4.10.7. Синтез тиосемикарбазида 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холяновой кислоты.....	137
ВЫВОДЫ.....	138
ЛИТЕРАТУРА.....	140
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	159

Список сокращений

ХК - холевая кислота;
ЛХК - литохолевая кислота;
ХДК - хенодезоксихолевая кислота;
ДегХК - дегидрохолевая кислота;
УДХК – урсодезоксихолевая кислота;
АТС - аналитическая тонкослойная хроматография;
ГЖХ - газожидкостная хроматография;
ПМР - протонный магнитный резонанс;
ЯМР - ядерный магнитный резонанс,
ИК – инфракрасная спектрометрия;
ГМДС – гексаметилдисилан;
ХЧ - химически чистый;
НАЖБ - неалкогольная жировая болезнь печени;
АсАТ – аспартатамино-трансфераза;
АлАТ – аланинамино-трансфераза;
ЩФ - щелочная фосфатаза;
ЛД₅₀ - летальная доза для 50% подопытных животных;
ЛД₁₀₀ - летальная доза для 100% подопытных животных;
МПД - максимально переносимая доза;
TSCl - пара-толуолсульфохлорид.

ВВЕДЕНИЕ

Данная диссертационная работа выполнена в контексте синтеза органических соединений на основе ряда представителей холановых кислот, такие как 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановая и 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты, с целью выявления ранее неописанных (или описанных не полностью) путей синтеза производных данного типа соединений, с дальнейшим изучением их биологической активности имеющимися методами.

Известно, что модифицированные соединения составляют фундаментальную основу для понимания всего разнообразия и биологической роли данного класса стероидных кислот. Они представляют интерес как потенциальные холелитолитические, гепатопротективные, желчегонные, противовоспалительные и антимикробные средства, а также обладают большим потенциалом для дальнейшего синтеза потенциально биологически активных производных.

Актуальность темы. Стероиды — это обширный класс органических соединений, значение которых в химии, биохимии, медицине, фармацевтической промышленности и в ряде других областей науки имеет тенденцию к возрастанию за последние десятилетия.

К стероидам относятся многочисленные вещества гормональной природы, а также холестерин, холановые кислоты и другие соединения. Особый интерес представляют такие представители холановых кислот, как 3 α -гидрокси-5 β -, 3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -, 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -, 3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -, 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -, 3 α ,7 α ,12 α -трикето-5 β -, 3-ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -, 3 α ,7 α -дигидрокси-12 α -кето-5 β -холановые кислоты содержащие гидроксильные группы, легко окисляемые до кетогрупп, а также их ацилпроизводные. Ввиду своей полифункциональности возникает целый ряд возможностей получения новых производных холановых кислот, с потенциальными возможностями проявления холелитолитических, противовоспалительных, антимикробных, гепатопротективных препаратов свойств и поликатионных амфифилов.

Холановые кислоты являются C₂₄-стероидами с холановым скелетом,

который может быть получен из прегнана присоединением к C_{20} -атому н пропилового радикала или отщеплением от холестанового скелета конечной изопропильной группы в C_{17} -боковой цепи (в действительности последнее кажется более убедительным, так как холановые кислоты являются метаболитами холестерина). Необходимо отметить, что во всех главных производных кольца А и В находятся в цис-положении (5β -холан).

C_{24} -атом несет карбоксильную функцию. Гидроксильные группы (обычно в α -конфигурации) находятся в положениях 3, 6, 7 и 12.

В составе желчи содержатся большое количество холановых кислот (порядка 1-2%), в крови же их содержание примерно на четыре порядка ниже. Определение содержания холановых кислот является важной частью клинического анализа, так как эти данные представляют значительную ценность при диагностике и эффективном лечении различных заболеваний гепатобилиарной системы.

Существует несколько подходов к составлению программы целенаправленного синтеза новых холелитолитических, желчегонных и гиполипидических препаратов. Весьма хорошим оказался метод модификации структуры уже известных синтетических лекарственных средств на примере стероидов, которые нашли свое отражение в данной работе. Есть сведения о том, что химическая модификация гидроксильных групп $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидроксихолановой кислоты позволяет получать производные с широким спектром биологической активности.

Для этого нахождение наиболее приемлемых условий получения ряда аналогов холановых кислот на примере сложных эфиров, ацилпроизводных, кетопроизводных и замещенных гидразид- и 3,6-дихлор-2-метилбензо[β]тиофен-1,1-диоксидапроизводных, одновременно модификация их строения с целью получения новых стероидов с заданными и потенциальными биологическими свойствами, представляют актуальную задачу в программе развития органической химии.

Данное исследование на тему: «Синтез и исследование свойств новых

структурных разновидностей производных холановых кислот», как часть плановых исследований с целью получения биологически активных соединений, обладающих антимикробными и антиоксидантными свойствами, в течении нескольких последних лет проводились в лаборатории химия синтетических и природных гетероциклические соединений ГНУ «Институт химии им. В.И. Никитина» Национальной академии наук Таджикистана.

Цель работы заключалась в следующем:

- исследование процессов этерификации - детальное изучение механизмов образования сложных эфиров с использованием двух ключевых субстратов: 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты и 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты, с выявлением условий и систематизацией оптимальных параметров синтеза;
- комплексное исследование химического поведения синтезированных сложных эфиров 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты в реакциях ацилирования и разработка подходов к целенаправленному функционализированию молекулы;
- поиск и оптимизация условий проведения реакций окисления для ряда алкилпроизводных 3 α ,7 α -диацетокси-5 β -холановой кислоты при варьировании типа окислителя, концентрации реагентов; температурного режима; продолжительность процесса и синтез кетопроизводных с высокой степенью чистоты и выхода;
- разработка методов получения тиосемикарбазидных производных на основе эфиров 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты и поиск оптимальных условий реакции (рН среды, температуры, мольных соотношений реагентов);
- изучение нуклеофильных свойств гидразидных производных, включающее исследование поведения гидразидпроизводных и гидразидов на основе 6-хлор-2-метилбензо[β]тиофен-1,1-диоксида в реакциях нуклеофильного замещения с некоторыми холановыми кислотами;

- разработка аналитической процедуры, основанной на методе газожидкостной хроматографии с количественным определением содержания высших жирных кислот и холановых кислот в составе сыворотки крови;
- систематический поиск вероятных направлений практического применения синтезированных соединений, в частности в качестве фармакологических препаратов и функциональных материалов.

Для достижения цели и поставленных задач были осуществлены следующие научные изыскания:

- проведён синтез и характеристика некоторых сложных эфирных производных $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты и 3α -ацетокси- 7α -гидрокси- 5β -холановой кислоты;
- анализируется реакционная активность рассматриваемых соединений при ацилировании и выявление закономерностей химического поведения молекул;
- изучено окисление синтезированных соединений - сложных эфиров $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты;
- применена газожидкостная хроматография для количественного анализа холановых и жирных кислот в сыворотке крови; показана перспектива диагностики и терапии ЖБП.

Научная новизна:

- определены новые подходы к синтезу эфиров $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты и 3α -ацетокси- 7α -гидрокси- 5β -холановой кислоты с различными спиртами;
- проведено ацилирование эфиров $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты, в которых гидроксильная группа C-7 неизменна, выход выше в случае изопропиловых и бутиловых эфиров.
- впервые изучено окисление ацильных производных; изопропиловые и н-бутиловые эфиры повышают выход;

- оптимизированы параметры синтеза тиосемикарбазидов; показано, что тиосемикарбазиды высших жирных кислот дают более высокий выход гидразиновых производных;

Степень разработанности. Для настоящей темы подтверждены степень новизны и практическая значимость результатов исследования, которые обсуждаются в работе. Настоящая тема полностью соответствует содержанию диссертационной работы. Структура, содержание, а также оформление списка цитируемой литературы, материала соответствует ГОСТ-у Р 7.0.11-2011 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Диссертация и автореферат диссертации. Структура и правила оформления. М.: Стандартинформ» – 2012».

Методология и методы исследования.

Применены современные методики органического синтеза для получения сложных эфиров холановых кислот, кето- и ацетатопроизводных холановых кислот, а также их тиосемикарбазидных и гидразидных соединений. Химическая структура и чистота полученных веществ подтверждались с использованием газожидкостной хроматографии, что обеспечивало воспроизводимость результатов. Фармакологические свойства и токсикологическая безопасность исследованных соединений оценивались в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, включая тестирование антимикробной активности против патогенных штаммов микроорганизмов.

Практическая значимость выполненного исследования проявляется в многоаспектном применении ряд синтезированных эфиров в данной работе использован в качестве эталонных образцов с целью анализа холановых кислот в сыворотке крови у больных с жировой болезнью печени, методом ГЖХ. Результаты газохроматографического определения содержания холановых высших и жирных кислот в сыворотке крови имеют важное диагностическое значение, а также для эффективного лечения различных заболеваний жировой болезни печени. Полученные тиосемикарбазиды 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксим-5 β -, тиосемикарбазиды 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановых кислот

проявляют низкую токсичность и выраженную антимикробную активностью по отношению к полевым культурам стафилококка, нокардии, пастереллы, коринебактерий, выделенных из животных, заболевших респираторными заболеваниями.

Пропан-1,2-диоловый эфир $3\alpha,7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты проявляет холелитолитическое, гепатопротективное свойства.

Публикации. Основные результаты отражены в 20 научных работах, в том числе 5 статьях рецензируемых журналов, рекомендованных ВАК РФ, 15 работах в материалах международных и республиканских конференций в виде статей и тезисов и получен 1 патент Республики Таджикистан.

Личный вклад автора. Диссертант принимал непосредственное участие во всех этапах работы, включая планирование целей и задач исследования, выполнение экспериментов, в том числе и биологических испытаний, анализ и интерпретацию полученных данных, написание и оформление публикаций по результатам исследования.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на: Респ. науч-практ. конф. XVII Нумановские чтения «Развитие современной химии и её теоретические и практические аспекты» (Душанбе, Институт химии НАНТ, 2021); Межд. науч-практ. конф. «Развитие математических, точных и естественных наук в современном времени: проблемы и перспективы» посвящённой «Двадцатилетию изучения и развитие естественных, точных и математических наук в сфере науки и образования» (2020-2040 годы) (Дангара, Дангаринский государственный университет, 2022); Межд. науч. конф. «Вопросы физической и координационной химии», посвящённой «Двадцатилетию изучения и развитие естественных, точных и математических наук в сфере науки и образования» (2020-2040 годы) (Душанбе, ТНУ, 2023); Межд. науч-практ. конф. XVIII Нумановские чтения «Развитие современной химии и её теоретические и практические аспекты» (Душанбе, Институт химии НАНТ, 2023); Межд. науч-практ. конф «Развитие математических, точных и естественных наук в современном времени:

проблемы и перспективы» посвящённая «Двадцатилетию изучения и развития естественных, точных и математических наук в сфере науки и образования» (2020-2040 годы) (Дангара, Дангаринский государственный университет, 2024); Межд. науч-практ. конф. «Технологии и инновации в реализации Стратегии развития науки и техники» (вклад развития математических, точных и естественных наук в прогресс промышленности и сферы услуг), посвящённая «Реализации Стратегии развития точных и математических наук на 2020-2040 годы и Государственной целевой программе развития математических, точных и естественных наук на 2021-2025 годы» и дню Таджикской науки (Худжанд, 2025).

Объём и структура работы. Диссертационная работа имеет логически выстроенную структуру и состоит из следующих основных частей: введения, четырёх глав, основного текста, выводов и списка использованной литературы, включающего 168 наименований.

Общий объём работы составляет 161 страниц, выполненной в формате компьютерного набора текста. Работа иллюстрирована 19 рисунками, 24 схемами синтеза, содержит 12 таблиц, где систематизированы экспериментальные данные, результаты исследований, показатели активности синтезированных соединений и сравнительные характеристики.

ГЛАВА 1. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХОЛАНОВЫХ КИСЛОТ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

Разработка и совершенствование методических подходов к синтезу новых производных холановых кислот, исследование их реакционной активности, поиск путей функциональной модификации, а также определение направлений возможного практического применения этих соединений представляются одним из наиболее актуальных и перспективных направлений современной химической науки. Важнейшим аспектом в данном контексте выступает экологическая безопасность: процессы синтеза и образующиеся побочные продукты должны быть не только лишены вредного воздействия на окружающую среду, но и при попадании в неё легко подвергаться биологическому разложению под действием микроорганизмов, что обеспечивает их экологическую совместимость и минимизирует риск накопления токсичных соединений [1–15].

По этой причине модификационный синтез различных производных холановых кислот продолжает рассматриваться как одно из приоритетных направлений развития стероидной химии, формируя основу для дальнейших исследований в области устойчивых и экологически безопасных технологий, способных соответствовать современным требованиям науки и практики. Интерес к данной области определяется тем, что многие соединения этого ряда обладают выраженной биологической активностью, находят применение при создании холелитолитических препаратов, используются в полусинтезе ряда стероидных гормонов, а также открывают новые перспективы для разработки фармакологических средств с расширенным спектром терапевтического действия [16–19].

Значительный научный интерес представляют новые данные о производных 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты, поскольку они открывают дополнительные горизонты для углублённого развития стероидной химии и расширения биомедицинских исследований. В последние годы эти

соединения стали основой для синтеза катионных стероидных антибиотиков, способных вступать во взаимодействие с липидными структурами клеточных мембран. Эти синтезированные соединения продемонстрировали выраженный бактериостатический эффект, одновременно с заметной бактерицидной активностью [20].

В организме человека холановые кислоты и их соли выполняют важнейшие физиологические функции, способствуя гидролизу жиров, нормализации процессов пищеварения и поддержанию метаболического равновесия [21].

При развитии желчнокаменной болезни нарушается обмен холестерина, изменяется количественное соотношение холановых кислот, синтезируемых из холестерина под действием фермента 7α -гидроксилазы, что приводит к патологическим изменениям в гепатобилиарной системе. Известно, что ряд природных и синтетических холановых кислот применяется в качестве холелитолитических препаратов при терапии желчнокаменной болезни, обеспечивая растворение камней и восстановление нормального желчеобразования [22].

Несмотря на высокую значимость данного направления, количество исследований, посвящённых синтезу новых аналогов холановых кислот, остаётся ограниченным, что подчёркивает необходимость дальнейших разработок [23–27].

В современных исследованиях неизменно высокий интерес вызывает разработка новых функциональных производных холановых кислот. Учёные активно занимаются преобразованием их реакционно-активных групп — карбоксильных, кетонных и иных. Параллельно ведётся углублённое изучение химических и биологических характеристик полученных соединений. Подобные изыскания открывают перспективы для расширения сферы терапевтического использования этих веществ в медицинской практике.

В последующих разделах изложены данные о методиках синтеза отдельных производных холановых кислот. Детально проанализированы нюансы структурных изменений и трансформационных процессов, которым подвергаются соединения. Кроме того, приведены итоги исследований,

посвящённых анализу поведения этих веществ в разнообразных биологических жидкостях. Полученные результаты дают возможность объективно судить о степени химической устойчивости соединений и их биологической роли.

1.1. Известные пути синтеза ряда производных холановых кислот

Стероиды представляют собой обширную группу природных соединений, которые отличаются выраженной биологической активностью и широко распространены в живой природе. Эти вещества играют важнейшую роль в обеспечении жизнедеятельности организмов - от клеточных процессов до регуляции сложных физиологических функций. Они присутствуют во всех царствах живой природы - у животных, растений, грибов и микроорганизмов - и участвуют в широком спектре физиологических процессов. Особое место среди стероидов занимают стеролы (или стерины) - стероидные спирты, для которых характерно наличие гидроксильной группы в положении $C - 3$ стероидного ядра (функциональная группа $X - OH$) и углеводородного бокового радикала при положении $C - 17$. Структурные особенности стеролов обуславливают их высокую биологическую активность, мембраностабилизирующие свойства и участие в регуляции обмена веществ.

В организмах животных и человека основным стероидом является холестерин (схема 1.1), который может составлять до 7% сухой массы различных тканей.

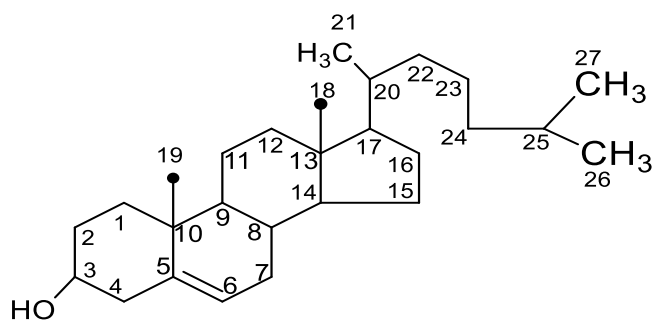


Схема 1.1 - Структурная формула холестерина

Холестерин входит в состав клеточных мембран, обеспечивая их пластичность и проницаемость, служит предшественником желчных кислот, стероидных гормонов (глюкокортикоидов, минералокортикоидов, половых гормонов), а также витамина D. Холестерин также содержится в значительных количествах в составе животных жиров, где способствует их структурной стабильности. В растительных тканях преобладают фитостеролы (β -ситостерин, кампестерол, стигмастерол и др.), выполняющие аналогичную холестерину функцию - стабилизацию клеточных мембран. Фитостеролы обладают выраженными гипохолестеринемическими свойствами и активно используются в пищевой промышленности и медицине. Микроорганизмы и грибы синтезируют свои специфические стероиды, например, эргостерол, который является важным компонентом мембран грибов и служит мишенью для действия многих современных противогрибковых препаратов, что подчёркивает его биологическую и фармакологическую значимость.

Процесс биосинтеза в организме человека начинается с холестерина, из которого формируются биологически значимые соединения - в частности, холановые кислоты и стероидные гормоны. Эти соединения выполняют важнейшую функцию в регуляции метаболических процессов.

Экспериментальные данные демонстрируют: наиболее активное укорочение боковой цепи холестеринового скелета происходит именно в печени. Этот орган играет центральную роль в синтезе холановых кислот, а также обеспечивает корректное функционирование гепатобилиарной системы.

Согласно научным публикациям [28–29], $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановая кислота обнаруживается в разнообразных природных источниках. Данный факт служит доказательством её широкой распространённости в природе и существенной биологической ценности. Современные исследования выявляют выраженную биологическую активность у модифицированных 8-аза-стероидов. Эти соединения демонстрируют способность регулировать иммунный ответ организма и оказывать влияние на его защитные механизмы [30].

Экспериментальные данные свидетельствуют: в рамках метаболических

реакций $3\alpha,7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановые кислоты подвергаются конъюгационным превращениям. Кишечная микрофлора катализирует их трансформацию в 12-кетолитохолевую или литохолевую кислоту - детали процесса отражены на схеме 1.2:

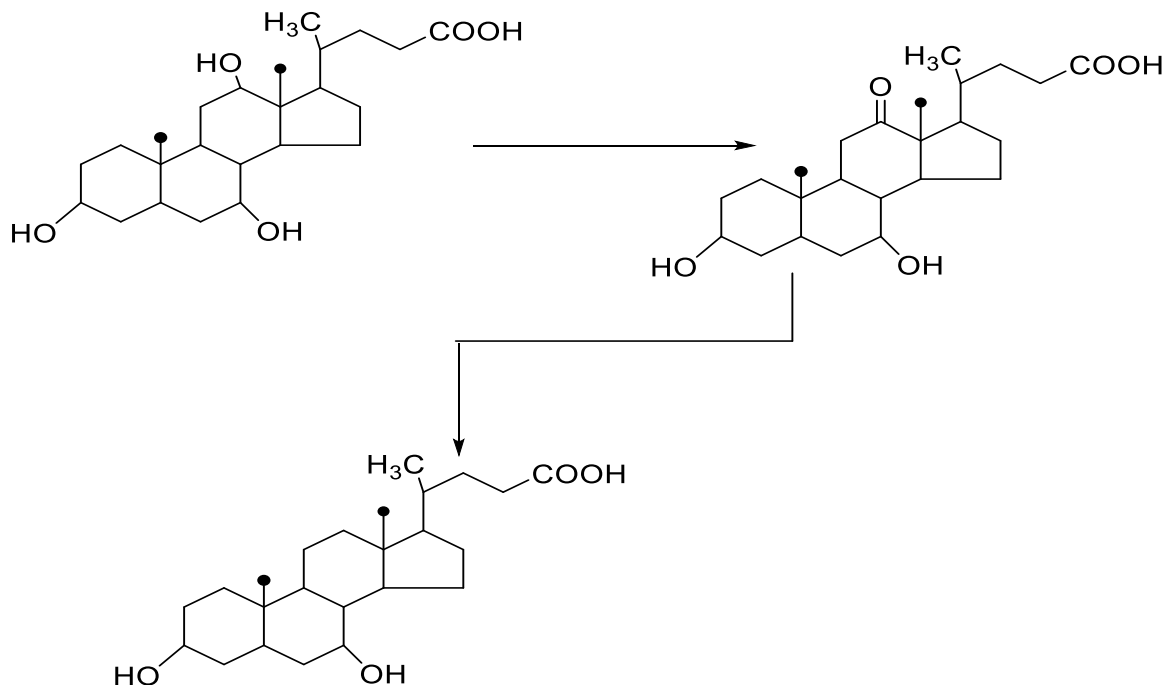


Схема 1.2 – Получение $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановых кислот из $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси-12-кето- 5β -холановой кислоты

В ряду многочисленных производных холановых кислот особое внимание привлекает литохолевая, которая отличается выраженной токсичностью и способностью инициировать разрушение молекул ДНК, провоцировать мутагенные эффекты, повреждать эпителий желчных протоков и в конечном итоге приводить к развитию тяжёлых форм печёночной недостаточности [31–32].

Результаты проведённых экспериментальных исследований показывают, что у практически здоровых людей до 41% $3\alpha,7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты трансформируется в 3α -гидроксихолановую кислоту в течение двух часов инкубации *in vitro*, тогда как *in vivo* этот процесс может достигать полного преобразования (100%) в диапазоне 12-24 часов, что свидетельствует

о высокой скорости и эффективности метаболических реакций в организме [33].

С позиции химической модификации установлено, что аксиальный гидроксил в положении 12 α подвергается более лёгкому окислению по сравнению с другими гидроксильными группами, что позволяет сначала перевести его в карбонильную форму, а затем посредством методики Кижнера–Вольфа восстановить до метиленовой группы (CH₂), в результате чего происходит образование 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты [29].

Повторение аналогичной реакции с гидроксилом в положении 12 приводит к дальнейшему восстановлению и удалению гидроксильной функции, что приводит к получению 3 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты (схема 1.3). Такой подход демонстрирует возможность селективной модификации гидроксильных групп холановых кислот и является основой для синтеза различных производных с заданными химическими и биологическими свойствами.

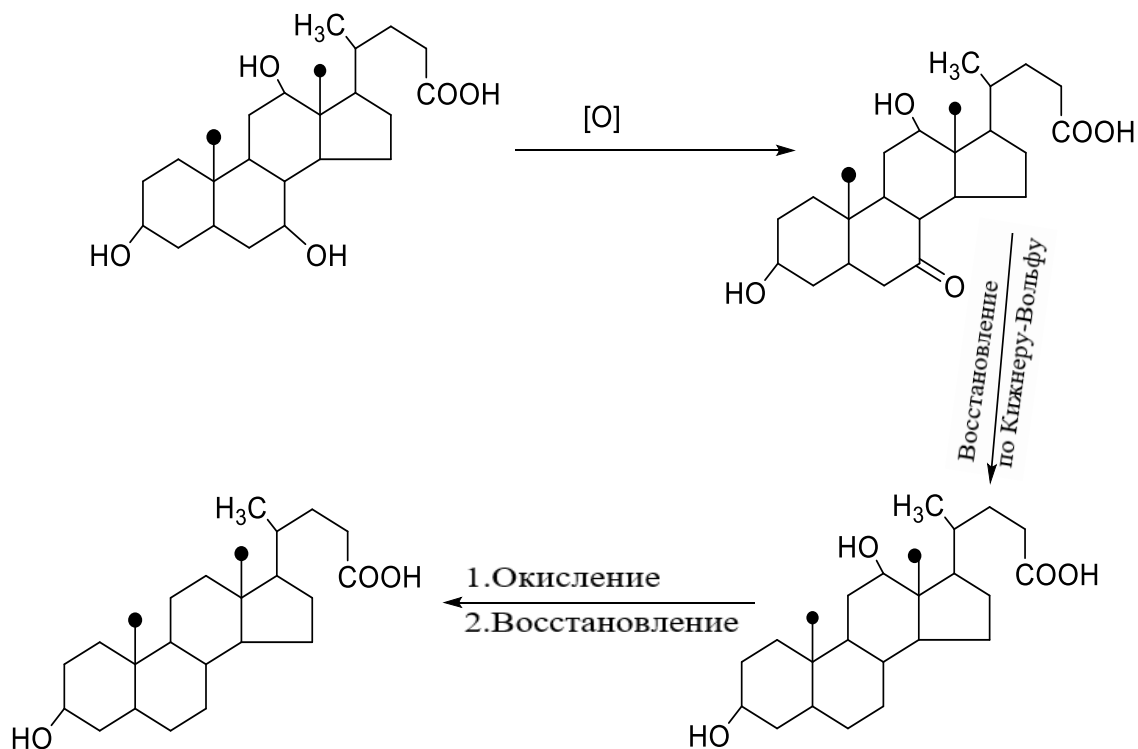


Схема 1.3 - Восстановление 3 α , 12 α -дигидрокси-5 β -холановых кислот до 3 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты по методу Кижнера-Вольфа

Для проведения селективного введения ацильных остатков в молекуле $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты, нацеленного исключительно на гидроксильные функциональные группы в позициях 3α и 7α , оптимальным методом является обработка уксусным ангидридом. В качестве ключевой среды для данного химического превращения традиционно применяется ароматический растворитель бензол.

Обязательным условием процесса выступает добавление абсолютного пиридина, выполняющего двойную функцию кислотного акцептора и каталитического компонента. Поддержание температурного режима (25°C) на протяжении всей реакции обеспечивает достижение высокого выхода целевых продуктов, согласно данным литературного источника [34].

Такой подход позволяет селективно защитить гидроксильные группы в положении 3α и 7α , оставляя гидроксил в положении 12α свободным для дальнейшей химической модификации. Метод избирательного ацилирования широко применяется при синтезе сложных эфиров холановых кислот, обеспечивая возможность получения производных с заданной функциональной группировкой и последующей биологической активностью.

Данная методика является важной частью стратегии целенаправленного синтеза производных холановых кислот, поскольку позволяет контролировать реакционную способность каждой гидроксильной группы и получать соединения с различной степенью ацилирования (схема 1.4), что существенно расширяет спектр потенциально биологически активных веществ.

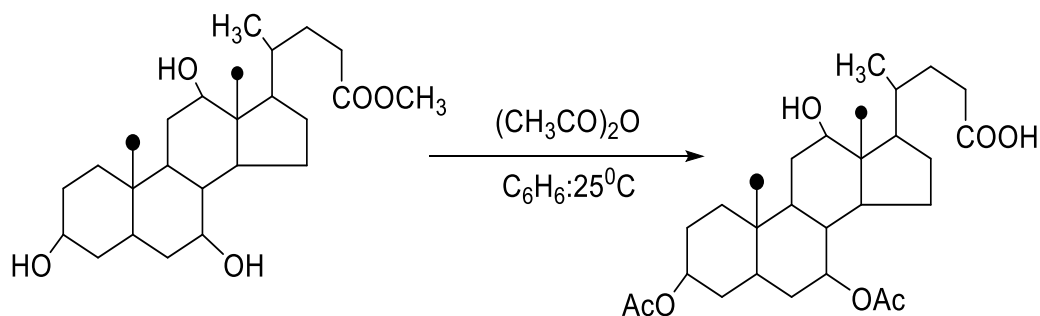


Схема 1.4 - Реакция ацилирования $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты

Дальнейшая химическая трансформация включает окисление гидроксильной группы в положении *C* – 12, что приводит к образованию соответствующего карбонильного соединения. После этого карбонильная группа подвергается восстановлению, в результате чего восстанавливается метиленовая функция, и образуется 3 α , 7 α -дигидрокси-5 β -холановая кислота (схема 1.5) [35–36].

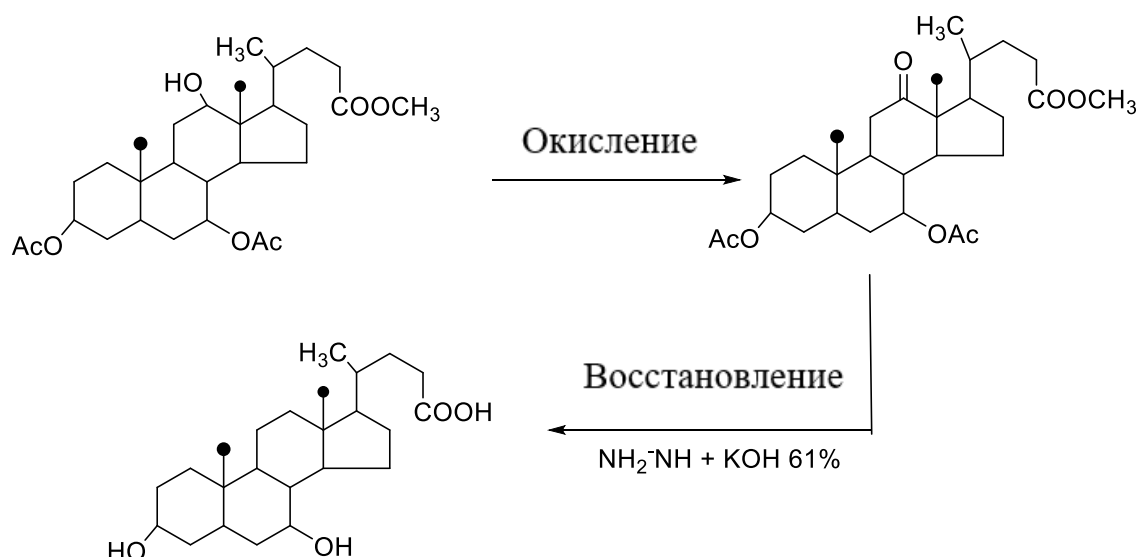


Схема 1.5 - Реакция окисления 3 α , 7 α -диацетокси-12 α -гидрокси-5 β - и восстановление 3 α , 7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты

Этот метод демонстрирует возможность селективной модификации гидроксильных групп холановых кислот и позволяет получать производные с точно определённой функциональной структурой. Такой подход особенно важен для синтеза новых соединений с заданными биологическими свойствами, включая холелитолитическую, гипохолестеринемическую и гепатопротективную активность.

Кроме того, последовательность реакций - избирательное ацилирование, окисление и восстановление - обеспечивает высокую селективность и выход целевых соединений, что делает её эффективным инструментом в органическом синтезе и фармакохимических исследованиях холановых кислот.

В современной клинической практике нашли применение консервативные подходы к устранению конкрементов желчного пузыря, дополняющие

традиционное оперативное лечение. Конкретным примером служит методика фармакологического растворения образований на основе холестерина, направленная на минимизацию травматичности терапии и уменьшение послеоперационных осложнений [37–38]. Разработка новых лекарственных средств с холелитолитическим действием стимулировала синтез моноглицидных производных на основе холанового остова. Ключевой этап получения этих целевых соединений заключался в реакции натриевых солей соответствующих кислот с эпихлоргидрином, обеспечивающей высокую селективность процесса и сохранение потенциала для проявления биологической активности (схема 1.6) [39–40]. Синтезированные соединения обладают выраженной способностью к селективному связыванию с элементами желчи, что приводит к постепенному разрушению структуры холестериновых отложений. Такой подход открывает перспективы для разработки новых фармакологических средств, обладающих как холелитолитическим действием, так и возможностью регулировать состав желчи.

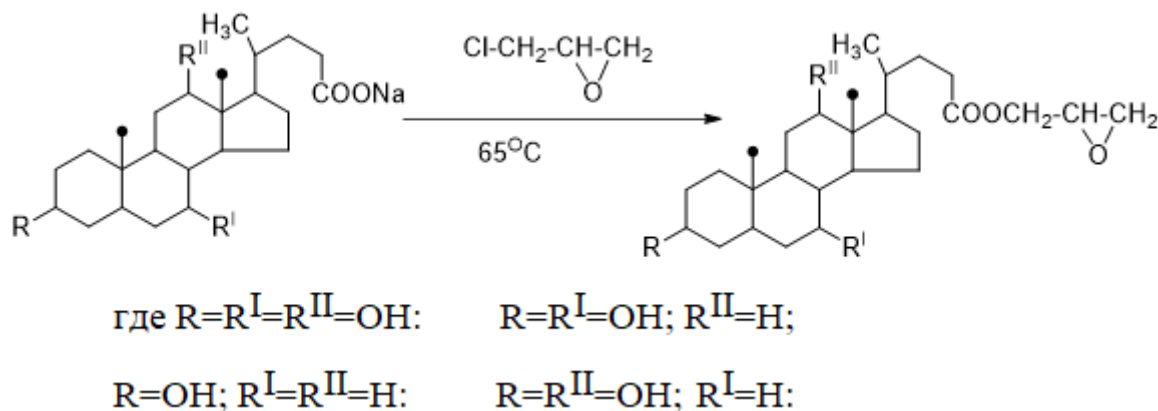


Схема 1.6 - Получение моноглицидных эфиров холановых кислот

Литературные данные свидетельствуют о динамичном развитии научных изысканий в области создания стероидных амфифильных катионных соединений [3-6]. В указанных публикациях детально освещается процедура получения новых веществ данного класса, производных от $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты, где к гидрофобному стероидному каркасу присоединены заряженные катионные модули посредством структурно

разнообразных связующих фрагментов. Исходная холановая кислота, благодаря присущей ей полифункциональности, служит удобным субстратом для целенаправленного синтеза поликатионных амфифилов, несущих множество положительных зарядов в своей архитектуре.

Ключевым решением в разработке синтетической схемы стало использование метилового эфира целевой кислоты. Этот подход позволил: обеспечить надёжную защиту реакционно-способной карбоксильной функции на протяжении всех последующих стадий; добиться высокой селективности при проведении химических трансформаций. В ходе начальной стадии синтеза метилхолат подвергали взаимодействию с 1,1'-карбонилимидазолом. Реакцию вели в абсолютном дихлорметане при каталитическом добавлении триэтиламина. Основным продуктом выступал трисимидазолид, выделенный с выходом 49%. В качестве побочного продукта был идентифицирован 3 α ,7 α -бисимидазолид, выход которого составил 18%, который характеризовался пониженной подвижностью при хроматографическом анализе, что наглядно демонстрировало различия в степени замещения гидроксильных групп в молекуле исходного субстрата. Данный синтетический подход открывает широкие возможности для систематического изучения взаимосвязи между структурой полученных амфифилов и их физико-химическими либо биологическими характеристиками.

Последующая стадия преобразований заключалась в обработке полученного трисимидазолида *N,N*-диметилэтилендиамином в среде дихлорметана, что завершалось генерацией соответствующего третичного аминового производного с выходом, составляющим 36%. Финальная стадия синтеза, представлявшая собой реакцию кватернизации этого промежуточного соединения с применением метилиодида при 82°C в метилэтилкетоне, протекала исключительно эффективно, обеспечивая почти количественное получение целевого катионного липида с выходом 98% и подтверждая оптимальность разработанного методологического подхода (схема 1.7).

Современный период характеризуется активным расширением исследований в области новых липидоподобных катионных амфифилов, обусловленным значительным научным интересом к установлению корреляций между их молекулярным строением и проявляемой биологической активностью. Данный класс соединений способен демонстрировать разнообразные эффекты, в числе которых антимикробное, антибактериальное действие, а также уникальная способность модулировать свойства клеточных мембран. Указанные характеристики открывают серьёзные перспективы для конструирования на их основе инновационных лекарственных средств, направленных на решение актуальных задач медицины, что отражено в современных научных обзорах [41].

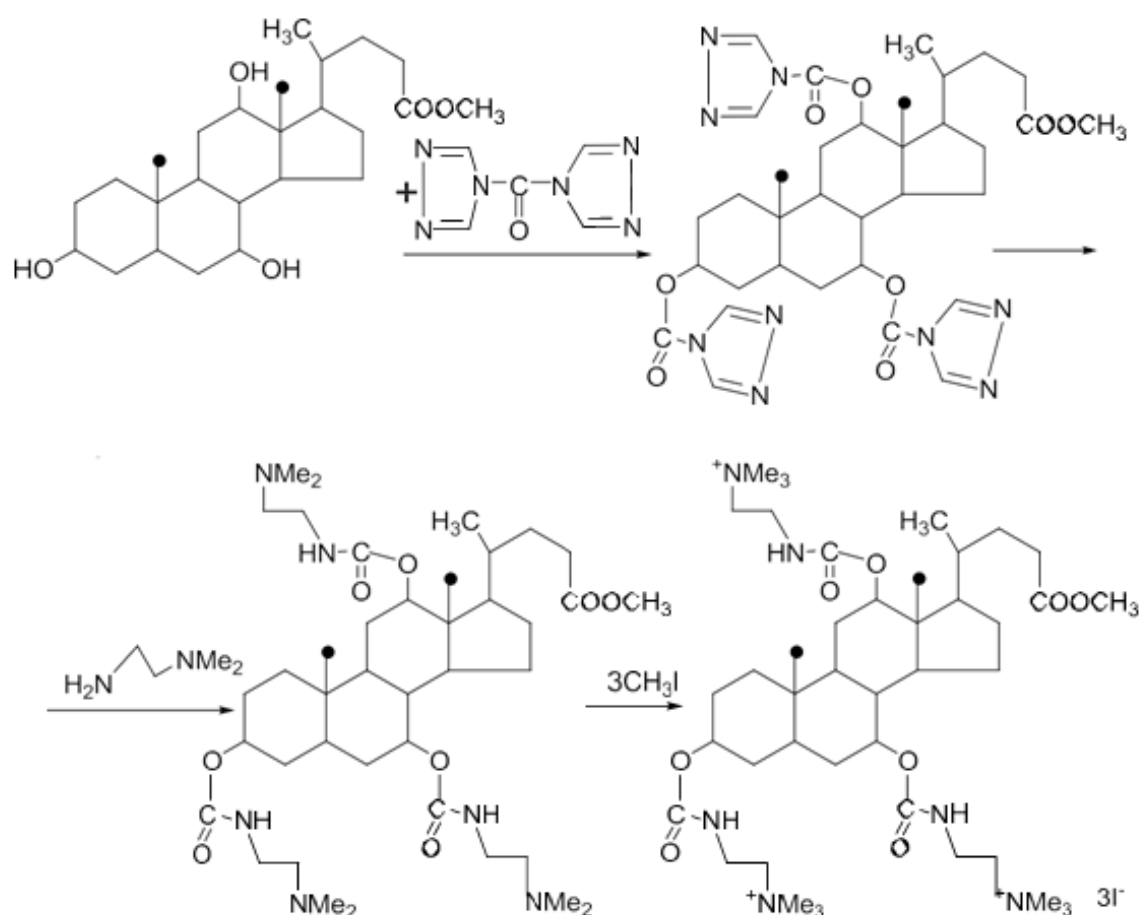


Схема 1.7 - Превращения на основе 3α,7α,12α-тригидрокси-5β-холановой кислоты

Современные исследования в гастроэнтерологии и медицинской химии привели к созданию инновационного класса конъюгатов, известных как FABAC, которые объединяют молекулы жирных кислот с производными холановой кислоты. Данные соединения оказывают выраженное фармакологическое действие, усиливая способность желчи к солубилизации холестерина и тем самым индуцируя процесс разрушения сформировавшихся конкрементов.

Пионерским препаратом, положившим начало данному направлению, стал Арамхол, представляющий собой эфирное соединение холановой и арахидоновой кислот. Помимо мощного литолитического действия, это вещество демонстрирует выраженную способность снижать уровень холестерина и липидов в кровяном русле.

Результаты клинических наблюдений демонстрируют: при применении препарата Арамхол скорость растворения желчных камней существенно превышает аналогичный показатель при терапии 3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислотой. Это свидетельствует о более высокой эффективности Арамхола [42–47].

В рамках синтетических исследований, направленных на модификацию стероидного остова, Шаранин Ю.А. и Шведов В.И. осуществили реакцию между кетостероидом и циануксусным эфиром, применяя классическую методологию Гевальда [48-49]. В данных условиях реакция протекала селективно, затрагивая лишь одну из доступных кетогрупп. Синтез целевого соединения (схема 8) осуществлён методом конденсации. Условия процесса: температура 50°C; длительность 1 час; молярное соотношение реагентов 1:1; заместители (Z) = CN, COOC₂H₅. Полученное вещество расширило ряд гетероциклических стероидных производных с перспективной биологической активностью.

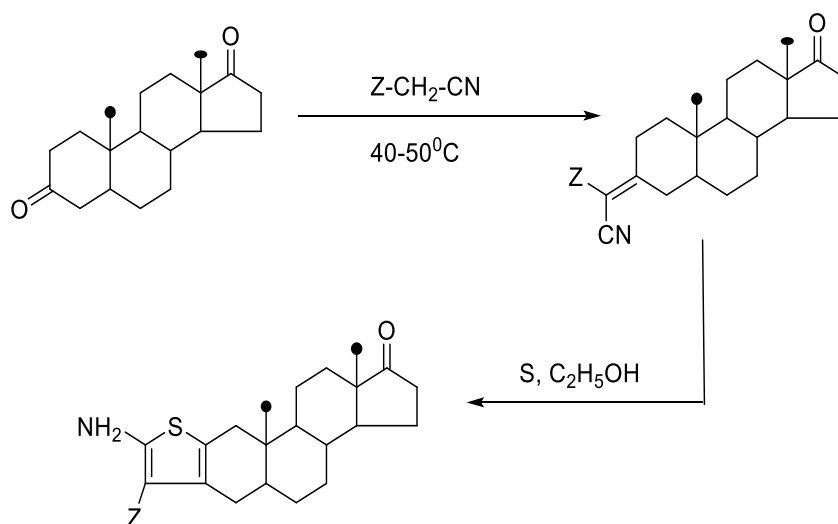


Схема 1.8 - Реакция Гевальда - взаимодействие циануксусного эфира и кето-стероида с получением 2'-аминоандрост-2-ено[2,3-в]тиофен-3'-карбоновой кислоты

Современный лабораторный синтез сложных эфиров ряда холановых кислот, согласно литературному источнику [50], осуществляется по классической методологии этерификации. Ключевым условием проведения данной реакции является нагревание исходной карбоновой кислоты со значительным молярным избытком необходимого спирта в инертной атмосфере. В качестве каталитической добавки, ускоряющей процесс, используются следовые количества сильной минеральной кислоты, например, концентрированной серной или п-толуолсульфокислоты (схема 1.9).

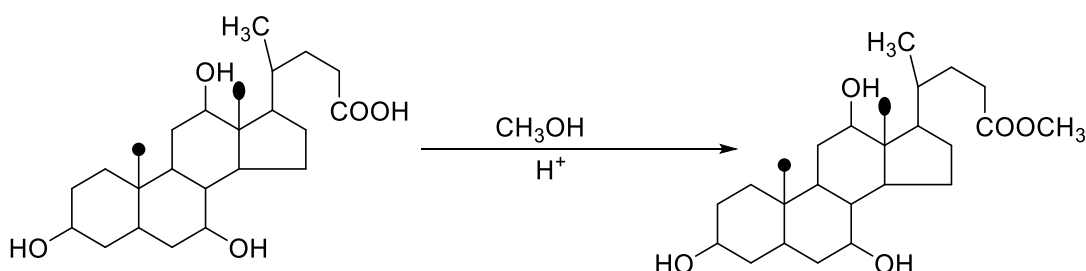


Схема 1.9 - Синтез сложных эфиров

Последующий этап работы был посвящён детальному исследованию реакционной способности полученных эфирных производных (схема 1.10).

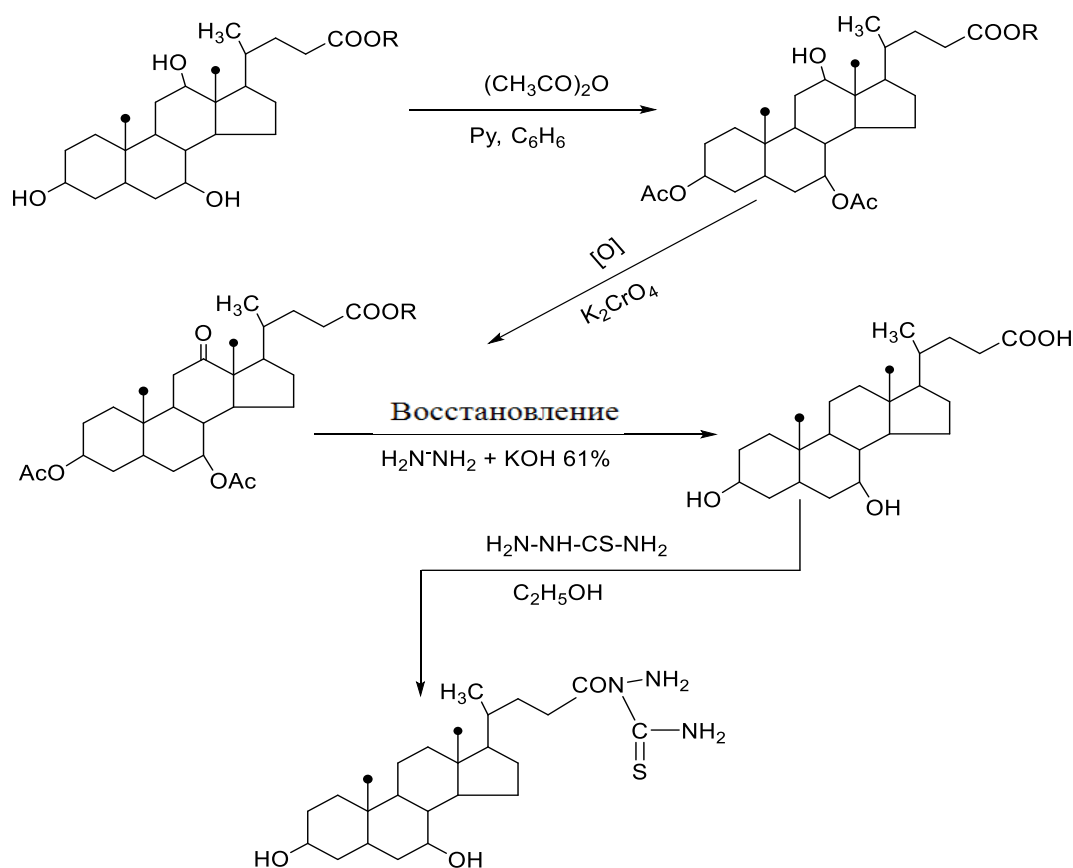


Схема 1.10 - Превращение химические реакция на основе 3 α ,7 α ,12 α -три-
гидрокси-5 β -холановой кислоты

Авторами проводился систематический анализ химических свойств данных соединений в ходе превращений различного типа, включая реакции гидролиза, восстановления и нуклеофильного замещения [51].

Многие исследовательские группы сосредоточились на целенаправленной модификации молекул холановых кислот. Эти соединения рассматриваются в качестве базового субстрата для синтеза биологически активных веществ [52–57]. В рамках проведённых работ учёные осуществляли структурные преобразования молекул - путём ковалентного присоединения различных органических фрагментов к реакционноспособным группам (карбоксильной и гидроксильным).

Параллельно проводились работы по изучению специфических превращений уже синтезированных сложных эфиров, в частности, их реакции с тио-семикарбазидом [58]. Поиск оптимальных условий для проведения процесса

тиосемикарбазидования продемонстрировал, что наиболее эффективно данная конденсация протекает в среде абсолютного этилового спирта при температуре его кипения. Добавление каталитических количеств уксусной кислоты способствует протонированию карбонильной группы сложного эфира, значительно повышая её электрофильность и, как следствие, скорость атаки нуклеофильным азотом тиосемикарбазида (схема 1.11).

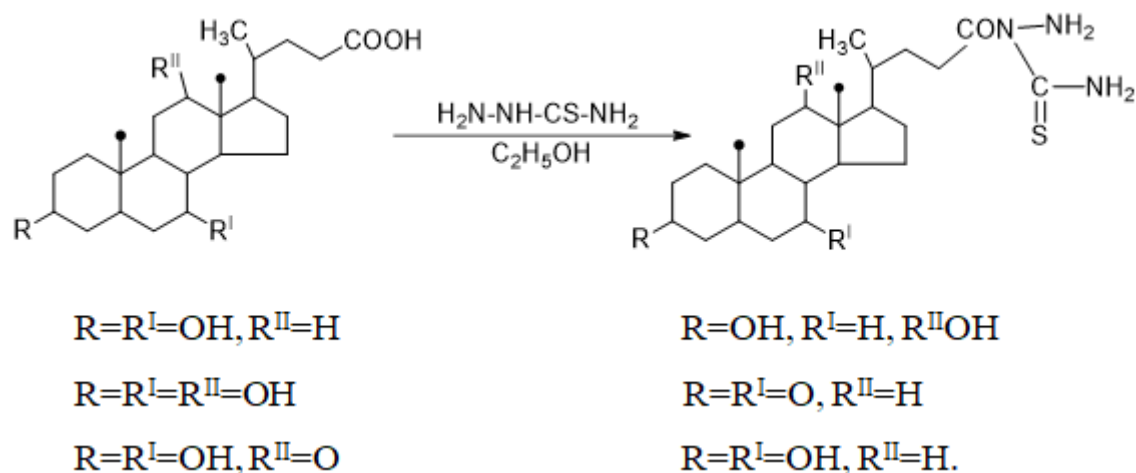


Схема 1.11 - Получение тиосемикарбазидпроизводных холановой кислоты

Для целенаправленного получения стероидных производных с расширенным спектром биологического действия, несущих в своей структуре гетероциклические компоненты был реализован специализированный синтетический подход [59–64]. Ключевой замысел заключался в следующем: взять природный остов холановых кислот и на его основе сформировать новые гетероциклические структуры. Для воплощения идеи была задействована реакция Гевальда - классический метод синтеза тиофенов, представленный на схеме 1.12.

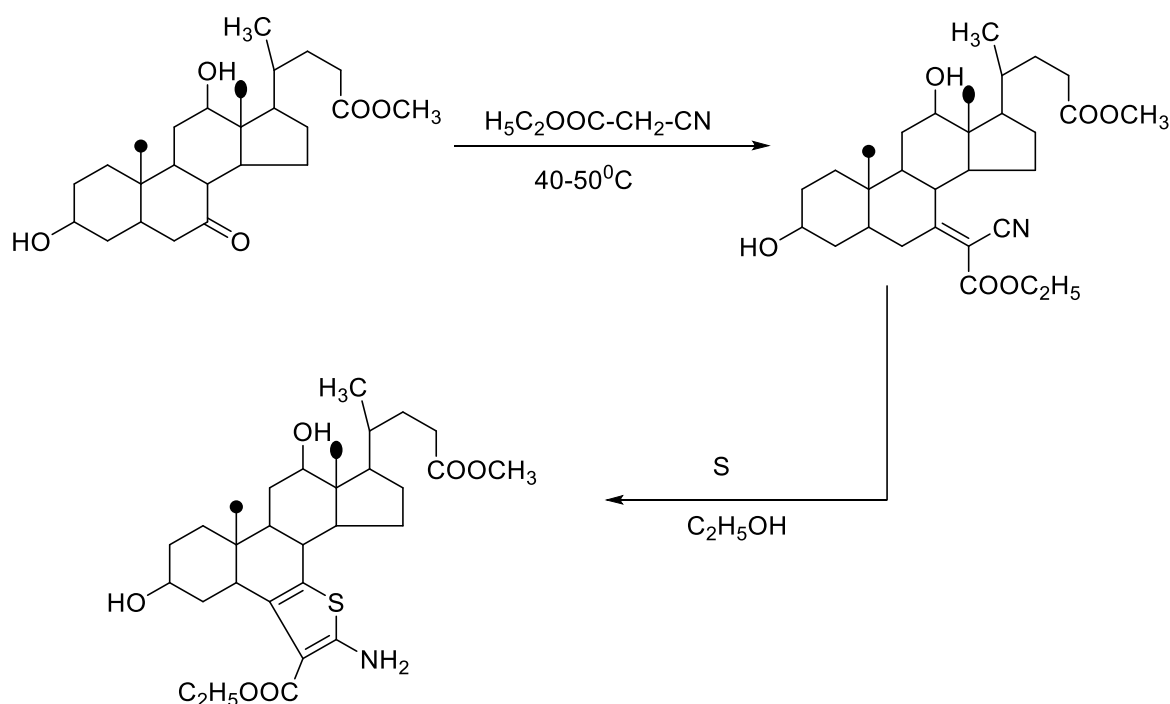


Схема 1.12 – Реакция Гевальда

1.2. Сферы использования холановых кислот и их производных

В сфере здравоохранения особое внимание уделяется проблеме желчнокаменной болезни. Для её решения необходимы: эффективные холелитолитические препараты; постоянный контроль за динамикой содержания холановых кислот в желчи и сыворотке крови; оценка изменений в стероидном профиле организма.

Параллельно развивается направление по синтезу производных стероидов - в частности, холановых и высших жирных кислот. Ключевой подход - задействование их функциональных групп: карбоксильных, кетонных, гидроксильных и эфирных. Это открывает возможности для: развития химии и фармакобиохимии; целенаправленного конструирования препаратов для гепатологии; создания средств для генной терапии.

Желчнокаменная болезнь остаётся серьёзной медицинской проблемой, побуждающей учёных искать инновационные терапевтические подходы. Особое место в этих поисках занимают природные холановые кислоты — их рассматривают как потенциальную основу для разработки новых лекарственных средств. Современные исследования в этой области преследуют две ключевые

цели: Определить, как максимально эффективно применять холановые кислоты в клинической практике. Раскрыть взаимосвязь между молекулярной структурой этих соединений и их биологической активностью.

В рамках данных научных изысканий коллектив авторов [65] успешно синтезировал 1,2-пропандиоловый эфир $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты (схема 1.13).

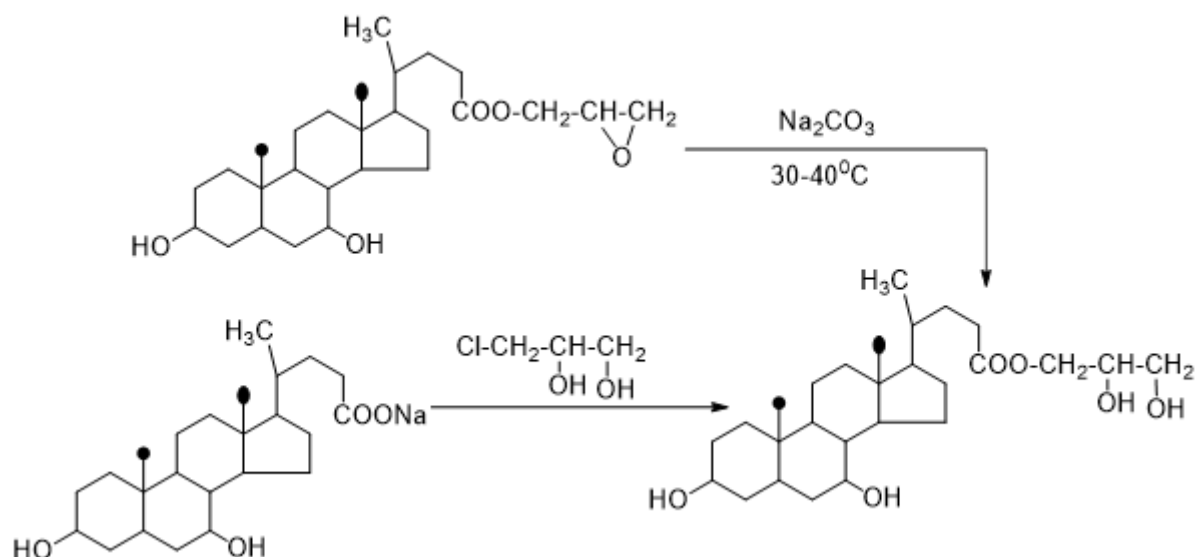


Схема 1.13 - Получение 1,2-пропандиолового эфира $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты

Структурный анализ полученного соединения показал его заметное сходство с уже существующими литолитическими препаратами.. Методика синтеза базировалась на химической реакции между: натриевой солью $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты; α -монохлорглицерином. Эксперимент проводился в строго регламентированных условиях: температурный режим: $65-70^\circ\text{C}$; продолжительность реакции: от 2 до 13 часов. Параметры синтеза подтверждены в работах [66–67].

Учёные предложили оригинальный метод синтеза ключевых компонентов препарата Триоин. В качестве исходных веществ использовались сложные эфиры: пеларгоновой кислоты; октановой кислоты; $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты. Основная цель исследования - оценить способность полученного соединения растворять холестериновые камни. В результате была

создана композиция из трёх указанных веществ, получившая название Триоин [68–73]. Экспериментальные данные подтвердили высокую литолитическую активность Триоина: в условиях *in vitro* (в пробирке); в экспериментах *in vivo* (на живых организмах). Препарат эффективно воздействует как на холестериновые, так и на пигментные камни, локализованные: в желчном пузыре; в желчных протоках.

В последние годы наблюдается устойчивый рост интереса к инновационным технологиям адресной доставки генетического материала. Суть подхода заключается в целенаправленном введении новых блоков генетической информации в клетки с нарушенными функциями - с последующей активацией (экспрессией) нужных генов. Подобные методы особенно актуальны для лечения заболеваний, обусловленных генетическими нарушениями. Ряд патологий в клинической практике напрямую связан с дисфункцией определённых генов [74–75].

Среди современных катионных липидов важную роль играют соединения со стероидной гидрофобной частью. Их структура существенно влияет на эффективность трансфекции ДНК [76–77]. Так, катионные амфифилы на основе 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты (схема 1.14) используют для трансфекции эукариотических клеток: аминогруппа в составе стероида помогает нуклеиновым кислотам проникать в клетку [78–79].

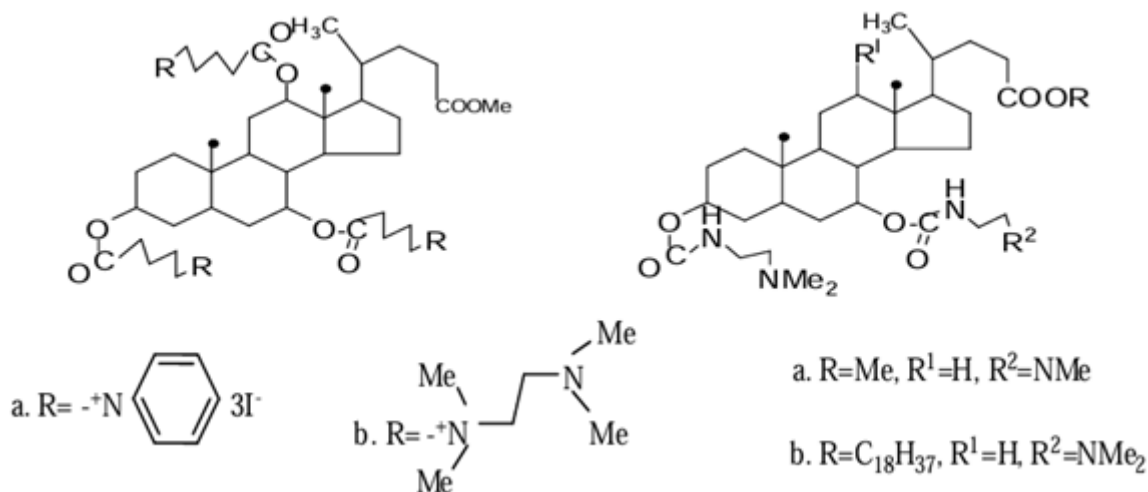


Схема 1.14 - Катионные амфифилы на основе 3 α , 7 α , 12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты

Согласно данным, представленным в литературном источнике [80], повышение концентрации первичной желчной кислоты - $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой (хенодезоксихолевой) кислоты (схема 1.15) - в желчи оказывает существенное влияние на её физико-химические параметры, в первую очередь снижая литогенные свойства.

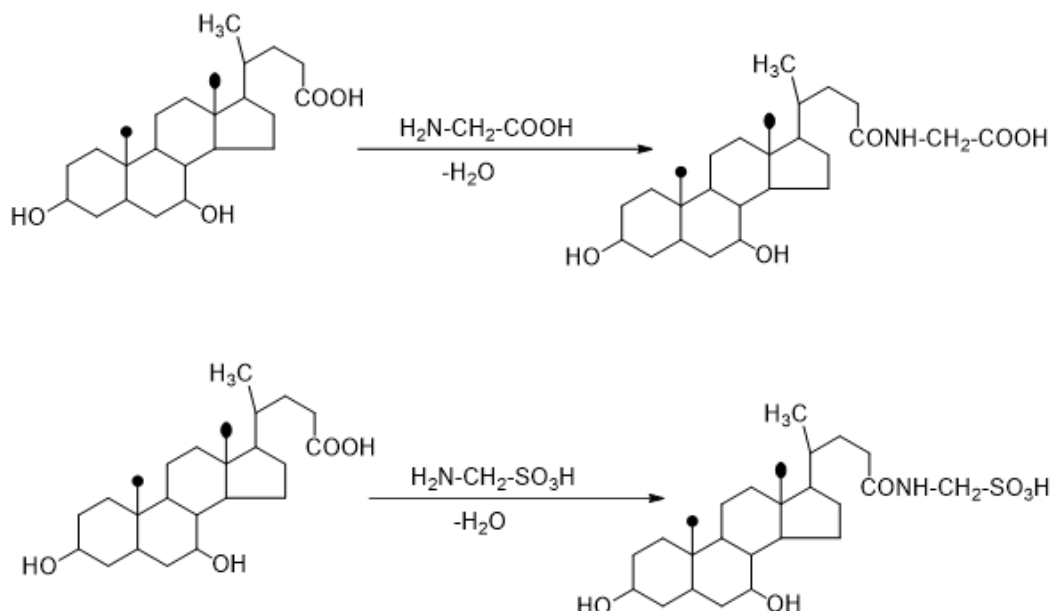


Схема 1.15 - Реакция на основе $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты

Процесс энтерогепатической циркуляции, обеспечивающий повторное использование солей желчных кислот, характеризуется исключительно высокой эффективностью. Благодаря этому механизму, ежедневная экскреция холановых кислот с каловыми массами не превышает 1 грамма. После биосинтеза первичных холановых кислот из холестерина в гепатоцитах происходит их конъюгация с аминокислотами - глицином или таурином, что значительно повышает их детергентные свойства. Образовавшиеся конъюгаты затем активно транспортируются в желчные каналцы для последующей секреции в желчь, завершая начальную фазу цикла [81].

Биосинтез холестерина во всех клетках организма берет начало от мевалоновой кислоты. Этот ключевой предшественник образуется из ацетил-КоА - конечного метаболита бета-окисления жирных кислот, - в ходе реакции, катализируемой ферментом ГМГ-КоА-редуктазой [82].

Современная фармакотерапия обогатилась принципиально новым классом препаратов - секвестрантами желчных кислот. Приоритетное место среди них занимает холестирамин, ставший первым лекарственным средством этой группы, внедрённым в клиническую практику. Дополнительно к классу относятся колестипол и колесевелам. Их терапевтический эффект проявляется непосредственно в просвете кишечника, необратимо связывая соли желчных кислот и препятствуя их реабсорбции. Это приводит к усилению их экскреции более чем на 40%, а также к значимому снижению уровня липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в плазме крови в среднем на 26% [83].

Терапия пациентов с желчнокаменной болезнью с применением $3\alpha, 7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты продемонстрировала ряд преимуществ. Было установлено, что данный изомер оказывает более быстрое литолитическое действие по сравнению с $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислотой, что особенно заметно в первые три месяца лечения. В ходе терапии наблюдалась положительная динамика: улучшение моторно-эвакуаторной функции желчного пузыря и достоверное уменьшение размеров холестериновых конкрементов, что подтверждает её высокую терапевтическую эффективность [84-85].

Проведённый методом газожидкостной хроматографии анализ качественного и количественного состава желчных кислот у пациентов, страдающих желчнокаменной болезнью и находящихся на специализированной терапии, выявил определённые сдвиги в их метаболическом профиле. Зафиксировано статистически значимое увеличение содержания $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты при одновременном снижении концентраций изомеров - $3\alpha, 12\alpha$ -дигидрокси- 5β - и $3\alpha, 7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановых кислот. В печени они метаболизируются до 3α -гидрокси- 5β -холановой кислоты. Последняя, как установлено, обладает способностью индуцировать повреждение цепочек ДНК, демонстрирует комутагенные свойства, и в долгосрочной перспективе может провоцировать развитие печёночной недостаточности [86-87].

В контексте масштабных клинических испытаний наибольшее распространение и признание получила $3\alpha, 7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановая кислота.

Согласно накопленным данным, это единственный представитель холановых кислот, чье применение для терапии холестатических состояний демонстрирует не только высокую эффективность, но и благоприятный профиль безопасности [88].

Многочисленными исследованиями подтвержден механизм ее фармакологического действия: применение $3\alpha, 7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты инициирует формирование в желчи специфической слоистой жидкокристаллической фазы. Эта структурная модификация желчи принципиально меняет ее физико-химические характеристики, одновременно растворяя холестерин.

Клинически подтверждено, что терапевтический курс с суточной дозировкой 10-13 мг на килограмм массы тела, проводимый на протяжении двух лет, приводит к полному растворению холестериновых конкрементов размером до 15 миллиметров у шестидесяти процентов пациентов [89]. Наибольшая результативность наблюдается при наличии конкрементов диаметром около 5 мм, полное исчезновение которых фиксируется у свыше семидесяти процентов лиц, прошедших лечение. При тщательном отборе пациентов по соответствующим критериям (функционирующий желчный пузырь, рентгеногегативные камни) данный консервативный метод демонстрирует устойчивый клинический эффект, а возникающие побочные действия обычно имеют обратимый характер и легко корректируются [89].

Исследование широкого спектра стероидных производных подтвердило, что исключительно $3\alpha, 7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановая кислота обладает доказанной способностью уменьшать размеры холестериновых отложений в полости желчного пузыря, благодаря прямому воздействию на химический состав желчи [90-91]. Сфера ее медицинского применения не ограничивается литолизом; это соединение также назначается с профилактической целью для предотвращения рецидивов камнеобразования, а также в комплексной терапии билиарного цирроза печени и первичного склерозирующего холангита [92].

Резюмируя накопленные научные сведения о литолитических характеристиках холановых кислот, следует признать их важным альтернативным

терапевтическим подходом для определённых категорий пациентов с холелитиазом. Разработка новых лекарственных средств на стероидной платформе, сочетающих желчеразжижающее, гепатопротекторное и гиполипидемическое действие, не утратила актуальности и по-прежнему находится в фокусе внимания учёных-медиков, химиков и фармакологов.

1.3. Применение газохроматографического метода для определения холановых кислот в биоматериалах

На нынешнем этапе развития медицины комплексная проблема - своевременная диагностика и создание действенных схем лечения желчнокаменной болезни и связанных с ней патологий печени - продолжает представлять существенную сложность из-за своей многогранности. Её особая актуальность обусловлена устойчивым ежегодным ростом заболеваемости в глобальном масштабе, что привлекает пристальное внимание широкого круга специалистов. Активные исследования в этой междисциплинарной области ведут фармакологи, занимающиеся созданием новых лекарственных форм, химики и биохимики, изучающие молекулярные основы патологий, а также клиницисты, разрабатывающие практические протоколы лечения.

Проведённый анализ доступных научных публикаций указывает на существующий дефицит детальных и систематизированных данных относительно точного количественного состава холановых кислот не только в желчи, но и в других биологических средах организма у пациентов с холелитиазом, особенно на фоне различных сопутствующих поражений печени. Отдельный пробел в знаниях существует в отношении профиля желчных кислот при таких состояниях, как стеатоз печени и стеатогепатит различной этиологии.

Существенную роль в патогенезе неалкогольной жировой болезни печени играют нарушения в синтезе и энтерогепатическом кругообороте холановых кислот. Результаты, полученные в ходе наших изысканий, наглядно демонстрируют, что как при стеатозе, так и при стеатогепатите наблюдается статистически достоверное повышение концентраций как первичных, так и

вторичных холановых кислот в системной циркуляции [93-94].

Процесс биотрансформации холестерина в холановые кислоты протекает исключительно в гепатоцитах и признан одной из ключевых и специализированных функций данных печеночных клеток. Следовательно, концентрация холановых кислот в сыворотке крови при различных формах поражения печени является прямым отражением степени нарушения этой синтезирующей способности органа. Таким образом, детальные сведения об их количественном составе и процентном соотношении могут служить высокоинформативным диагностическим критерием, объективно характеризующим функциональный резерв и структурную сохранность гепатоцитов [95].

Диагностическая ценность определения концентрации желчных кислот при жировой болезни печени заключается в том, что характерные сдвиги в их сывороточном профиле у пациентов с данной патологией развиваются на более ранних стадиях, чем изменения традиционных биохимических показателей, таких как активность трансаминаз. В связи с этим анализ спектра желчных кислот представляет собой более чувствительный и ранний тест, позволяющий выявить начальные признаки метаболической дисфункции гепатоцитов ещё до клинической манифестации заболевания [96-98].

Концентрация и баланс отдельных фракций желчных кислот в крови точно отражают функциональный статус печёночных клеток и находятся в прямой корреляционной зависимости от тяжести и стадии прогрессирования патологии, будь то жировая дистрофия или цирроз печени. Чтобы наглядно проиллюстрировать экспериментальные данные, исследователи разработали подробный график. Он демонстрирует, как изменяется концентрация основных холановых кислот на разных гистологически верифицированных стадиях неалкогольной жировой болезни печени. Полученная визуализация убедительно подтвердила существование устойчивой корреляции.

Полученные данные убедительно демонстрируют, что в сыворотке крови пациентов со стеатозом и стеатогепатитом, в сравнении с контрольной группой, достоверно повышается общий уровень желчных кислот. Этот рост

обусловлен активизацией процессов расщепления и рециркуляции холатов в печеночно-кишечном контуре, что подтверждается соответствующими исследованиями [99].

Сравнительный анализ данных газохроматографического определения спектра холановых кислот в желчи человека и собак был проведён в ряде исследований [100-102].

Количественный анализ содержания холановых кислот (первичных и вторичных) в желчи больных желчнокаменной болезнью - хорошо изученная область. В рамках исследований учёные последовательно: Оценивали общий пул кислот. Анализировали соотношение отдельных фракций [103–106]. Полученные данные продемонстрировали закономерные изменения профиля холановых кислот в желчи на различных стадиях образования конкрементов у пациентов с холелитиазом [107–110].

Отдельного внимания заслуживает разработанный исследователями новый газохроматографический способ высокоточного определения концентрации холестерина в плазме крови, который был применён как у практически здоровых лиц, так и у пациентов с различными нарушениями липидного обмена [111]. В результате его применения была чётко установлена зависимость уровня холестерина от конкретного этапа литогенеза у больных.

В научной литературе также представлен ряд других работ, где для количественного анализа желчных кислот в сыворотке крови применялся высокочувствительный газохроматографический метод [112]. Анализ данных позволил установить статистически достоверные взаимосвязи: концентрация циркулирующих желчных кислот коррелирует с уровнем холестерина у пациентов, страдающих заболеваниями желчного пузыря и печени. Авторы исследования [112] сосредоточились на изучении метаболизма желчных кислот и холестерина в сыворотке крови у больных циррозом. Полученные результаты подтвердили: этот параметр — важный маркер сохранности функций гепатоцитов. При усугублении печёочно-клеточной недостаточности выраженность нарушений нарастает. Пирротическом поражении печени наиболее

выраженные изменения наблюдаются именно в концентрации холевой кислоты, тогда как другие фракции желчных кислот изменяются менее значительно [113].

До настоящего времени остаются недостаточно изученными аспекты газохроматографического мониторинга желчно-кислотного обмена у пациентов с метаболическим синдромом, особенно в контексте оценки влияния на него различных фармакологических препаратов. Целью одной из научных групп стало изучение характера влияния комбинированной терапии урсодезоксихолевой кислотой и сияфором (метформином) на динамику содержания желчных кислот у лиц с метаболическим синдромом [114].

Проведённое газохроматографическое исследование продемонстрировало, что на фоне терапии комбинацией урсодезоксихолевой кислоты и метформина у пациентов с метаболическим синдромом концентрация холановых кислот в сыворотке крови снижается до значений, сопоставимых с контрольной группой. Анализ полученных данных демонстрирует: предложенная схема способствует нормализации нарушенного желчно-кислотного метаболизма.

Однако в существующих литературных источниках крайне мало информации о динамике профиля желчных кислот при неалкогольном стеатозе и стеатогепатите. Не хватает сведений: об изменениях на разных этапах заболевания; о влиянии различных медикаментозных подходов. Лишь одно исследование охватывает систематическое измерение концентрации холановых кислот в сыворотке крови у здоровых людей и пациентов со стеатозом печени и стеатогепатитом. В нём также проведён сравнительный анализ данных для оптимизации терапии [115].

ГЛАВА 2. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ ХОЛАНОВЫХ КИСЛОТ В РЕАКЦИЯХ РАЗЛИЧНОГО ТИПА (ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ)

Для достижения поставленной задачи потребовалось реализовать развернутый комплекс процедур, включающих синтез и выделение первичных стероидных структур, относящихся к семейству холановых кислот. Эти соединения характеризуются высокой химической активностью, что делает их ценными исходными компонентами для последующих направленных трансформаций в органическом синтезе.

В рамках проведённого экспериментального цикла удалось выделить ряд ключевых представителей данного класса:

- 3α -гидроксид- 5β -холановая кислота;
- $3\alpha, 12\alpha$ -дигидроксид- 5β -холановая кислота;
- $3\alpha, 7\alpha$ -дигидроксид- 5β -холановая кислота;
- $3\alpha, 7\beta$ -дигидроксид- 5β -холановая кислота;
- $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидроксид- 5β -холановая кислота;
- $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -трикетид- 5β -холановая кислота;
- 3-ацетоксид- 7α -гидроксид- 5β -холановая кислота;
- $3\alpha, 7\alpha$ -дигидроксид- 12α -кетид- 5β -холановая кислота [1 16].

Выделенные вещества были использованы в качестве исходных субстратов для проведения широкого спектра реакций, включая: процессы ацилирования; реакции окисления; стадии восстановления; синтез сложных эфирных производных.

Развёрнутая характеристика полученных эталонных образцов холановых кислот и их метиловых производных была систематизирована и представлена в структурированных табличных данных (таблицы 2.1 и 2.2). Для подтверждения уровня чистоты синтезированных соединений применялись два взаимодополняющих аналитических подхода: метод тонкослойной хроматографии (ТСХ); метод газовой хроматографии (ГЖХ).

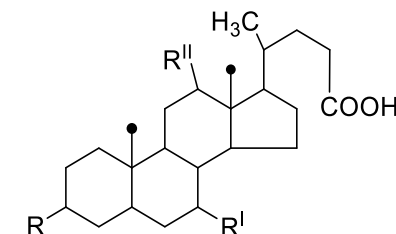


Таблица 2.1 – Характеристика холановых кислот

№ п/п	Холановые кислоты	R	R^I	R^{II}	R^{III}	Выход (%)	$T_{пл.},$ °C	С (%) <u>найдено</u> вычислено	Н (%) <u>найдено</u> вычислено	Брутто- формула
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>I</i>	3 α -гидрокси-5 β -	ОН	Н	Н	H	86	184-185	<u>76.53</u> 76.59	<u>10.61</u> 10.63	$C_{24}H_{40}O_3$
<i>II</i>	3 α , 12 α - дигидрокси-5 β -	ОН	Н	ОН	Н	75	177-178	<u>73.39</u> 73.36	<u>10.16</u> 10.18	$C_{24}H_{40}O_4$
<i>III</i>	3 α , 7 α - дигидрокси-5 β -	ОН	ОН	Н	Н	63	140-141	<u>73.31</u> 73.36	<u>10.12</u> 10.18	$C_{24}H_{40}O_4$
<i>IV</i>	3 α , 7 β - дигидрокси-5 β -	ОН	ОН	Н	Н	88	203-204	<u>73.31</u> 73.36	<u>10.12</u> 10.18	$C_{24}H_{40}O_4$

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
V	3 α , 7 α , 12 α - тригидрокси-5 β -	ОН	ОН	ОН	Н	87	198-199	<u>70.57</u> 70.58	<u>9.86</u> 9.80	C ₂₄ H ₄₀ O ₅
VI	3 α , 7 α , 12 α - трикетто-5 β -	О	О	О	Н	96	237-238	<u>71.06</u> 71.09	<u>9.97</u> 9.95	C ₂₄ H ₃₄ O ₅
VII	3 α , 7 α -дигидрокси-12 α - кетотрикетто-5 β -	ОН	ОН	О	Н	89	210-211	<u>73.06</u> 73.09	<u>9.98</u> 9.96	C ₂₄ H ₃₉ O ₅

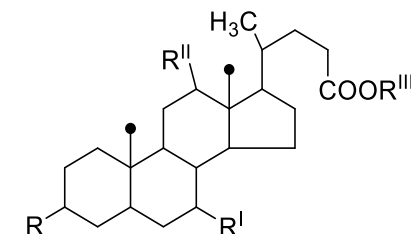


Таблица 2.2 – Характеристика метиловых эфиров холановых кислот

№ п/п	Метиловые эфиры холановых кислот	R	R^I	R^{II}	R^{III}	Выход (%)	$T_{пл.},$ °C	С (%) <u>найдено</u> вычислено	Н (%) <u>найдено</u> вычислено	Брутто- формула
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
VIII	Метиловый эфир 3 α - гидрокси-5 β -	ОН	Н	Н	CH_3	95	129-130	<u>76.92</u> 76.78	<u>10.68</u> 10.83	$C_{25}H_{42}O_3$
IX	Метиловый эфир 3 α , 12 α -дигидрокси-5 β -	ОН	Н	ОН	CH_3	95	75-76	<u>73.78</u> 73.95	<u>10,25</u> 10.34	$C_{25}H_{42}O_4$
X	Метиловый эфир 3 α , 7 α - дигидрокси-5 β -	ОН	ОН	Н	CH_3	90	42-43	<u>73.86</u> 73.95	<u>10.49</u> 10.34	$C_{25}H_{42}O_4$
XI	Метиловый эфир 3 α , 7 α -ди- гидрокси-12 α -кето-5 β -	ОН	ОН	О	CH_3	88	76-77	<u>73.86</u> 73.95	<u>10.49</u> 10.34	$C_{25}H_{42}O_4$

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>XII</i>	Метилловый эфир <i>3\alpha, 7\alpha, 12\alpha</i> - тригидрокси-5\beta-	ОН	ОН	ОН	<i>CH</i> ₃	93	156-157	<u>73.81</u> 73.89	<u>10.39</u> 10.34	<i>C</i> ₂₅ <i>H</i> ₄₂ <i>O</i> ₅
<i>XIII</i>	Метилловый эфир <i>3\alpha, 7\alpha, 12\alpha</i> -трикетo-5\beta-	0	0	0	<i>CH</i> ₃	96	241-242	<u>72.19</u> 72.29	<u>8.55</u> 8.65	<i>C</i> ₂₅ <i>H</i> ₃₆ <i>O</i> ₅

Анализ данных таблиц показывает, что все образцы были достаточно чистыми, что позволяет рассматривать их как эталонные препараты. Выделенные соединения открывают значительные возможности для их практического применения в роли эталонных ориентиров. Благодаря им становится возможным всестороннее изучение реакционной активности холановых кислот и их производных, а также отслеживание специфики их поведения в ходе разнообразных химических процессов. Применение данных веществ в качестве реперных стандартов обеспечивает ряд весомых преимуществ: гарантирует воспроизводимость экспериментальных результатов, повышает достоверность научных выводов в последующих исследованиях, формирует основу для широкого спектра прикладных направлений, среди которых: фармакология и аналитическая химия.

2.1. Синтез сложных эфиров 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β - и 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановых кислот

Диапазон применения продуктов органического синтеза в современной науке и промышленности чрезвычайно широк, однако особое значение приобретает фармацевтический сектор, развитие которого сосредоточено на стратегически важных направлениях. К числу ключевых задач относится создание инновационных лекарственных средств, предназначенных для терапии разнообразных патологических состояний. Наибольшее внимание уделяется следующим категориям заболеваний, представляющих серьезную социально-медицинскую проблему:

- воспалительные процессы различного происхождения;
- бактериальные инфекции;
- желчнокаменная болезнь и сопутствующие нарушения функционирования билиарной системы;
- расстройства липидного обмена;
- наследственные заболевания.

Одним из наиболее перспективных направлений остаётся целенаправленная модификация химической структуры стероидных соединений, сформированных на базе полициклических каркасов холановых кислот. В русле данной стратегии анализируется спектр фундаментальных реакций функционализации, включая переэтерификационные процессы, ацилирующие трансформации, окислительные сценарии и восстановительные пути дериватизации. Реализация обозначенных протоколов обеспечивает получение агентов с ярко очерченной антибактериальной, антиэкссудативной и холелитолитической направленностью, а также поликатионные амфифильные молекулы, которые обладают способностью взаимодействовать с клеточными мембранами и биологически активными макромолекулами. Эти соединения могут быть перспективными как для разработки новых лекарственных препаратов, так и как структурная платформа для конструирования функциональных молекул, применяемых в передовых биомедицинских технологиях, таких как генная терапия и таргетная доставка нуклеиновых кислот внутрь клеток-мишеней.

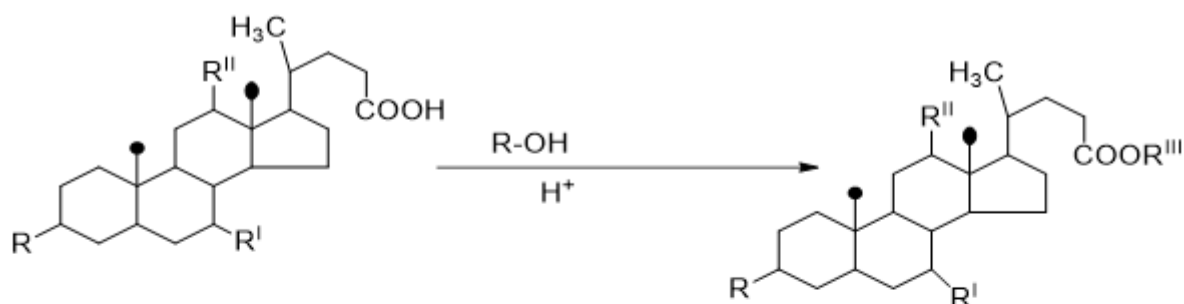
Одним из наиболее динамично развивающихся направлений современной медицины является генная терапия, принцип которой основан на целенаправленном введении генетического материала (ДНК, РНК или синтетических олигонуклеотидов) в клетки пациента для коррекции патологических состояний на молекулярном уровне [117-118]. Ключевым технологическим вызовом здесь остаётся эффективная и безопасная транспортировка этого материала внутрь клетки (процесс трансфекции). Среди существующих систем доставки, помимо вирусных векторов, активно разрабатываются невирусные носители, отличающиеся более высокой безопасностью и низкой иммуногенностью. Особый интерес среди них вызывают биоразлагаемые катионные липиды с минимальной цитотоксичностью, которые могут быть синтезированы путём направленной модификации природных липидных структур, в частности, различных производных холановых кислот [119].

Особую ценность для таких модификаций представляют конкретные структуры, такие как $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановая кислота и её

производное - 3α -ацетокси- 7α -гидрокси- 5β -холановая кислота. Первое соединение содержит реакционноспособные гидроксильные группы, находящиеся в аксиальной и экваториальной конформациях, что обуславливает их доступность для различных окислительных и конденсационных реакций. Вторая кислота характеризуется наличием ацетоксигруппы в положении 3 стероидного каркаса, что вносит изменения в её электронные и стерические параметры. Наличие этих функциональных групп открывает широкие возможности для направленного химического синтеза новых производных. Эти производные, в свою очередь, могут выступать в качестве прекурсоров для создания литолитических препаратов, поликатионных амфифильных векторов для доставки генов, а также других биологически активных соединений с заданными свойствами.

Проведение реакций этерификации для ряда холановых кислот было выполнено в соответствии с общепринятым методологическим подходом, описанным в литературе [120]. Суть метода заключалась в использовании концентрированной серной кислоты в роли катализатора, ускоряющей взаимодействие карбоксильной группы кислоты со спиртом. В качестве субстратов были взяты следующие гидроксикислоты: $3\alpha, 7\beta$ -дигидрокси- 5β -, $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β - и 3α -ацетокси- 7α -гидрокси- 5β -холановые кислоты. Согласно регламенту [121], экспериментальная матрица охватывала неразветвлённые и изо-алкильные гомологи ряда алканолов (метанол, этанол, пропанол-1, пропанол-2, бутанол-1), дополненную α -монохлорпропандиолом и тозилхлоридом (TsCl). Перечисленные реактивы прошли процедуры глубокой очистки и дегидратации в строгом соответствии с утверждёнными методиками.

В результате синтетических процедур была успешно получена серия сложных эфиров на основе $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β - и 3α -ацетокси- 7α -гидрокси- 5β -холановых кислот (соединения *XI* – *XXII*) (схема 2.2).



Где: R, R^I, R^{II}, R^{III} – соответственно:

XIII. R=R^I=OH, R^{II}=H, R^{III}=CH₃.

XIX. R=O, R^I=OH, R^{II}=H, R^{III}=C₂H₅.

XIV. R=R^I=OH, R^{II}=H, R^{III}=C₂H₅.

XX. R=O, R^I=OH, R^{II}=H, R^{III}=C₃H₇.

XV. R=R^I=OH, R^{II}=H, R^{III}=C₃H₇.

XXI. R=O, R^I=OH, R^{II}=H, R^{III}=i-C₃H₇.

XVI. R=R^I=OH, R^{II}=H, R^{III}=i-C₃H₇.

XXII. R=O, R^I=OH, R^{II}=H, R^{III}=C₄H₉,

XVII. R=R^I=OH, R^{II}=H, R^{III}=C₄H₉,

XXIII. R=O, R^I=OH, R^{II}=H, R^{III}=CH₂-CHOH-CH₂OH.

XVIII. R=OH, R^I=O, R^{II}=H, R^{III}=CH₃.

Схема 2.1 – Синтез сложных эфиров (XIII-XXIII)

Ключевой целью данного этапа было введение защитной группы на карбоксильную функцию, что превращало полученные эфиры в ключевые интермедиаты для всех последующих этапов модификации молекулы. Сам процесс синтеза заключался в прямом взаимодействии соответствующего спирта с холановой кислотой в условиях кислотного катализа концентрированной серной кислотой, что подробно задокументировано в ряде источников [122-162].

Синтезированные эфиры открыли возможность для детального исследования реакционной способности различных положений холанового остова, изучения селективности модификации его гидроксильных групп и, в конечном счёте, конструирования новых производных соединений с заранее спроектированной и потенциально ценной биологической активностью. Полученные результаты имеют большое значение для фармакологической химии и разработки новых лекарственных средств, включая антибактериальные, литолитические и гепатопротективные препараты, а также вещества, способные использоваться в качестве носителей для генетического материала при генной терапии.

Таким образом, проведенные исследования демонстрируют широкий потенциал холановых кислот как платформы для синтеза функционально разнообразных соединений, которые могут быть использованы в органической химии, фармакологии и биотехнологии, а также подчеркивают необходимость дальнейшего изучения их реакционной способности и биологической активности.

Совокупность экспериментально определённых характеристик сложноэфирных форм холановых кислот, маркированных как соединения XIII–XXIII, отражена в таблице 2.3, содержимое которой коррелирует с высокой продуктивностью реализованной синтетической схемы. Интервал количественных показателей, зафиксированный в таблице 3, демонстрирует, что объёмы выделенных этерификатов - дериватов 5 β -холанового ряда, несущих гидроксильные функции при 3 α - и 7 α -атомах углерода либо ацетокси-заместитель в положении 3 α на фоне свободной 7 α -гидроксильной группы, - варьируются в пределах 84–96%, что удовлетворяет критериям оптимальной производительности, предъявляемым к получению полициклических стероидных конъюгатов.

Таблица 2.3 - Характеристика сложных эфиров $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β - и 3α -ацетокси- 7α -гидрокси- 5β -холановых кислот

№ п/п	Сложные эфиры	Выход (%)	T _{пл.} , °C	C (%) <u>найденно</u> вычислено	H (%) <u>найденно</u> вычислено	Брутто-фор- мула
1	2	3	4	5	6	7
XIII	Метилловый эфир $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты	87	75 – 76	<u>73.85</u> 73.89	<u>10.39</u> 10.34	$C_{25}H_{42}O_4$
XIV	Этиловый эфир $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты	85	79 – 80	<u>74.11</u> 74.24	<u>10.44</u> 10.54	$C_{26}H_{44}O_4$
XV	Пропиловый эфир $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты	84	42 – 43	<u>74.51</u> 74.60	<u>10.59</u> 10.66	$C_{27}H_{46}O_4$
XVI	Изопропиловый эфир $3\alpha, 7\alpha$ - дигидрокси- 5β -холановой кислоты	86	69 – 70	<u>74.64</u> 74.60	<u>10.71</u> 10.66	$C_{27}H_{46}O_4$
XVII	Бутиловый эфир $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты	87	39 – 40	<u>74.88</u> 74.95	<u>10.68</u> 10.78	$C_{28}H_{48}O_4$

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5	6	7
XVIII	Метилловый эфир 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты	96	239 – 240	<u>72.19</u> 72.11	<u>8.55</u> 8.65	$C_{25}H_{36}O_5$
XIX	Этиловый эфир 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты	86	231 – 232	<u>74.28</u> 74.36	<u>12.30</u> 12.39	$C_{26}H_{52}O_5$
XX	Пропиловый эфир 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты	85	220 – 221	<u>74.64</u> 74.72	<u>12.49</u> 12.45	$C_{27}H_{54}O_5$
XXI	Изопропиловый эфир 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты	87	212 – 213	<u>74.61</u> 74.72	<u>12.50</u> 12.45	$C_{27}H_{54}O_5$
XXII	Бутиловый эфир 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты	87	255 – 256	<u>75.10</u> 75.07	<u>12.63</u> 12.51	$C_{28}H_{56}O_5$
XXIII	Пропан-1,2-диолевый эфир 3 α , 7 β – дигидроксихолановой кислоты	89	210 – 211	<u>69.31</u> 69.37	<u>10.09</u> 10.06	$C_{28}H_{56}O_5$

Для подтверждения структуры полученных соединений был проведён комплексный спектральный анализ. ИК-спектры показали, что в веществах появились сильные пики в области $1280\text{--}1155\text{ см}^{-1}$. Такие пики дают С-О-связи, а они характерны как раз для сложноэфирных групп. Соответственно, реакция прошла успешно: гидроксикислоты превратились в нужные нам сложные эфиры холановых кислот.

Дополнительным доказательством корректности структуры полученных соединений (XIII–XXIII) послужили данные, полученные методом ядерно-магнитно-резонансной (ЯМР) спектроскопии. Контроль индивидуальности и степени чистоты всех целевых продуктов осуществлялся посредством газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Этот анализ подтвердил однородность синтезированных образцов и отсутствие в них заметных количеств побочных веществ, что свидетельствует о высокой селективности применённых химических превращений.

На рисунке 2.1 представлен спектр протонного магнитного резонанса (ПМР) пропан-1,2-диолового эфира $3\alpha,7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты (соединение XXIII). Детальная интерпретация спектра позволила выявить следующие характерные сигналы, полностью соответствующие предполагаемой молекулярной архитектуре:

- Синглетные сигналы в областях 0.67–0.70 м.д. и 0.95–1.00 м.д., интегральная интенсивность которых соответствует трём и шести протонам соответственно, были отнесены к метильным группам, расположенным у атомов углерода C-21, C-18 и C-19 стероидного остова.
- Мультиплетные сигналы в широкой области химических сдвигов 1.0–2.0 м.д. соответствуют протонам метиленовых групп, входящих в состав циклической системы стероида.
- Атомы водорода у углеродов C-20–C-23 дают на спектре общую группу пиков в районе 2.15–2.50 м.д.
- Пики от ОН-групп видны на отметках 3.7 и 4.0 м.д. Значит, при реакции эти группы не затронули, всё осталось на своих местах.

- Сигналы метиленовых протонов боковой цепи, которые относятся к атомам С-25–С-27, видны в области 3.5–3.7 м.д. Это прямо подтверждает, что остаток пропан-1,2-диола успешно встроился в молекулу.
- Наблюдение синглета при 7.3 м.д., характерного для протона у атома С-23, является отличительным признаком, подтверждающим специфическое строение боковой цепи в данном стероидном производном. Совокупность всех этих спектральных данных однозначно верифицирует целевую структуру синтезированного соединения.

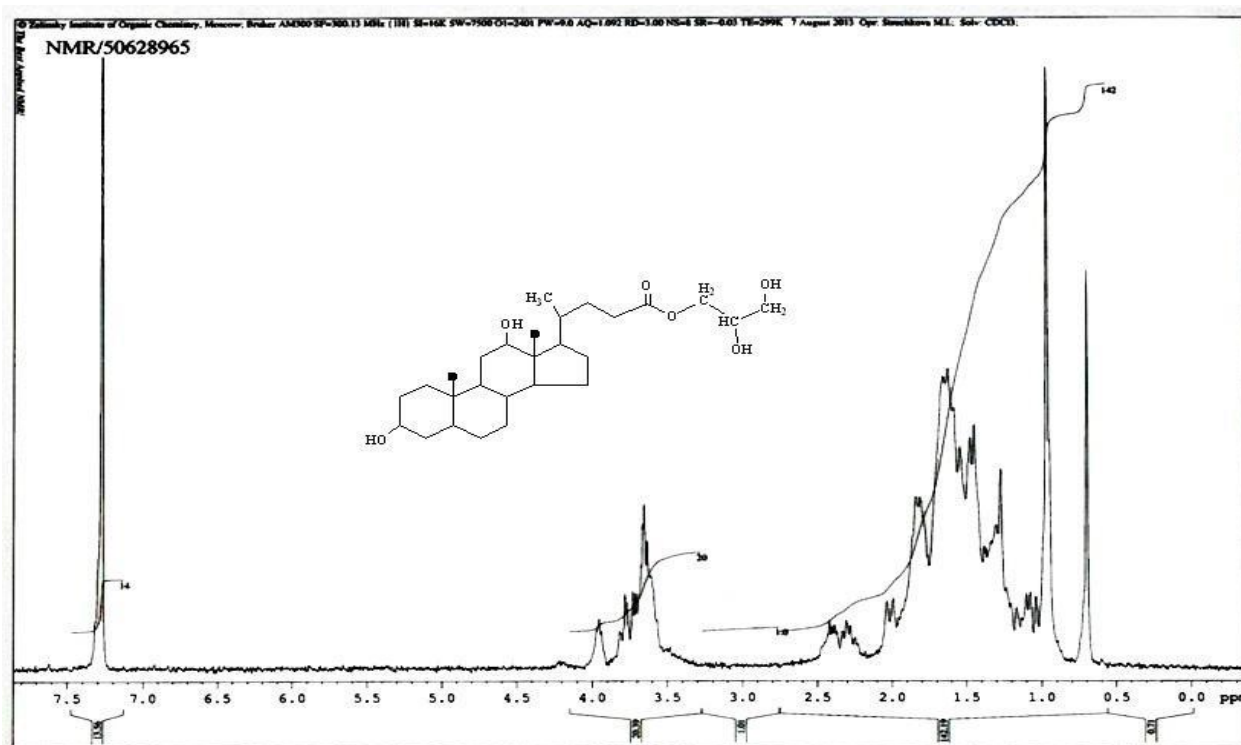


Рисунок 2.1 – Спектр ПМР соединения XXIII (пропан-1,2-диолового эфира 3 α , 7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты)

Данные спектроскопические характеристики подтверждают структурную целостность и правильность химического строения синтезированных сложных эфиров. Такой комплексный подход, включающий ИК- и ПМР-спектроскопию, а также газожидкостную хроматографию, позволяет с высокой достоверностью утверждать, что все полученные вещества обладают строго определённой пространственной конфигурацией и прогнозируемым набором функциональных групп. Это ключевое обстоятельство делает данные

соединения пригодными для углублённого изучения в рамках скрининга их биологической активности. В частности, они представляют значительный интерес для оценки целого ряда фармакологических эффектов, включая способность растворять холестериновые конкременты (холелитолитическое действие), снижать уровень холестерина в крови (гипохолестеринемическая активность) и подавлять рост патогенных микроорганизмов (противомикробные свойства).

Совокупность полученных физико-химических и спектральных данных однозначно свидетельствует, что синтезированные сложные эфиры холановых кислот (XIII–XXIII) представляют собой индивидуальные, высокоочищенные соединения с полностью установленной структурой. Достигнутая степень чистоты и надежность идентификации позволяют рассматривать данные вещества в качестве эталонных образцов для проведения последующих фундаментальных и прикладных изысканий как в области органической химии, так и в фармакологии. Полученные данные формируют прочную экспериментальную и методическую базу для целенаправленного дизайна и создания новых поколений фармакологически активных веществ, разрабатываемых на основе модифицированных холановых кислот.

Метод встречного синтеза использовался нами для получения заведомо идентичного соединения по независимой схеме с последующим сравнением их физико-химических характеристик. Полное совпадение данных хроматографического поведения, ИК- и ЯМР-спектров синтезированного образца и референтного соединения, полученного альтернативным путём, однозначно подтвердило заявленную структуру целевых эфиров. Данный метод является эффективным инструментом в органической химии для верификации структуры соединений. Суть метода заключается в том, что исходное соединение подвергается обратимому преобразованию к известному аналогу, строение которого уже надёжно установлено, что позволяет косвенно подтвердить правильность строения синтезированного продукта.

В литературе описан пропиловый эфир $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты, полученный путём пропилирования 3α -ацетокси- 7α -гидрокси- 5β -холановой кислоты. Строение этого соединения подтверждено с помощью спектроскопических методов, включая ИК- и ЯМР-спектроскопию, а также хроматографический анализ [163]. Наличие чётких сигналов, характерных для метильных и метиленовых протонов в боковой цепи, а также сохранение гидроксильных групп в циклической части молекулы, делает данное соединение надёжным эталоном для сопоставления.

Использование встречного синтеза позволило с высокой степенью достоверности подтвердить конфигурацию гидроксильных групп, положение ацетокси-группы и правильность этерификации боковой цепи в наших соединениях. При сравнении спектроскопических данных синтезированного пропанового эфира с литературными данными для пропилового эфира наблюдалось полное совпадение характерных сигналов в ЯМР-спектре и интенсивных полос в ИК-спектре, что подтверждает правильность выбранной стратегии синтеза и точность выделения функциональных групп.

Таким образом, встречный синтез не только подтвердил структуру наших сложных эфиров, но и обеспечил дополнительную верификацию чистоты и идентичности соединений, что особенно важно для дальнейшего использования этих эфиров как эталонных образцов в химических и фармакологических исследованиях. Представленный методологический подход создаёт надёжную и верифицируемую основу для целенаправленного дизайна и синтеза новых производных холановых кислот с заранее моделируемыми фармакологическими эффектами.

С целью подтверждения идентичности целевых продуктов и выяснения особенностей их превращений прибегли к альтернативному синтетическому маршруту. Ключевая стадия - окислительная модификация сложноэфирной формы $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты, этерифицированной пропанолом. Образовавшееся вещество, а именно пропиловый эфир 7α -гидрокси- 3α -ацетокси- 5β -холановой кислоты (соединение XV), по совокупности

аналитических параметров не отличалось от эталонного препарата. Данная стратегия позволила не только продемонстрировать возможность избирательного введения ацетокси-группы строго в положение 3α стероидного остова при полном сохранении гидроксильной функции в положении 7α , но и независимым синтетическим путём окончательно подтвердить корректность строения целевого соединения (схема 2.2).

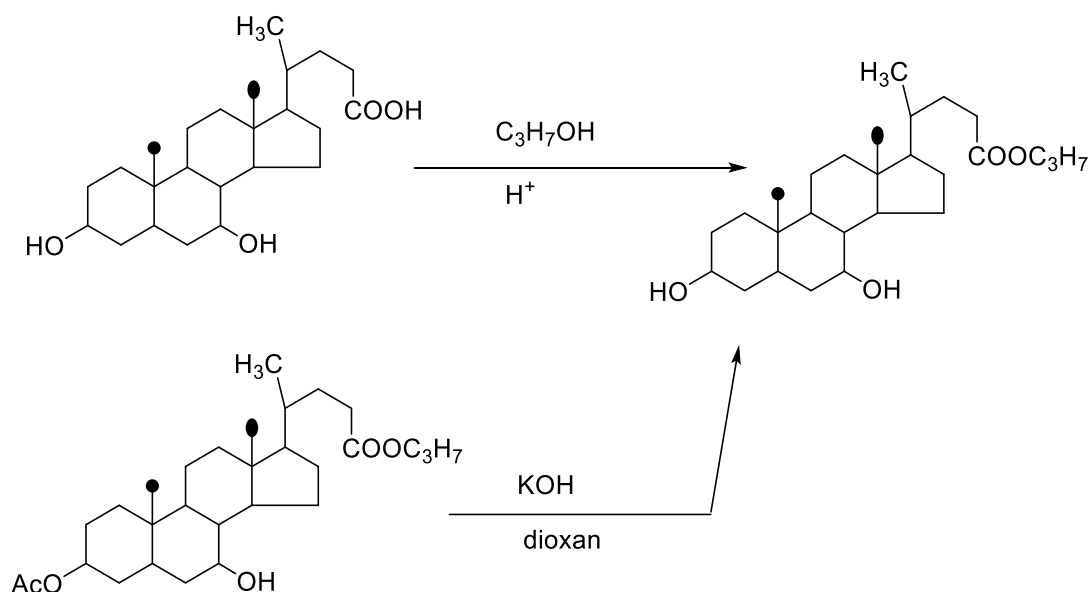


Схема 2.2 - Процесс окисления пропилового эфира 3α , 7α -дигидрокси- 5β -холановой кислоты

Для проверки идентичности продуктов, полученных двумя различными методами синтеза, были проведены сравнения их температур плавления и спектральных характеристик. Результаты показали полное совпадение температур плавления и спектральных данных, что указывает на абсолютную идентичность полученных изопропиловых эфиров 3α -ацетокси- 7α -гидрокси- 5β -холановой кислоты (XV), независимо от метода синтеза. Это подтверждает высокую воспроизводимость синтетических процедур и точность контролируемого введения функциональных групп.

Для всей серии синтезированных сложных эфиров холановых кислот (XIII-XXIII) были дополнительно проведены исследования методом инфракрасной спектроскопии. Данные исследования позволили идентифицировать

и охарактеризовать ключевые полосы поглощения, соответствующие специфическим функциональным группам в молекулах. В частности, в ИК-спектрах всех полученных соединений регистрировались выраженные пики в диапазоне $1290\text{--}1255\text{ см}^{-1}$. Наличие этих интенсивных сигналов, характерных для валентных колебаний связей С-О-С, служит прямым спектроскопическим свидетельством успешного протекания реакции этерификации и подтверждает присутствие целевой сложноэфирной функциональности в каждом из исследуемых образцов.

Такие данные имеют важное значение для дальнейших исследований, так как позволяют уверенно использовать эти соединения в аналитических и фармакологических целях, включая разработку эталонных образцов и изучение их биологической активности, в том числе литолитической и антибактериальной. Кроме того, подтверждение идентичности соединений, полученных различными методами, усиливает достоверность синтетических схем и обеспечивает надежную основу для модификации структуры холановых кислот в последующих экспериментах.

ИК-спектроскопические исследования синтезированных сложных эфиров холановых кислот (XIII–XXII) позволили выявить характерные функциональные группы и подтвердить строение целевых соединений. В спектрах производных XIII–XVII наблюдаются сигналы поглощения в интервале $3160\text{--}3440\text{ см}^{-1}$, что указывает на присутствие в их структуре гидроксильных групп ($-\text{OH}$). Данные полосы соответствуют валентным колебаниям связей $\text{O} - \text{H}$, типичным для гидроксильных функций в молекулах стероидных холановых кислот.

Одновременно, для соединений XI–XXI в ИК-спектрах были зафиксированы интенсивные полосы поглощения в области $1695\text{--}1715\text{ см}^{-1}$. Эти сигналы характерны для карбонильных групп ($> \text{C} = \text{O}$) и являются ключевым доказательством успешного введения ацетокси-заместителя в положение С-3 стероидного ядра в ходе синтеза 3α -ацетокси- 7α -гидрокси- 5β -холановых кислот. Это является важным подтверждением успешного введения ацетокси-группы

при синтезе 3α -ацетокси- 7α -гидрокси- 5β -холановых кислот. Таким образом, спектральные данные подтверждают правильность направленного синтеза, сохранение целевых функциональных групп и корректное построение молекулы холановой кислоты. Для анализа чистоты синтезированных соединений были проведены газожидкостная хроматография и хроматографический анализ смесей сложных эфиров (XI–XXII). На рисунках 2.2 и 2.3 приведены примерные хроматограммы, демонстрирующие отдельные пики для каждого компонента смеси, что подтверждает высокую степень чистоты синтезированных соединений. Отсутствие дополнительных примесей на хроматограммах указывает на эффективность используемых методов очистки и адекватность синтетических процедур.

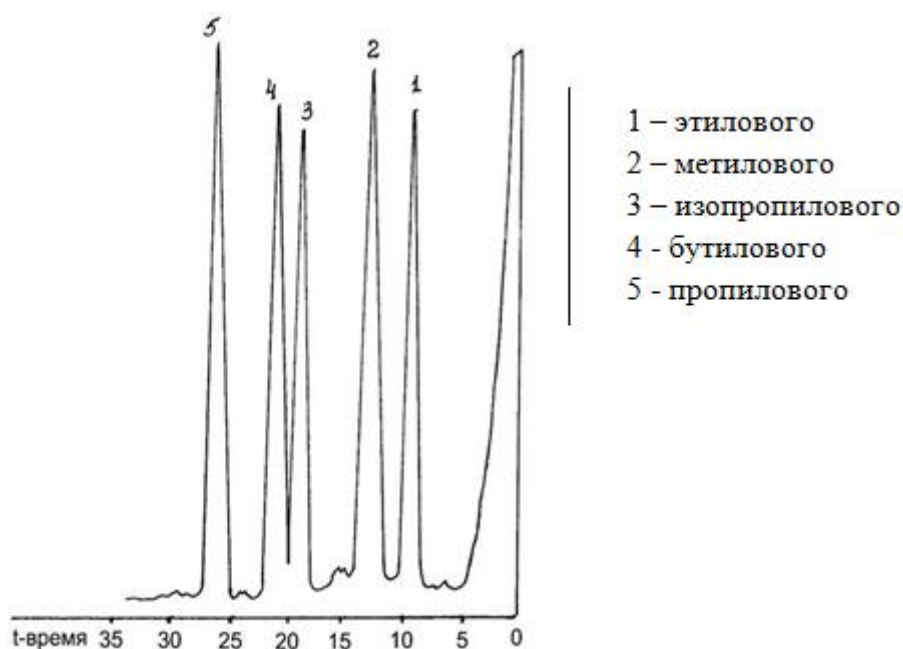


Рисунок 2.2 – Типичная хроматограмма для смеси этерифицированных форм $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты

Таким образом, структура полученных сложных эфиров подтверждена тремя независимыми методами: ИК-спектроскопией, газожидкостной хроматографией и сравнением физико-химических свойств. Совпадение всех экспериментальных данных доказывает, что синтезированные соединения полностью соответствуют структурами $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты и

3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты. Эти данные служат надёжной основой для дальнейшего применения полученных соединений в функциональных модификациях, фармакологических исследованиях и разработке эталонных препаратов, что особенно важно для создания новых литолитических, гипохолестеринемических и антимикробных средств на основе стероидной структуры.

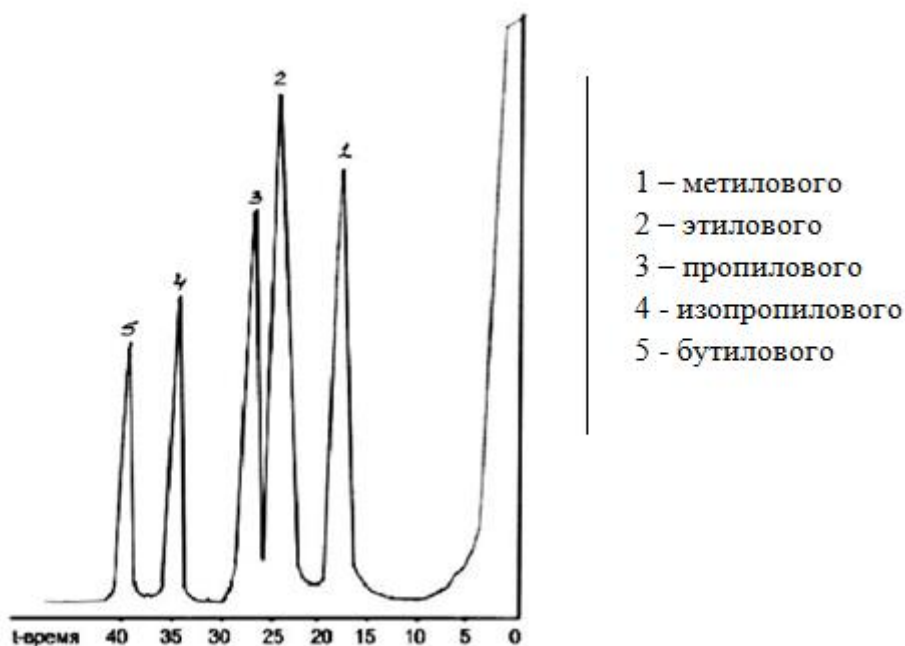


Рисунок 2.3 – Типичная хроматограмма для смеси этерифицированных форм 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты

Дополнительно стоит отметить, что ИК-спектроскопический анализ позволяет отслеживать даже малые изменения в структуре стероидного кольца и функциональных групп, что делает его незаменимым инструментом при контроле качества синтезированных сложных эфиров. Полученные спектральные данные являются критически важным критерием, определяющим пригодность синтезированных соединений для последующих этапов работы - проведения биохимических исследований и фармакологического скрининга их биологической активности.

Для анализа синтезированных сложных эфиров 3 α , 7 α -дигидрокси-5 β - и 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановых кислот была проведена

тонкослойная хроматография (ТСХ) в системе хлороформ: метанол (9:1). В качестве проявителя использовались пары йода, что позволило наглядно определить подвижность отдельных соединений и выявить наличие примесей. Результаты ТСХ показали хорошо разделённые полосы, что свидетельствует о высокой чистоте синтезированных эфиров и подтверждает их индивидуальность.

Для более детального контроля структуры и чистоты соединений использовался метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ), выполненный на хроматографе марки «Хром-5». В качестве разделительной системы применялась колонка длиной 1,26 метра и внутренним диаметром 0,3 сантиметра, заполненная носителем Chromaton N-AW с иммобилизованной стационарной фазой, представленной 3% полиметилсилоксана SE-30. Данная методика позволила с высокой точностью установить качественный и количественный состав серий синтезированных сложных эфиров - метиловых, этиловых, пропиловых, изопропиловых и бутиловых производных холановых кислот. Хроматографический анализ обеспечил четкое разделение и идентификацию индивидуальных компонентов в каждой пробе, а также определение их точного процентного соотношения. Полученные хроматограммы однозначно подтвердили высокую степень чистоты целевых продуктов и их полное соответствие ожидаемым химическим структурам.

Дополнительно для подтверждения функциональной группы и строения эфиров использовалась ИК-спектроскопия. Спектральные характеристики всех исследованных эфирных производных демонстрировали ожидаемые сигналы: диапазон $1281-1286\text{ см}^{-1}$ соответствует валентным колебаниям C–O–C связи сложноэфирной группы. Широкая область $3145-3420\text{ см}^{-1}$ указывает на наличие свободных гидроксильных групп (O–H). Полученные спектральные данные служат доказательством успешного проведения реакции этерификации и сохранения при этом свободных гидроксильных функций в молекулах. Это обстоятельство имеет принципиальное значение для планирования

последующих стадий синтеза, направленных на получение целевых производных с прогнозируемой биологической активностью.

Рисунок 2.4 наглядно демонстрирует ИК-спектр этилового эфира 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты. На нём отчётливо регистрируются все указанные характерные полосы поглощения, что окончательно подтверждает структурную идентичность синтезированного соединения. Кроме того, наблюдалась высокая интенсивность полос, что свидетельствует о правильной ориентации и доступности функциональных групп для возможных химических модификаций.

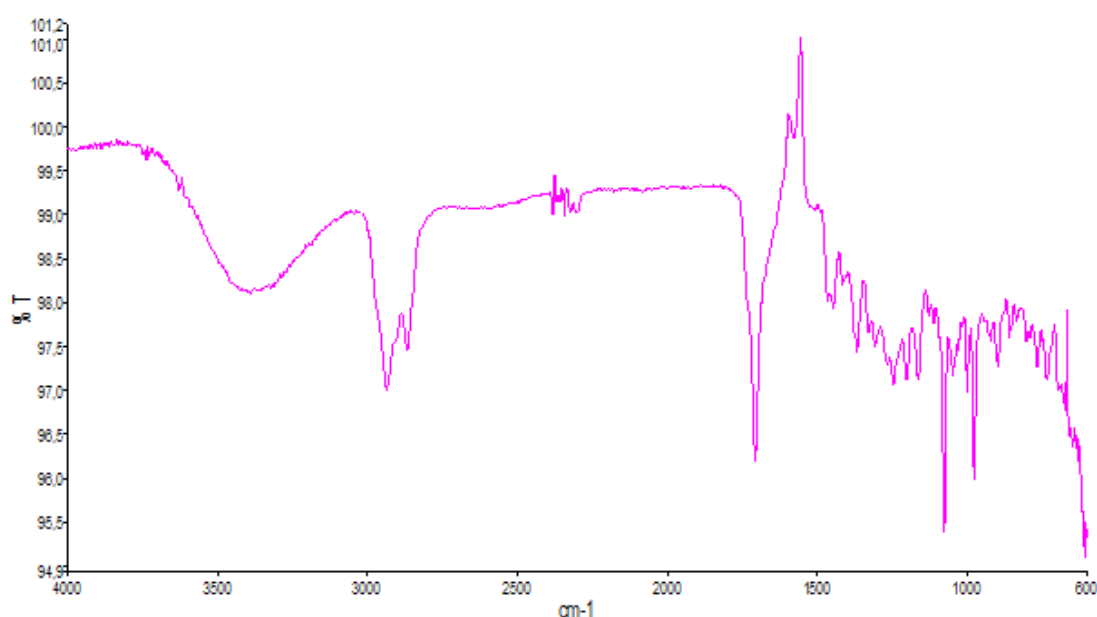


Рисунок 2.4 – ИК-спектр этилового эфира 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (соединения XII)

В таблице 2.4 представлены результаты интерпретации ИК-спектров, относящихся к сложным эфирам производных 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты и 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты. В ходе анализа идентифицированы и систематизированы характеристические полосы поглощения, соответствующие колебаниям ключевых функциональных групп в соединениях XIII–XXII.

Таблица 2.4 – Интерпретация ИК-спектров соединений XIII–XXII - эфиров 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты и 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты

Частоты $\nu, \text{см}^{-1}$	Соединения									
	XIII	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XXII
<i>COOR</i>	1274	1235	1291	1285	1280	1250	1255	1170	1249	1285
	1283	1283	1286	1290	1288	1275	1270	1300	1247	1290
<i>OH</i>	3175	3135	3145	3150	3170	3165	3163	3153	3155	3160
	3430	3380	3410	3428	3450	3440	3450	3430	3435	3445
<i>C = O</i>	—	—	—	—	—	1680	1685	1680	1683	1675
						1705	1690	1685	1690	1696

Таким образом, проведённые исследования ТСХ, газожидкостной хроматографии и ИК-спектроскопии не только подтверждают строение синтезированных сложных эфиров, но и демонстрируют их высокую чистоту и стабильность. Эти результаты открывают возможность дальнейшего использования данных соединений в синтезе производных холановых кислот с целевыми биологическими свойствами, включая литолитические, гипохолестеринемические, гепатопротективные и антимикробные препараты.

Кроме того, изучение реакционной способности молекулы с различными функциональными группами позволяет прогнозировать её поведение при других типах химических модификаций, что важно для разработки новых поликатионных амфифилов и других фармакологически активных соединений на основе стероидного скелета. Проведённый комплексный анализ подтверждает эффективность выбранной методики синтеза и целесообразность использования данных эфиров в качестве исходных материалов для последующих исследований и практического применения в медицине и фармацевтике.

2.2. Превращения сложных эфиров 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты в условиях ацилирования

Исследование химического поведения и реакционной способности сложных эфиров 3 α , 7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (соединения XIII–XVII) формирует важнейшее направление в целенаправленном конструировании новых производных холановых кислот, перспективных для создания биологически активных веществ. Потенциальные области их применения включают разработку литолитических, гепатопротекторных и антимикробных лекарственных средств. В настоящее время количество научных публикаций, фокусирующихся на целенаправленном синтезе и структурной модификации производных холановых кислот по их гидроксильным и карбоксильным функциональностям, остаётся весьма ограниченным [128–132].

В продолжение синтеза, направленного на получение ключевых интермедиатов для последующих преобразований, нами были инициированы

реакции ацилирования указанных сложных эфиров. Данные реакции задействуют свободные гидроксильные группы, расположенные у атомов углерода C-3 и C-7 стероидного остова. Особую научную и практическую ценность представляет детальное изучение подобных превращений, поскольку их результаты позволяют всесторонне оценить реакционную способность данных эфирных производных и особенности их поведения в условиях ацилирования [124–133].

Реакция ацилирования метилового эфира $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты уксусным ангидридом действительно хорошо описана в научной литературе. Однако, информация о взаимодействии других сложных эфиров данного соединения (например, этилового, пропилового) с различными ацилирующими реагентами - такими как уксусный ангидрид, ацетилхлорид или ангидриды ароматических кислот - представлена в значительно меньшем объёме и остаётся недостаточно изученной [132].

Применение методики ацилирования на данном этапе синтеза решает ключевую задачу введения защитных групп на гидроксильные функции в положениях C-3 и C-7. Эта стратегическая операция создаёт основу для последующего целенаправленного и селективного синтеза большого числа производных холановых кислот. К ним относятся не только разнообразные сложные эфиры и ацилированные производные, но и потенциально биоактивные стероидные структуры с заданными свойствами.

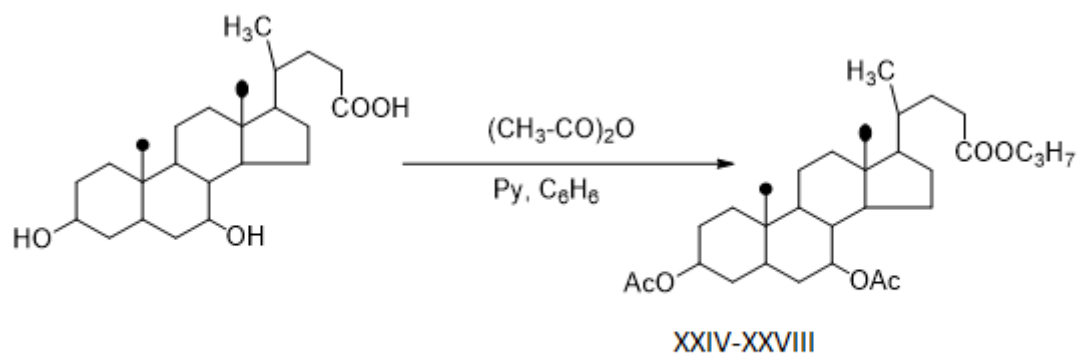
Значимость углублённого изучения реакции ацилирования также обусловлена тем, что защищённые или модифицированные таким образом гидроксильные группы в положениях C-3 и C-7 впоследствии могут быть вовлечены в дальнейшие ключевые превращения. Среди них - окисление до кетогрупп, восстановление, а также синтез глицидных и гидразидных производных. Эта цепочка преобразований открывает широкие возможности для получения новых соединений с заранее заданными физико-химическими характеристиками и биологическим профилем.

Продукты, синтезированные путём ацилирования, служат ценными промежуточными соединениями (интермедиатами) в конструировании более сложных молекул. Они могут быть использованы для разработки новых поколений холелитолитических и гепатопротекторных лекарственных препаратов.

С целью определения оптимальных параметров проведения реакции ацилирования для серии сложных эфиров, нами было детально исследовано их взаимодействие с уксусным ангидридом. Реакции проводились при эквимольном соотношении реагентов в присутствии различных кислых катализаторов. Процесс изучался в двух температурных режимах: при постоянной комнатной температуре и в узком контролируемом диапазоне 24–26°C. В ходе экспериментов контролировалось время реакции, влияние растворителя и кислотного катализатора, что позволило определить условия, обеспечивающие высокий выход ацильных производных при минимальном разрушении исходного стероида.

Систематический анализ закономерностей ацилирования сложноэфирных форм 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты существенно расширяет существующие представления о трансформационном потенциале данного класса стероидов. Сформированный массив экспериментальных данных служит надёжной фундаментальной платформой для дальнейшего управляемого конструирования полифункциональных стероидных систем с заранее моделируемыми фармакологическими эффектами.

В качестве модельной реакции выступило ацетилирование пяти представителей ряда алкилзамещённых эфиров 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты: метилового (XXIV), этилового (XXV), пропилового (XXVI), изопропилового (XXVII) и бутилового (XXVIII). Целенаправленное введение ацетильных защитных групп по положениям 3 α и 7 α привело к образованию соответствующих диацетилированных производных (схема 2.3) [133].



XXIV. R=CH₃; XXV. R=C₂H₅; XXVI. R=C₃H₇; XXVII. R=C₃H₇; XXVIII. R=C₄H₉.

Схема 2.3 - Получение 3α,7α-диацетоксипроизводных алкиловых эфиров 5β-холановой кислоты

Процесс ацилирования проводился в специально разработанных условиях, включающих использование уксусного ангидрида в эквимольном соотношении с исходным эфиром и при контролируемой температуре 24–26°C. Идентификация полученных соединений осуществлялась сравнением их физико-химических свойств, спектральных характеристик и элементного состава с литературными данными. Дополнительным подтверждением структуры служил анализ химического поведения полученных соединений в модельных реакциях, таких как щелочной гидролиз и повторное ацилирование.

Проведенный анализ результатов продемонстрировал, что эффективность процесса ацилирования находится в прямой зависимости от строения алкильного заместителя в исходном сложном эфире холановой кислоты. Максимальные выходы целевых продуктов были зафиксированы для изопропилового и бутилового эфиров (соединения XXVII и XXVIII). Такая закономерность может быть объяснена повышенной реакционной способностью данных субстратов, а также уменьшенными стерическими препятствиями, которые создаёт объёмный алкильный радикал в карбоксильной части молекулы, что облегчает доступ ацилирующего агента к гидроксильным группам у атомов C-3 и C-7 стероидного ядра. В ходе экспериментов было установлено, что реакция в каждом случае протекала селективно, с вступлением двух ацильных групп в

молекулу стероида, что привело к формированию $3\alpha, 7\alpha$ -диацетокси- 5β -холановой кислоты.

Физико-химические характеристики полученных соединений представлены в таблице 2.5. Данные таблицы 2.5 показывают, что выход ацилпроизводных варьируется от 82 до 92%, при этом наибольший выход наблюдается у бутилового эфира, что обусловлено как меньшей полярностью растворителя, так и более благоприятной конформацией молекулы для присоединения ацильной группы. Температуры плавления полученных соединений соответствуют ожидаемым значениям для диацетокси-производных и подтверждают чистоту и идентичность продуктов реакции.

Строение синтезированных диацетилованных соединений (XXIV–XXVIII) было однозначно подтверждено с помощью комплекса аналитических методов, включая инфракрасную спектроскопию и элементный анализ. Запись ИК-спектров синтезированных продуктов фиксирует выраженный пик в интервале $1285\text{--}1155\text{ см}^{-1}$, специфический маркер растяжения C–O, присущего сложноэфирной группировке. Параллельно зарегистрирована полоса $1340\text{--}1350\text{ см}^{-1}$, доказывающая присутствие ацетильного фрагмента (колебания связи C–O), что отражено на рисунке 5. Ключевым результатом явилось исчезновение широкополосного сигнала, типичного для валентных колебаний гидроксильной группы ($O - H$), что прямо указывает на полное замещение гидроксильных групп в положениях C-3 и C-7 ацетильными остатками.

Данные результаты демонстрируют, что предложенные условия ацилирования являются оптимальными для синтеза диацетокси-эффетов сложных эфиров холановых кислот.

Таблица 2.5 - Сравнительные данные по ацилпроизводным эфиров $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты

№ п/п	Соединения	Выход (%)	$T_{пл.}, ^\circ C$	С (%) <u>найденно</u> <u>вычислено</u>	Н (%) <u>найденно</u> <u>вычислено</u>	Брутто- формула
XXIV	Метилловый эфир $3\alpha, 7\alpha$ -диацетокси- 5β -холановой кислоты	82	60-61	<u>72.36</u> 72.33	<u>9.88</u> 9.84	$C_{28}H_{45}O_6$
XXV	Этиловый эфир $3\alpha, 7\alpha$ -диацетокси- 5β -холановой кислоты	86	64-65	<u>72.60</u> 72.69	<u>9,24</u> 10.04	$C_{29}H_{47}O_6$
XXVI	Пропиловый эфир $3\alpha, 7\alpha$ -диацетокси- 5β -холановой кислоты	88	50-51	<u>73.12</u> 73.08	<u>10.06</u> 10.12	$C_{30}H_{49}O_6$
XXVII	Изопропиловый эфир $3\alpha, 7\alpha$ -диацетокси- 5β -холановой кислоты	85	55-56	<u>73.15</u> 73.07	<u>10.08</u> 10.16	$C_{30}H_{49}O_6$
XXVIII	Бутиловый эфир $3\alpha, 7\alpha$ -диацетокси- 5β -холановой кислоты	92	30-40	<u>73.34</u> 73.44	<u>10.19</u> 10.28	$C_{31}H_{51}O_6$

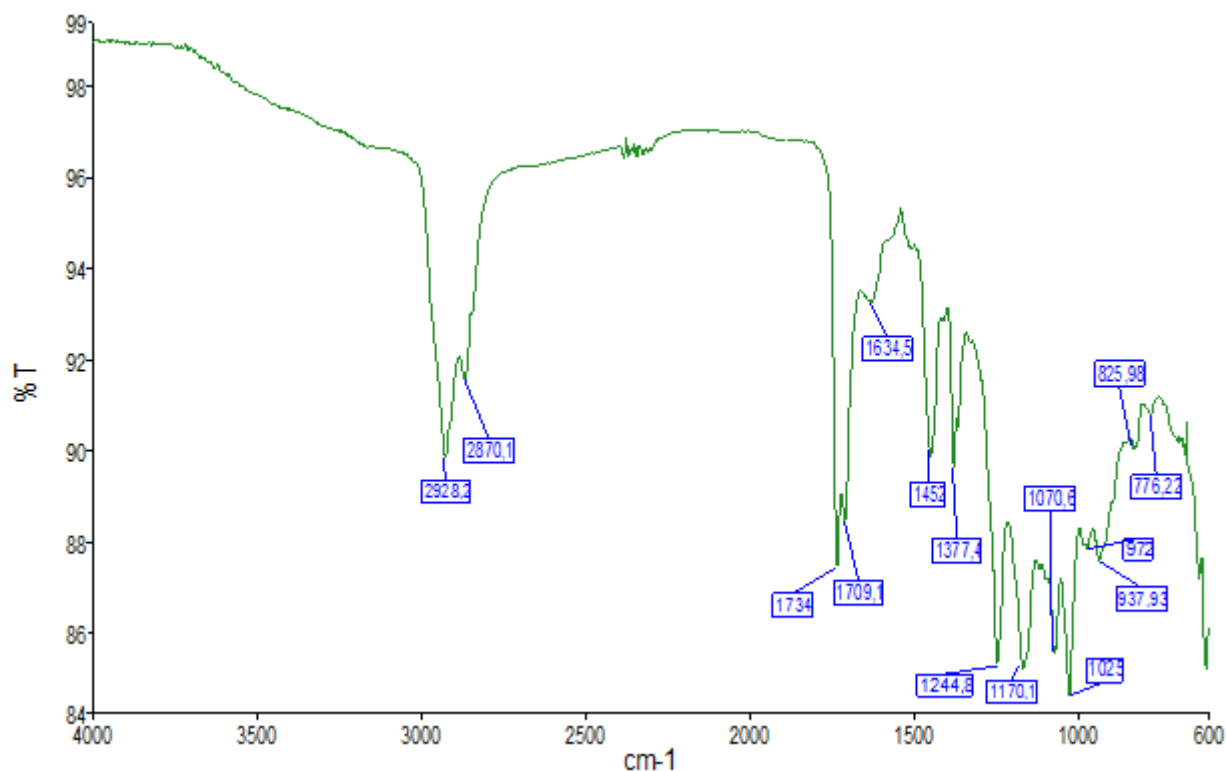


Рисунок 2.5 - Спектр ИК-излучения соединения (XXIV) - метилового эфира $3\alpha, 7\alpha$ -диацетокси- 5β -холановой кислоты

Использование этих условий позволяет получать высокочистые продукты с предсказуемой структурой. Эта характеристика является критически важной для их последующего использования в качестве ключевых интермедиатов при синтезе широкого спектра биологически активных веществ, включая литолитические и гепатопротекторные средства, антимикробные соединения, а также поликатионные амфифильные структуры. Помимо непосредственного практического выхода, достигнутые результаты вносят существенный вклад в фундаментальные знания, расширяя понимание реакционной способности и селективности эфиров $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты в реакциях электрофильного замещения. Полученные данные формируют надёжную методологическую и экспериментальную базу для планирования последующих исследований, направленных как на дальнейшую тонкую модификацию химического строения данного класса стероидов, так и на комплексное изучение их фармакологического потенциала.

В дальнейшем для подтверждения строения исходной $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты (II) и проверки чистоты выбранного исходного стероида была проведена серия экспериментов по встречному синтезу. Целью этих исследований являлось убедиться в правильности структуры молекулы и исключить возможное присутствие примесей, способных повлиять на последующие превращения и синтез производных.

Для этого была использована реакция гидролиза метилового эфира $3\alpha, 7\alpha$ -диацетокси- 5β -холановой кислоты. Гидролиз осуществляли раствором 30% едкого калия (KOH) в водно-спиртовой среде, что позволяло эффективно разрушить ацильные группы при сохранении целостности холанового скелета. Процесс гидролиза проводился при контролируемой температуре, с тщательным перемешиванием реакционной смеси в течение нескольких часов, чтобы обеспечить полное отщепление ацильных групп и восстановление свободных гидроксильных функций в положениях C-3 и C-7.

После завершения гидролиза реакционную смесь нейтрализовали раствором кислоты и выделили продукт реакции методом экстракции и последующей очистки хроматографией на силикагеле. Полученный продукт сравнивали с исходной $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислотой по ряду аналитических параметров: температуре плавления, растворимости, а также спектральным характеристикам методами ИК- и ПМР-спектроскопии.

Результаты показали, что гидролиз полностью восстановил гидроксильные группы на молекуле холановой кислоты (схема 2.4), а характеристики полученного соединения полностью совпадали с данными для эталонной $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты. Этот результат подтверждает чистоту исходного стероида и правильность выбранной методики синтеза.

Данный подход к встречному синтезу и гидролизу является важным этапом в исследовании сложных эфиров холановых кислот, так как позволяет достоверно установить строение исходных соединений и обеспечить воспроизводимость дальнейших химических превращений.

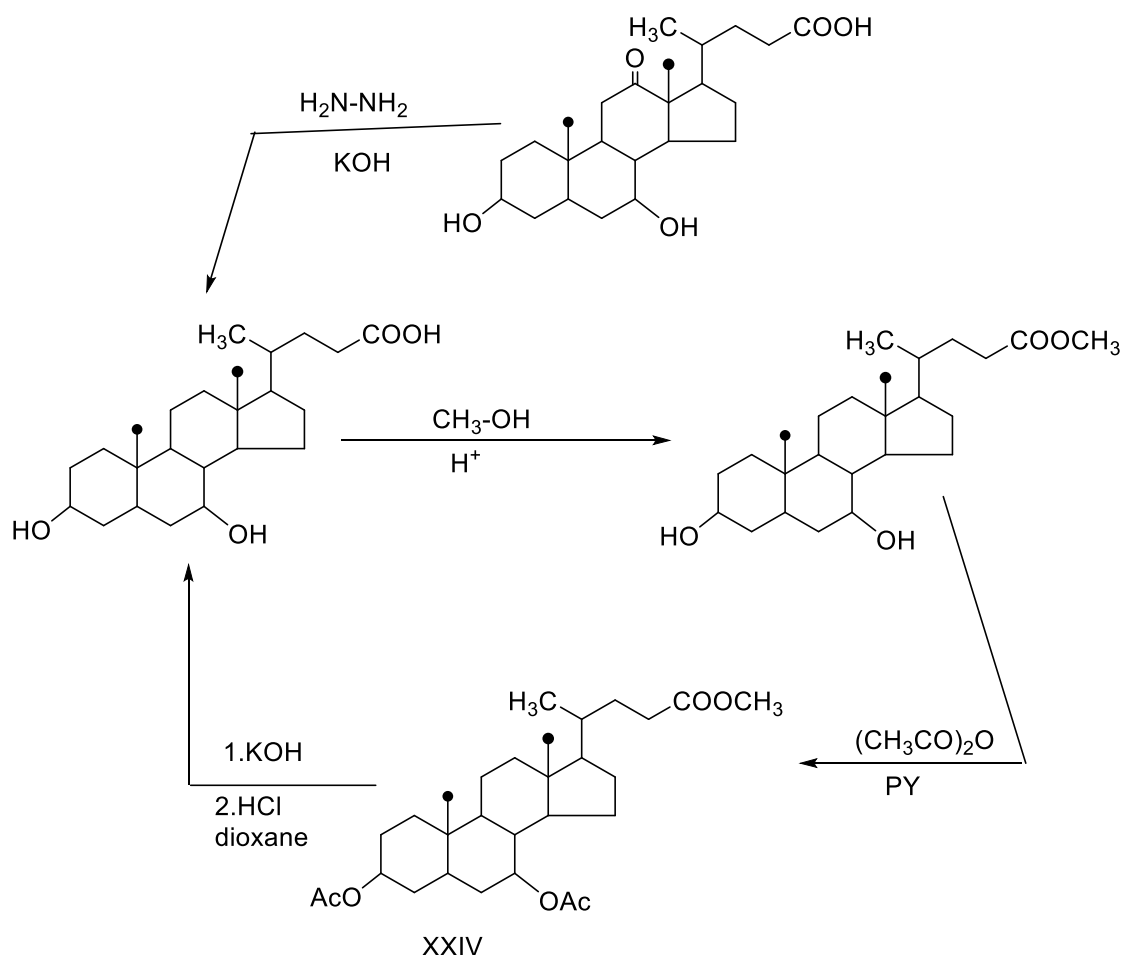


Схема 2.4 – Синтез соединения (XXIV) - метилового эфира 3α,7α-диацетокси-5β-холановой кислоты

Соответственно, успешная реализация реакции гидролиза наглядно демонстрирует, что 3α,7α-дигидрокси-5β-холановая кислота может эффективно использоваться в качестве многофункционального исходного субстрата для направленного синтеза. На её основе могут быть получены различные производные, включая литолитические и гепатопротекторные агенты, антимикробные соединения, а также поликатионные амфифильные структуры, перспективные для биомедицинского применения.

В рамках верификации структур проведена реакция щелочного гидролиза для соединения (XXIV) - метилового эфира 3α,7α-диацетокси-5β-холановой кислоты. Последующее выделение и очистка продукта (соединение II) позволили получить его в индивидуальном состоянии. Данная процедура независимым химическим путём ещё раз убедительно подтвердила корректность

строения исходного диацетилированного эфира (XXIV). Гидролиз проводился в щелочной среде с использованием 30% раствора едкого калия при контролируемой температуре, что обеспечивало полное удаление ацетильных групп без разрушения холанового скелета. Продукт реакции был выделен методом экстракции и дополнительно очищен хроматографией, после чего подвергнут тщательному анализу физико-химических и спектральных свойств.

В качестве независимого доказательства структуры $3\alpha, 7\alpha$ -диацетокси- 5β -холановой кислоты был выполнен её целенаправленный встречный синтез. Исходным соединением для этого альтернативного пути послужил $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси-12-кетометилхолат. Ключевой стадией синтеза стало восстановление карбонильной группы в положении C-12 до метильной по классическому методу Кижнера-Вольфа. Эта реакция позволила преобразовать исходный кетон в соответствующую насыщенную структуру, обеспечив таким образом формирование целевого остова $3\alpha, 7\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты, которая затем была ацетилирована.

Соединения, синтезированные независимыми маршрутами, продемонстрировали полное совпадение ключевых физико-химических констант и спектральных характеристик, включая данные ИК- и ЯМР-спектроскопии. Решающим доказательством их химической идентичности стало отсутствие депрессии (снижения температуры плавления) в смешанной пробе, когда образцы, полученные разными путями, были сплавлены вместе. Эти результаты служат убедительным подтверждением не только высокой чистоты всех полученных веществ, но и корректности установленной молекулярной структуры, что окончательно верифицирует корректность структуры стартового эфира (XXIV) и конечного продукта.

Выполненная серия опытов подтвердила, что реакционная способность различных производных $3\alpha, 12\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты в реакциях ацилирования отличается высокой степенью предсказуемости и превосходной воспроизводимостью. Процессы ацилирования с применением уксусного ангидрида, а также других ацилирующих реагентов, протекали с высокой

эффективностью, обеспечивая значительный выход целевых продуктов при минимальном образовании побочных соединений. Данные результаты подтвердили общую осуществимость и надёжность метода ацилирования для данного класса соединений.

Синтезированные ацилированные производные холановых кислот являются ценными ключевыми интермедиатами для последующего получения биологически активных веществ. На их основе могут быть созданы потенциальные лекарственные средства с литолитическим, гепатопротекторным, антимикробным действием, а также поликатионные амфифильные системы для доставки препаратов. Выполненные работы убедительно показали, что разработанная методология последовательной модификации гидроксильных и карбоксильных групп открывает путь к целенаправленному синтезу структурно разнообразных производных с заранее заданными и контролируемыми химическими свойствами.

Таким образом, комбинация таких методических подходов, как гидролиз, встречный синтез и ацилирование, наглядно демонстрирует их надёжность и универсальность для глубокого исследования сложных эфиров холановых кислот. Этот комплексный арсенал не только обеспечивает достоверное установление молекулярного строения продуктов, но и создаёт основу для целенаправленного конструирования новых производных с прогнозируемой биологической активностью. Полученные результаты формируют фундамент для последующих изысканий на стыке синтетической органической химии, медицинской химии стероидов и фармакологии, направленных на создание новых эффективных терапевтических агентов.

2.3. Синтез некоторых производных тиосемикарбазидов холановых кислот

Дальнейшая стадия исследований сосредоточилась на конструировании и синтезе новых биологически активных соединений в классе тиосемикарбазидов, производных холановых кислот. Одновременно решались задачи

оптимизации технологий получения структурных аналогов, содержащих фрагменты других природных фармакологически значимых соединений.

Ключевой практической задачей на этом этапе являлось установление оптимальных условий проведения реакции тиосемикарбазидирования для достижения максимального выхода целевых продуктов высокой степени чистоты. Особое внимание уделялось подбору реагентов, растворителей, температурного режима и катализаторов, обеспечивающих селективность процесса. Глубокое исследование реакционных характеристик и химического поведения синтезированных тиосемикарбазидов - их устойчивости, способности к образованию координационных соединений и параметров функционирования в варьируемых условиях - имеет ключевое фундаментальное значение. Эти данные являются критически важными для оценки их дальнейшего потенциала в качестве объектов фармакологического скрининга или прекурсоров для синтеза более сложных гетероциклических систем.

Согласно литературным данным [134], тиосемикарбазиды холановых кислот традиционно синтезируются путём взаимодействия холановой кислоты с тиосемикарбазидом в среде абсолютного этилового спирта при температуре 85°C. Для повышения эффективности реакции и увеличения выхода целевого продукта нами была проведена серия экспериментов по подбору оптимальных условий синтеза. В результате проведённой экспериментальной оптимизации были определены наиболее эффективные условия проведения синтеза. Оптимальный протокол предусматривает применение смеси безводного этилового спирта и метанола в молярном соотношении 2:1 в качестве реакционной среды. Процесс ведут при температуре 85°C, поддерживая режим мягкого кипячения в течение строго контролируемого времени, указанного в методике. Данный набор параметров позволяет достичь предельного баланса между скоростью реакции и селективностью, минимизируя побочные процессы. Выход целевого тиосемикарбазидного производного при следовании этому протоколу достигает 84%, что свидетельствует о высокой эффективности метода. Полученные соединения характеризуются отличными

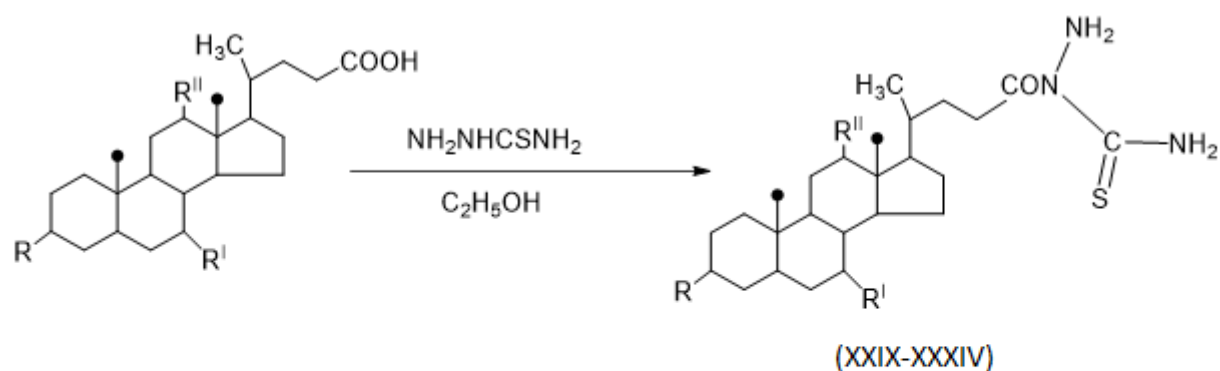
показателями чистоты и хорошей стабильностью при хранении, что было последовательно подтверждено данными ТСХ-анализа и инфракрасной спектроскопии, как указано в источнике [136].

Особое внимание в ходе экспериментов уделялось изучению химических свойств тиосемикарбазидов холановых кислот, в частности, их поведения в реакциях с участием функциональных групп тиосемикарбазидного фрагмента. Эти реакции включали взаимодействие с ацилирующими агентами, окислительные и восстановительные превращения, а также возможность образования новых сложных эфиров и конденсатов. Полученные данные позволяют судить о высокой реакционной способности тиосемикарбазидов и их потенциале для синтеза структурно разнообразных биологически активных соединений.

Кроме того, разработанный метод синтеза позволяет использовать различные холановые кислоты в качестве исходного сырья, что делает подход универсальным и применимым для получения целого ряда новых производных с предполагаемой антимикробной, литолитической и гепатопротективной активностью. Высокая степень чистоты продуктов обеспечивает их дальнейшее использование в фармако-биохимических исследованиях, включая тестирование против полевых штаммов патогенных микроорганизмов, а также возможность интеграции с другими природными или синтетическими фрагментами для создания многофункциональных лекарственных соединений.

Таким образом, оптимизация условий синтеза тиосемикарбазидов холановых кислот и изучение их химической реактивности создаёт надёжную методологическую базу для дальнейших исследований и разработки новых перспективных биологически активных веществ на основе стероидного скелета холановых кислот.

Строение синтезированного соединения (XXIX) было детально подтверждено с помощью комплексного спектроскопического анализа, включающего ПМР- и ИК-методы. Синтез тиосемикарбазид холановых кислот (XXIX-XXXIV) приводится на схеме 2.5.



Где: R, R' и R'' соответственно:

XXIX. R=R'=OH, R''=H.

XXXII. R=OH, R'=H, R''OH

XXX. R=R'=R''=OH.

XXXIII. R=R'=O, R''=H

XXXI. R=R'=OH, R''=O.

XXXIV. R=R'=OH, R''=H

Схема 2.5 - Синтез соединений (XXIX-XXXIV) - тиосемикарбазид-холановых кислот

Строение синтезированного соединения (XXIX) было детально подтверждено с помощью комплексного спектроскопического анализа, включающего ПМР- и ИК-методы. ИК-спектральные характеристики синтезированного тиосемикарбазидного производного (XXIX) демонстрируют формирование характерных интенсивных полос поглощения в области $3150\text{--}3440\text{ см}^{-1}$. Данные сигналы соответствуют валентным колебаниям связей $O-H$, что является прямым свидетельством сохранения гидроксильных групп в структуре модифицированного стероидного остова. Одновременно с этим в спектре отсутствуют чёткие узкие полосы в интервале $3376\text{--}3415\text{ см}^{-1}$, типичные для свободных первичных аминогрупп ($-NH_2$). Это наблюдение указывает на то, что аминный функционал в молекуле находится в связанном или защищённом состоянии. Наличие в спектре широкой полосы поглощения около 3010 см^{-1} , которая в других контекстах может быть отнесена к валентным колебаниям $N-H$, в данном случае интерпретируется иначе. Широкий и диффузный характер этого сигнала свидетельствует о возможном образовании внутримолекулярных водородных связей между аминным азотом и гидроксильными группами стероидного скелета.

Результаты протонной ЯМР-спектроскопии для соединения (XXIX), зарегистрированные на приборе с рабочей частотой 80 МГц в среде дейтерированного хлороформа с использованием гексаметилдисилазана (ГМДС) в качестве внутреннего стандарта, содержат детальную информацию о положении всех значимых протонов в молекуле. Синглетные сигналы, обнаруженные при значениях 0.60 и 0.82 м.д., с уверенностью отнесены к метильным группам, связанным с атомами углерода C-25 и C-26 циклопентанофенантренового каркаса. Наличие дублетного сигнала при 1.21 м.д. характерно для метильных протонов у атома C-24, что объясняется их спин-спиновым взаимодействием с соседним метиновым протоном, находящимся в хиральном центре. Обширная мультиплетная зона в интервале 1.30–2.43 м.д. соответствует протонам метиленовых (CH_2) групп, входящих в состав циклических систем стероидного скелета. Сигнал, центрированный около 3.60 м.д., интерпретируется как резонанс этиленовых протонов, расположенных вне конденсированных циклопентанофенантреновых колец. Наиболее информативным является наблюдение уширенного синглетного сигнала при 3.90 м.д., который однозначно идентифицируется как резонанс протонов, входящих в состав гидроксильных групп, локализованных у атомов углерода C-3 и C-12, что подтверждает правильность позиционной локализации *ОН* – функций в молекуле.

В продолжение исследований мы сфокусировались на синтезе N-замещённых производных холановых кислот на основе тиосемикарбазида (XXIX), поскольку именно эти соединения потенциально обладают высокой биологической активностью, включая антимикробное, литолитическое и гепатопротективное действие. Для этого было исследовано поведение аминогруппы в молекуле тиосемикарбазида при взаимодействии с различными алифатическими и ароматическими аминами. Оптимальные условия реакции включали температуру 70–80°C, продолжительность 4–5 часов и использование абсолютного этилового спирта в качестве растворителя.

В этих условиях получены соединения (XXIX–XXXIV) с почти количественным выходом, что подтверждено элементным анализом, тонкослойной хроматографией и ИК-спектроскопией (рисунок 2.6).

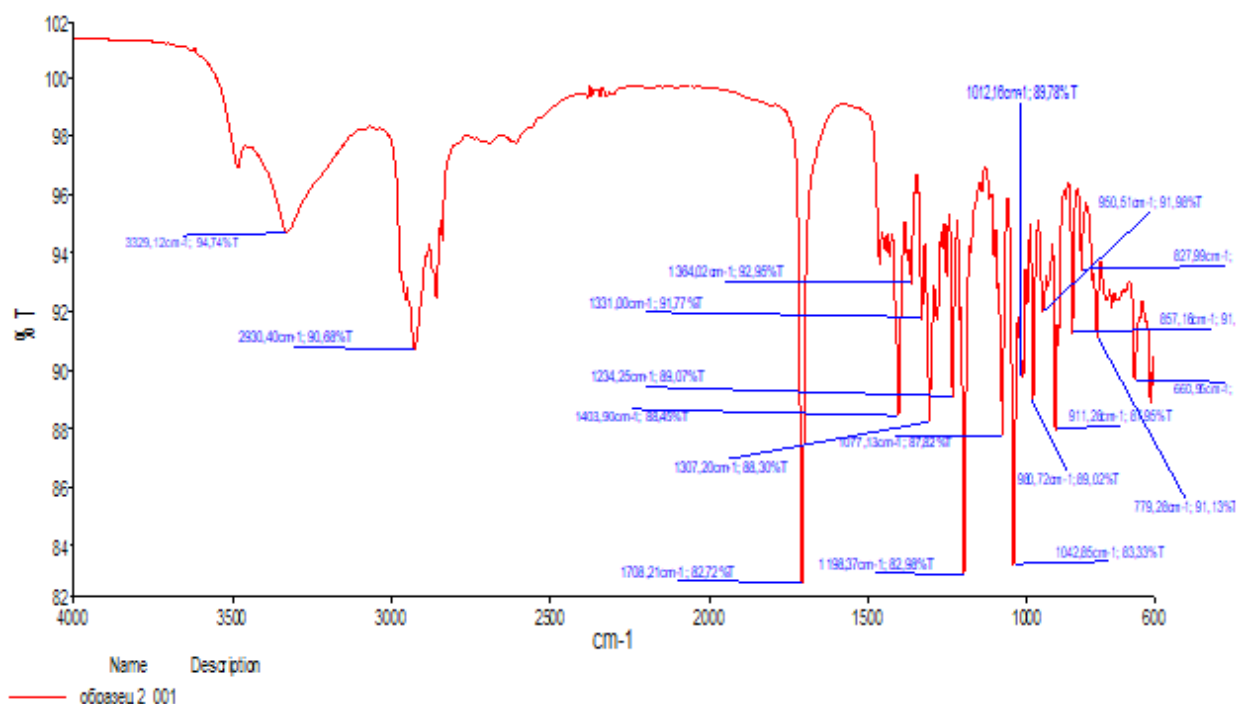


Рисунок 2.6 – ИК-спектр соединения (XXXIII) - тиосемикарбазида $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты

Сравнительные характеристики по тиосемикарбазидным соединениям холановых кислот (соединения XXIX–XXXIV) обобщены в таблице 2.6.

Совокупность данных ИК-спектроскопии для всех полученных продуктов демонстрирует важные закономерности. Во всех спектрах регистрируются характерные полосы поглощения в интервале $3455\text{--}3465\text{ см}^{-1}$, соответствующие валентным колебаниям связей гидроксильных групп.

Таблица 2.6 - Сравнительные характеристики по тиосемикарбазидным соединениям холановых кислот (соединения XXIX-XXXIV)

№ п/п	Тиосемикарбазиды холановых кислот	Выход (%)	T _{пл.} , °C	С (%) <u>найденно</u> вычислено	Н (%) <u>найденно</u> вычислено	Брутто-формула
XXIX	3α, 7α, 12α-тригидрокси-5β-	91	244 – 245	<u>62,31</u> 62,32	<u>8,93</u> 8,90	C ₂₅ H ₄₃ O ₄ SN ₃
XXX	3α, 7α-дигидрокси-5β-	87	229 – 230	<u>64,57</u> 64,58	<u>9,04</u> 9,1	C ₂₅ H ₄₂ O ₃ SN ₃
XXXI	3α, 12α-дигидрокси-5β-	88	239 – 240	<u>64,57</u> 64,58	<u>9,04</u> 9,1	C ₂₅ H ₄₂ O ₃ SN ₃
XXXII	3α, 7α-диацетокси-5β-	86	179 – 180	<u>63,38</u> 63,40	<u>8,56</u> 8,6	C ₂₉ H ₄₇ O ₅ SN ₃
XXXIII	3α, 7α-дигидроксо-12-кето-5β-	90	200 – 201	<u>66,57</u> 65,58	<u>9,6</u> 9,5	C ₂₅ H ₄₂ O ₄ SN ₃
XXXIV	3α, 7β-дигидрокси-5β-	88	210 – 211	<u>64,56</u> 64,58	<u>9,44</u> 9,40	C ₂₅ H ₄₂ O ₃ SN ₃

Одновременно отсутствуют характерные полосы, соответствующие свободной аминной группе, что указывает на полное вовлечение аминной функции в конденсацию.

Таким образом, проведённые исследования продемонстрировали высокую реакционную способность аминогруппы в молекуле тиосемикарбазида холановой кислоты, а также возможность целенаправленного синтеза новых N-замещённых производных. Полученные данные подтверждают чистоту и структурную идентичность синтезированных соединений, открывая перспективу их дальнейшего использования для получения биологически активных соединений с потенциальным применением в фармакологии и медицинской химии. Кроме того, установленные спектроскопические характеристики (ИК- и ПМР-) соединений (XXIX–XXXIV) создают методическую основу для дальнейшего анализа и синтеза аналогов с изменёнными функциональными группами, расширяя возможности исследования корреляции «структура-активность» в стероидной химии.

2.4. Исследование процесса окисления ацильных производных тиосемикарбазидов холановой кислоты

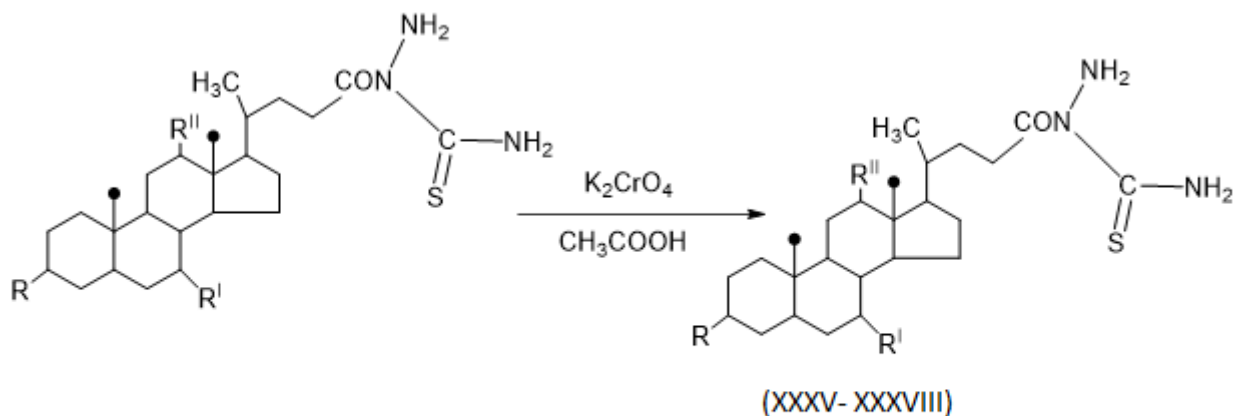
Проведённые целенаправленные исследования, сфокусированные на установлении взаимосвязи между молекулярным строением холановых кислот и их потенциальной биологической активностью, представляют собой фундаментальную основу для рационального дизайна лекарственных средств. Достижение поставленной цели - выявление ключевых структурных дескрипторов, ответственных за конкретную фармакологическую активность, - является центральной задачей современной медицинской химии. Такой подход позволяет перейти от эмпирического скрининга к предсказательному конструированию соединений. Соответственно, установление корреляции "структура-активность" служат прямым руководством для синтеза следующего поколения производных холановых кислот с предсказуемо улучшенными терапевтическими характеристиками. Такой подход особенно важен в контексте

разработки новых литолитических, гепатопротективных, противомикробных и противовоспалительных препаратов, где функциональные группы молекулы определяют механизм взаимодействия с биологическими мишенями.

Особое внимание в программе исследований было уделено реакции окисления гидроксильной группы холановых кислот, расположенной в положении С-3. Это позволило изучить реакционную способность гидроксильной функции и определить возможности её селективного модифицирования. В качестве объектов исследования были выбраны следующие тиосемикарбазиды холановых кислот:

- 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановая кислота,
- 3 α ,7 α -диацетокси-5 β -холановая кислота,
- 3 α ,7 α -дигидрокси-12 α -кето-5 β - холановая кислота,
- 3 α -ацето-12 α -гидрокси-5 β -холановая кислота.

Выбор этих соединений обусловлен наличием гидроксильных групп в различных положениях и их ролью в формировании биологической активности, а также потенциальной возможностью получения новых производных с измененными фармакологическими свойствами. Разработка метода окисления включала тщательный подбор условий проведения реакции для обеспечения селективности. Окисление осуществлялось в растворе ледяной уксусной кислоты с использованием раствора хромата калия, что обеспечивало мягкие условия, предотвращающие разрушение стероидного скелета и побочные реакции. Такой подход позволил добиться направленного окисления гидроксильных групп в положениях С-3, С-7 и С-12, а также исследовать их реакционную способность и степень устойчивости к окислению. В ходе экспериментов было показано, что гидроксильная группа в положении С-3 обладает высокой реакционной способностью и легко вступает в окислительные превращения, в то время как гидроксильные группы в положениях С-7 и С-12 проявляют более умеренную активность, что важно учитывать при целенаправленном синтезе производных (схема 2.6).



Где: R, R' и R'' соответственно:
 XXXV. R=OAc, R'=H, R''=O. XXXVI. R=OH, R'=H, R''=O,
 XXXVII. R=OAc, R'=H, R''=OH. XXXVIII. R=OAc, R'=H, R''=OH

Схема 2.6 - Получение тиосемикарбазидпроизводных холановых кислот

Полученные окисленные продукты были проанализированы методами ИК- и ПМР-спектроскопии, что подтвердило правильность проведённой модификации и отсутствие побочных реакций.

Детальное изучение химического поведения гидроксильных групп в молекулах тиосемикарбазидов позволило создать основу для дальнейшего синтеза N-замещённых и ацильных производных холановых кислот с прогнозируемой биологической активностью. Кроме того, экспериментальные данные о селективности окисления и стабильности полученных соединений формируют методическую базу для проектирования новых фармакологически активных стероидов и обеспечивают возможности для дальнейшей оптимизации структуры–активности в ряде целевых направлений медицины и фармакохимии.

Следующим этапом был осуществлён подбор оптимальных условий для селективного окисления гидроксильных групп в положении C-3, C-7 и C-12 в молекулах синтезированных ацильных производных тиосемикарбазидов холановых кислот (XXXV-XXXVIII). После анализа литературных данных и предварительных опытов, мы остановились на использовании смеси хромата калия и ледяной уксусной кислоты в качестве окислителя. Выбор данной системы был обусловлен её способностью обеспечивать мягкое, но эффективное

окисление аксиальных гидроксильных групп, при этом минимизируя побочные реакции и разрушение стероидного скелета.

Экспериментально было установлено, что для полного окисления гидроксильных групп в позициях С-3, С-7 и С-12 требуется соблюдение определённого температурного режима и временного интервала. Реакция проводилась при 25°C, и гидроксильные группы окислялись в течение 13-14 часов для частичных окислений и 23-24 часа для полного превращения, что позволило получить высокоочищенные продукты. Контроль над временем реакции оказался критически важным, поскольку избыточное воздействие хромата калия может привести к побочным окислительным процессам, включающим разрыв кольцевых структур или образование нежелательных карбонильных соединений.

Изученные физико-химические свойства синтезированных соединений детально представлены в таблице 2.7. Указанные параметры включают точные температуры плавления, особенности растворимости и полные спектральные характеристики, однозначно доказывающие высокую чистоту и структурную идентичность всех образцов. Интенсивное поглощение в области 1700-1710 см⁻¹ в инфракрасных спектрах производных XXXV-XXXVIII подтверждает формирование карбонильной группы ($>C=O$), ставшее результатом окисления соответствующих гидроксильных функций. Пространственное расположение новых функциональных групп, в частности аксиальную ориентацию карбонилов, удалось установить благодаря анализу спектров протонного магнитного резонанса (рисунок 2.7).

Окончательное подтверждение корректности структур было достигнуто путём проведения встречного синтеза тиосемикарбазида 3 α -ацето-12-кето-5 β -холановой кислоты (XXXV). Базовым реагентом в разработанной схеме выступил сложный эфир 3 α -гидрокси-12-кето-5 β -холановой кислоты и метанола, который ввели во взаимодействие с ацилирующим реагентом по гидроксильному заместителю при атоме С-3 (схема 2.7).

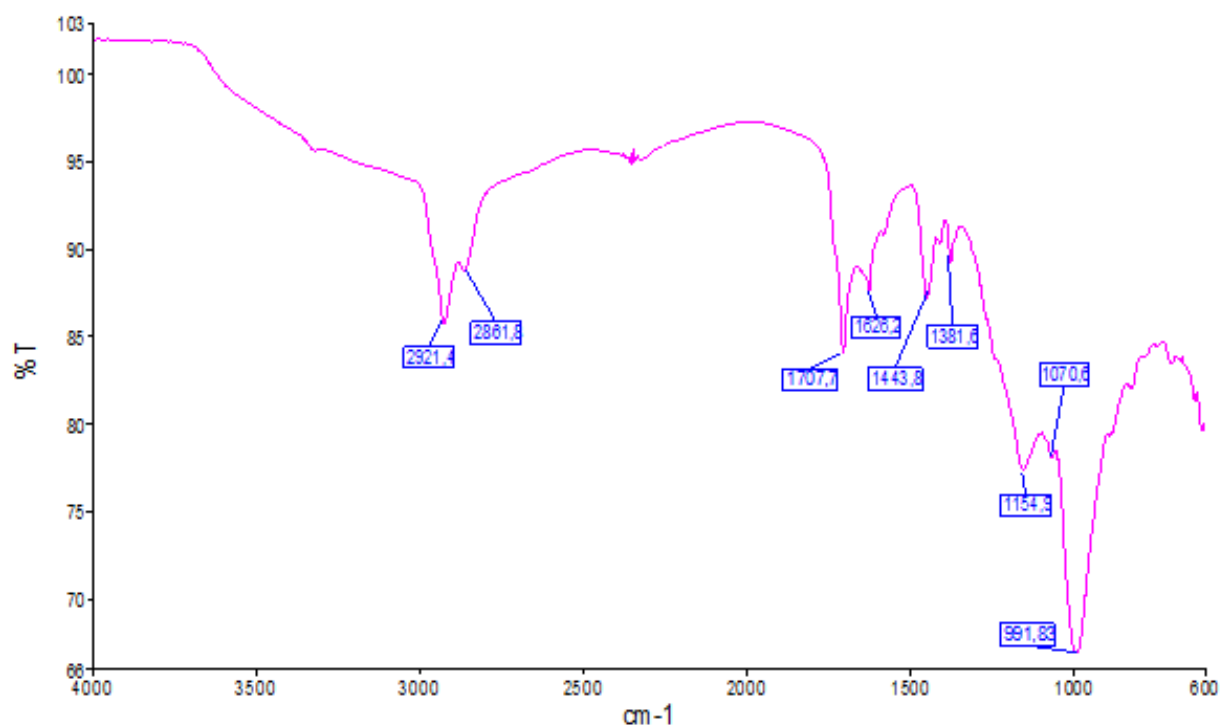


Рисунок 2.7 - ИК-спектр тиосемикарбазидного производного (XXXV), синтезированного на основе 3 α -ацетокси-12-кето-дигидрокси-5 β -холановой кислоты

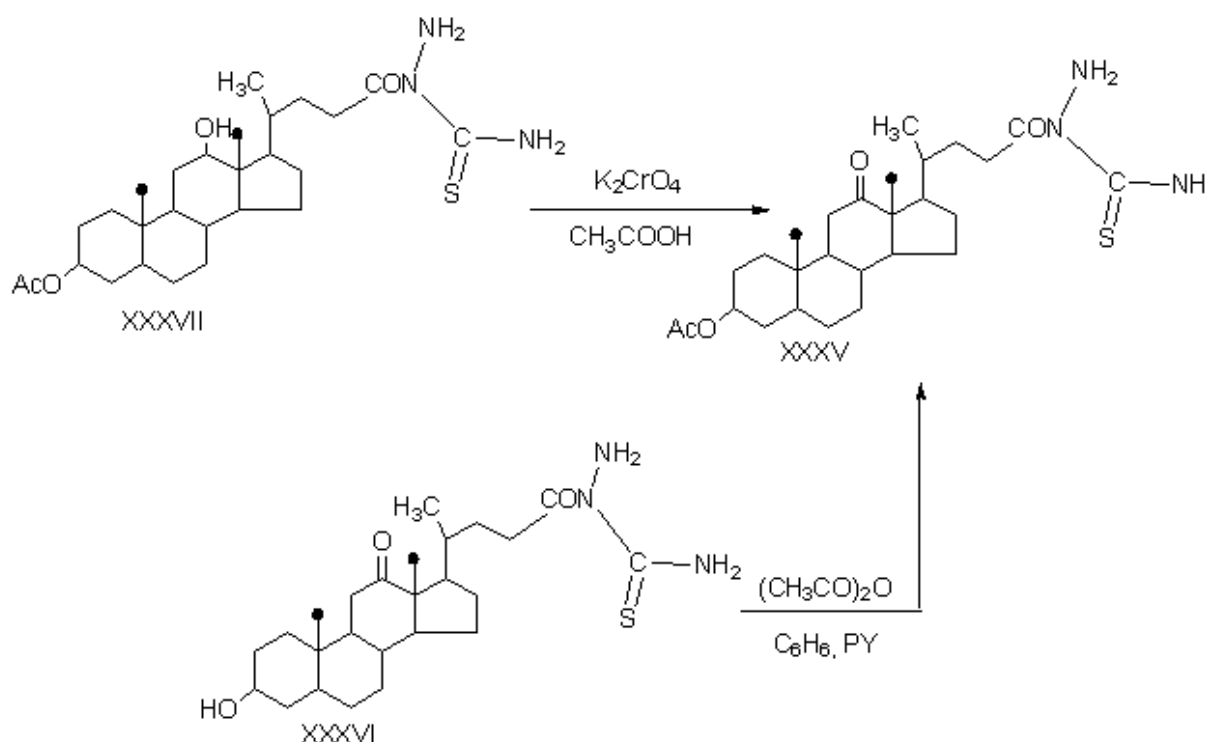


Схема 2.7 - Окисление ацилпроизводных некоторых тиосемикарбазидов холановых кислот.

Таблица 2.7 - Сравнительные характеристики по тиосемикарбазидным соединениям кетохолановых кислот (соединения XXXV-XXXVIII)

№ п/п	Тиосемикарбазиды кетохолановых кислот	Выход (%)	T _{пл.} , °C	С (%) <u>найдено</u> вычислено	Н (%) <u>найдено</u> вычислено	Брутто- формула
XXXV	Тиосемикарбазид 3 α -ацетокси-12-кето-5 β -холановой кислоты	88	155-156	<u>77.47</u> 79.84	<u>9.70</u> 9.78	C ₂₆ H ₄₄ O ₄ SN ₃
XXXVI	Тиосемикарбазид 3 α -гидрокси-12-кето-5 β – холановой кислоты	80	121-122	<u>79.84</u> 78.83	<u>9.86</u> 9.92	C ₂₉ H ₄₆ O ₄ SN ₃
XXXVII	Тиосемикарбазид 3 α -ацетокси-12 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты	85	88-89	<u>73.17</u> 73.23	<u>9.86</u> 9.72	C ₂₆ H ₄₃ O ₄ SN ₃
XXXVIII	Тиосемикарбазид 3 α -ацето-7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты	81	160-161	<u>73.20</u> 73.22	<u>9.99</u> 9.72	C ₂₆ H ₄₄ O ₄ SN ₃

Полная идентичность физико-химических параметров, включая температуру плавления и спектральные данные, была установлена для метиловых эфиров (XXXV), синтезированных различными способами. Отсутствие депрессии в смешанной пробе плавления подтвердило идентичность соединений, что служит убедительным доказательством правильности выбранного синтетического пути и подтверждает структуру ацетилированного продукта.

Таким образом, проведенные исследования продемонстрировали, что селективное окисление гидроксильных групп в молекулах ацильных производных тиосемикарбазидов холановых кислот эффективно осуществляется в условиях использования хромата калия в ледяной уксусной кислоте, а встречный синтез служит надёжным методом подтверждения структуры полученных соединений. Полученные результаты создают основу для дальнейшей разработки производных холановых кислот, характеризующихся прогнозируемым уровнем биологической активности, а также открывают возможности для осуществления направленного дизайна структурных модификаций, базирующегося на установленных закономерностях реакционной способности и функциональной специфичности молекулы.

2.5. Исследование реакций нуклеофильного замещения для некоторых соединений 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксидгидразидов холановой кислоты

Основой создания новых производных холановых кислот выступает рациональный метод, основанный на глубоком изучении их предполагаемых биологических превращений и сходства со структурами известных биоактивных веществ. Указанная методология даёт возможность предсказывать не только химическое поведение молекулы, но и оценивать потенциальную фармакологическую эффективность будущих соединений, что имеет особую значимость для конструирования лекарств с направленным действием.

Из литературных источников известно, что введение серосодержащих гетероциклов в структуру холановых кислот существенно усиливает их

биологическое влияние, включая антибактериальную и литолитическую активность [138-139]. Исходя из этого, ключевой задачей выполненных работ являлось создание новых веществ на основе холановых кислот, содержащих гетероциклические компоненты, например, 3,6-дихлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид, а также высшие карбоновые кислоты. Подобная стратегия позволила объединить стероидную основу с функциональными группами, способными целенаправленно изменять биологические свойства и повышать терапевтическую эффективность соединений.

Практическая реализация данной научной задачи началась с получения гидразидов холановых кислот в соответствии с апробированным лабораторным методом [55]. Ключевой частью работы стало детальное исследование их химического поведения в условиях нуклеофильного замещения с 3,6-дихлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксидом. Проведённые исследования выявили, что атом водорода, входящий в состав гидразидной группы, обладает высокой лабильностью и может подвергаться селективному замещению на разнообразные функциональные фрагменты или молекулярные остатки, что создаёт предпосылки для целенаправленного синтеза обширной библиотеки новых химических производных.

Значительное внимание было уделено замещённым производным холановых кислот. Их структурное сходство с известными холелитолитическими средствами, например, с глицериновым эфиром $3\alpha, 7\alpha$ – дигидрокси- 5β – холановой кислоты [139], позволяет предположить наличие у них комплекса биологических эффектов, включая литолитическое, гепатопротекторное и антимикробное действие. В ходе скрининга условий были эмпирически установлены оптимальные параметры проведения процесса: температурный интервал $75\text{--}85^\circ\text{C}$, продолжительность реакции 4–4,5 часа, эквимолярное соотношение исходных реагентов 1:1 и использование пиридина в качестве реакционной среды, служащего одновременно растворителем и акцептором кислоты [140].

Нуклеофильное замещение было осуществлено по разработанной схеме, в ходе которой гидразид холановой кислоты взаимодействовал с 3,6-дихлор-

2-метилбензотиофен-1,1-диоксидом. В данном процессе лабильный атом водорода, входящий в состав гидразидной функциональной группы, подвергался замещению на сложный органический остаток, содержащий сернистый гетероцикл. Полученные соединения характеризовались высокой степенью чистоты, что подтверждалось данными тонкослойной хроматографии и спектроскопическим анализом (рисунок 2.8).

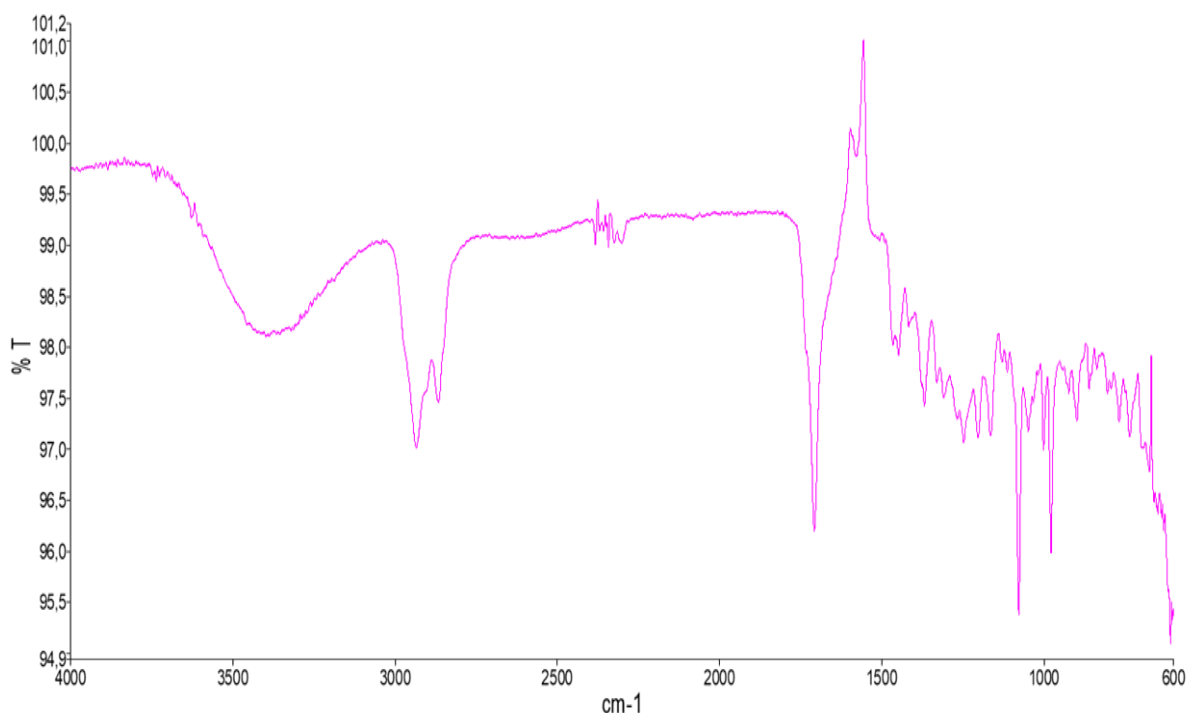


Рисунок 2.8 – Инфракрасный спектр соединения (XXXIX), идентифицированного как гидразид 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты

Последующее изучение характеристик полученных веществ отчетливо продемонстрировало, что введение гетероциклического фрагмента в молекулу холановой кислоты значительно изменяет её физико-химические параметры, включая растворимость и полярность, что может быть использовано для регулирования фармакокинетических свойств потенциальных лекарственных препаратов.

Таким образом, проведенные исследования позволили не только разработать надежные методы синтеза новых производных холановых кислот с

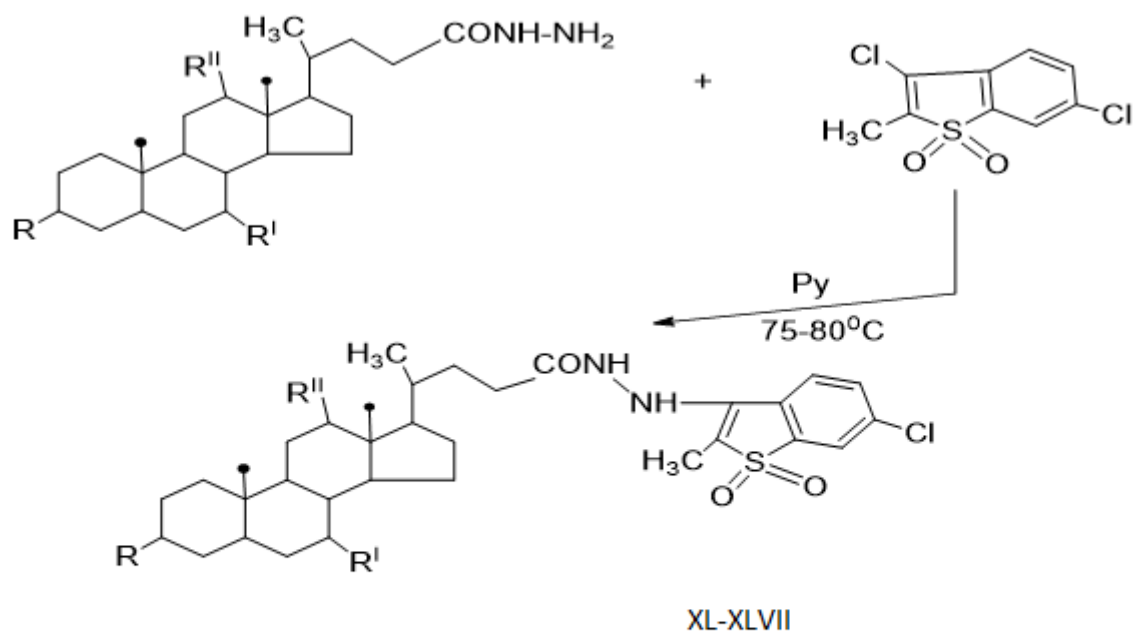
гетероциклическими фрагментами, но и заложили основу для дальнейшего изучения их биологической активности и возможного применения в медицине.

Основой для проведения синтеза послужил ряд предварительно полученных гидразидных производных различных холановых кислот. В перечень исходных соединений вошли следующие соединения:

- гидразид 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты,
- гидразид 3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты,
- гидразид 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты,
- гидразид 3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты,
- гидразид 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты,
- гидразид 3 α ,7 α -диацетокси-5 β -холановой кислоты,
- гидразид 3 α -гидрокси-12-кето-5 β -холановой кислоты,
- гидразид 3 α ,7 α -дигидрокси-12-кето-5 β -холановой кислоты.

Обработка указанных соединений 3,6-дихлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксидом в условиях оригинальной синтетической методики обеспечила эффективное образование целевых гибридных конструкций. Итогом данного этапа работы стали ранее не описанные гибридные системы – гидразиды 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-холановых кислот (соединения XL–XLVII), синтез которых отражён на схеме 2.8.

Эти соединения представляют собой комбинированные молекулы, сочетающие стероидный каркас холановой кислоты с функциональным гетероциклическим фрагментом, что повышает их потенциальную биологическую активность, включая антимикробную и литолитическую активность.



Где: XL. R, R^I=OH, R^{II}=H. XLIV. R=OAc, R^I=OH, R^{II}=H
 XLI. R, R^{II}=OH, R^I=H. XLV. R, R^I=OAc, R^{II}=H
 XLII. R, R^I, R^{II}=OH. XLVI. R=OH, R^I=H, R^{II}=O
 XLIII. R, R^{II}=OH, R^I=H. XLVII. R, R^I=OH, R^{II}=O

Схема 2.8 - Получение новых производных – 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразидов холановой кислоты

Систематизированные данные, включающие перечень синтезированных веществ (XL – XLVII) с их ключевыми физико-химическими свойствами, приведены в таблице 2.8. Анализ представленных значений показывает, что выход целевых соединений, в частности, 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксида-гидразида варьируется в диапазоне от 74 до 85 процентов, что служит надёжным индикатором высокой эффективности и практической применимости выбранного синтетического протокола. В процессе реакции наблюдалось исключительно селективное замещение одного атома водорода в гидразидном фрагменте.

Для подтверждения строения всех синтезированных соединений был применён комплекс современных аналитических методик.

Таблица 2.8 - Сравнительные характеристики соединений (*XL – XLVII*) - 6-хлор-2-метил-бензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидрозидов холановой кислоты

№ п/п	Соединения	Выход (%)	T _{пл.} , °C	C (%) <u>найденно</u> вычислено	H (%) <u>найденно</u> вычислено	Брутто- формула
1	2	3	4	5	6	7
<i>XL</i>	6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразид-3 α , 7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты	83	176-177	<u>62,31</u> 62,32	<u>8,93</u> 8,90	$C_{32}H_{46}O_5SN_3Cl$
<i>XLI</i>	6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид- гидразид-3 α , 12 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты	79	229-230	<u>64,57</u> 64,58	<u>9,04</u> 9,1	$C_{33}H_{47}O_6SN_3Cl$
<i>XLII</i>	6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразид-3 α , 7 α , 12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты	80	239-240	<u>64,57</u> 64,58	<u>9,04</u> 9,1	$C_{32}H_{46}O_5SN_3Cl$

Продолжение таблицы 8

1	2	3	4	5	6	7
<i>XLIII</i>	6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-ди- оксид-гидразид-3 α , 7 β –дигидрокси-5 β - холановой кислоты	78	200-201	$\frac{66,57}{65,58}$	$\frac{9,6}{9,5}$	$C_{32}H_{46}O_5SN_3Cl$
<i>XLIV</i>	6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-ди- оксид-гидразид-3 α -ацетокси-7 α -дигид- рокси-5 β -холановой кислоты	85	195-196	$\frac{60,52}{61,53}$	$\frac{8,64}{8,61}$	$C_{37}H_{51}O_8SN_3Cl$
<i>XLV</i>	6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-ди- оксид-гидразид-3 α , 7 α -диацетокси-5 β - холановой кислоты	75	190-191	$\frac{61,55}{61,54}$	$\frac{8,69}{8,67}$	$C_{39}H_{54}O_8SN_3Cl$
<i>XLVI</i>	6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-ди- оксид-гидразид-3 α -гидрокси-12-кето- 5 β -холановой кислоты	78	185-186	$\frac{70,52}{71,53}$	$\frac{9,64}{9,61}$	$C_{37}H_{51}O_8SN_3Cl$
<i>XLVII</i>	6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-ди- оксид-гидразид-3 α , 7 α -дигидрокси-12- кето-5 β -холановой кислоты	74	180-181	$\frac{63,52}{62,53}$	$\frac{8,69}{8,66}$	$C_{37}H_{53}O_8SN_3Cl$ $C_{37}H_{53}O_8SN_3Cl$

Метод инфракрасной спектроскопии позволил идентифицировать и зафиксировать характерные сигналы поглощения, соответствующие специфическим функциональным группам. В спектрах исходных гидразидов были обнаружены интенсивные полосы, указывающие на присутствие гидроксильных групп (область $3450\text{--}3460\text{ см}^{-1}$), карбонильных фрагментов ($>C=O$, область $1770\text{--}1800\text{ см}^{-1}$) и первичной аминогруппы NH_2 (область $3380\text{--}3550\text{ см}^{-1}$), что наглядно иллюстрируется на рисунке 2.9.

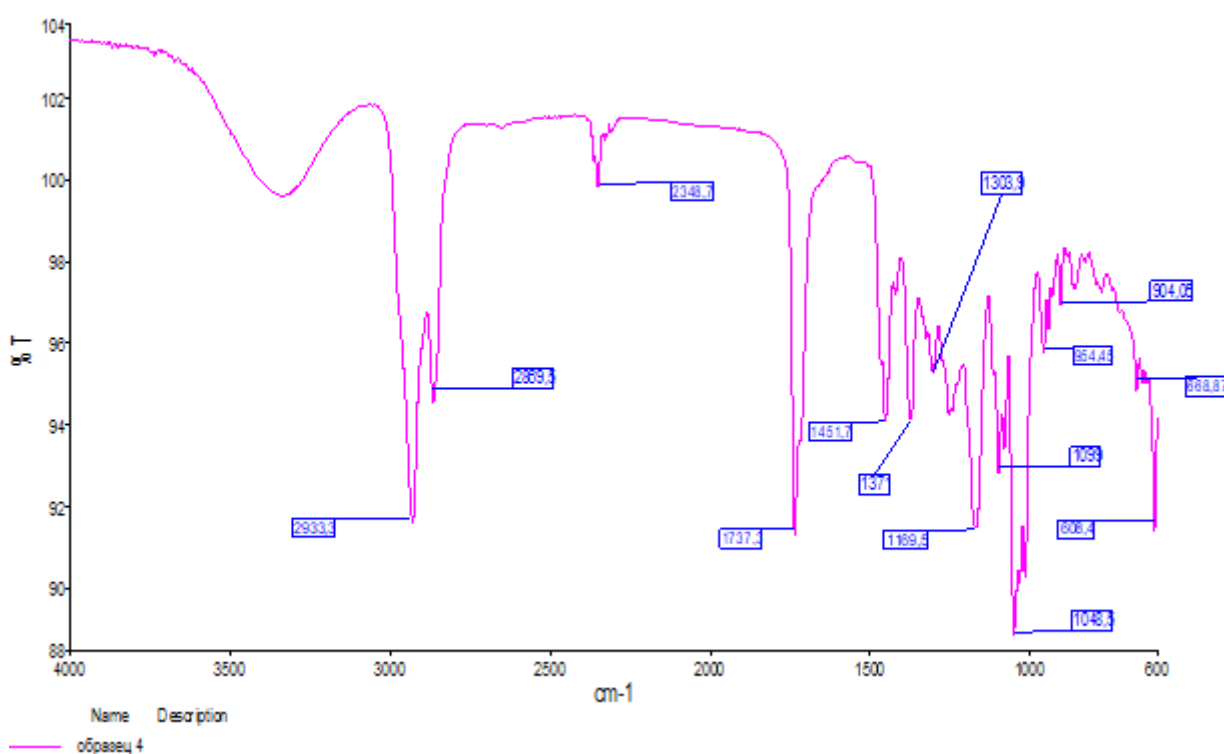


Рисунок 2.9 – ИК-спектр соединения (XLI) – 6-хлор-2-метил-бензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидрозид-3 α , 12 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты

Результаты спектрального исследования демонстрируют наличие характерных полос поглощения в ИК-спектрах целевых продуктов, например, соединения (XL). Чётко регистрируются сигналы в интервалах $3350\text{--}3320\text{ см}^{-1}$ и $1670\text{--}1690\text{ см}^{-1}$, что указывает на присутствие в молекуле амидной NH – и карбонильной $C=O$ – групп соответственно, что подтверждает успешное проведение нуклеофильного замещения без разрушения стероидного каркаса

(рисунок 9). Элементный анализ также подтвердил правильность строения синтезированных молекул и их высокую чистоту.

Для установления индивидуальности и оценки чистоты синтезированных соединений был применён метод тонкослойной хроматографии на пластинах с закреплённым слоем силикагеля марки АСК. Элюирование осуществляли смесью хлороформа и этанола в объёмном соотношении 8:1, а визуализацию зон проводили, обрабатывая хроматограммы парами йода. Результаты хроматографического анализа показали однородность полученных веществ и отсутствие побочных продуктов реакции, что подтверждает высокую селективность метода синтеза.

Результаты проделанной работы обеспечили возможность всестороннего анализа химического поведения гидразидов холановых кислот в условиях нуклеофильного замещения с участием 3,6-дихлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксида. Экспериментальные данные подтвердили, что гидроксильные функциональные группы, расположенные у атомов С-3, С-7 и С-12, не затрагиваются в ходе данного превращения и сохраняют свою активность, оставаясь доступными для последующих целенаправленных структурных модификаций. Полученные гибридные структуры - 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксида-гидразиды холановых кислот (соединения XL–XLVII) - отличаются высокой степенью селективности при синтезе и стабильной воспроизводимостью результатов. Данный ряд веществ представляет собой перспективное направление для углублённого изучения в контексте создания эффективных противомикробных средств и литолитических препаратов.

Кроме того, синтезированные соединения открывают новые возможности для создания библиотеки производных холановых кислот с различными гетероциклическими заместителями, что позволяет проводить систематические исследования структуры и активности (SAR) с целью выявления наиболее эффективных кандидатов для фармакологических исследований и разработки новых лекарственных средств.

2.6. Применение масс- и ЯМР-спектроскопии для определения строения синтезированных соединений

Проведение структурной идентификации синтезированных производных – 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразидов и тиосемикарбазидов холановой кислоты – потребовало комплексного использования современных аналитических методов, среди которых центральное место заняли масс-спектрометрия и протонная ядерно-магнитно-резонансная (ПМР) спектроскопия. Применение данной методической комбинации позволило не только установить молекулярную массу соединений, но и уточнить особенности их структурных элементов, положение функциональных групп и конфигурацию стероидного ядра. Эти методы оказались ключевыми для всестороннего подтверждения идентичности синтезированных соединений и исключения возможности образования изомеров или побочных продуктов.

В частности, для ряда соединений, включая тиосемикарбазиды (XXIX, XXX, XXXI) и гидразидные производные холановых кислот (XL, XLI, XLII), были проведены детальные исследования ПМР-спектров в протонном режиме при частоте 80 МГц в среде дейтрированного хлороформа. В ходе анализа были идентифицированы характерные резонансы, соответствующие метильным группам, связанным с атомами углерода C-18, C-19, C-21, C-24 и C-25 стероидного остова. Указанные сигналы наблюдались в виде синглетов или дублетов в области химических сдвигов 0,60–1,25 м.д. Мультиплеты в области 1,30–2,50 м.д. соответствовали метиленовым протонам циклической части стероидного каркаса, а сигналы в области 3,50–3,90 м.д. были отнесены к протонам гидроксильных групп в положениях C-3, C-7 и C-12, а также к этиленовым протонам амидных и тиосемикарбазидных фрагментов. Уширенные синглеты в области 3,90–4,10 м.д. указывали на присутствие ацетильных и гидроксильных групп в функциональных заместителях.

Масс-спектрометрия дополняла эти данные, позволяя точно определить молекулярную массу каждого соединения. Например, для гидразидного производного XL был зарегистрирован молекулярный ион $[M + H]^+$, полностью

соответствующий расчётной массе 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксида холановой кислоты. Наличие характерных фрагментных ионов, образующихся вследствие разрыва амидной и гидразидной связей, позволило подтвердить положение функциональных групп и целостность стероидного ядра.

Полученные результаты интерпретации спектральных данных для производных XXX, XXXI, XLI и XLII позволили установить, что в ходе реакции нуклеофильного замещения происходит селективное образование химической связи между реакционным центром гидразидного либо тиосемикарбазидного фрагмента и молекулой 3,6-дихлор-2-метилбензотиофен-1,1-диоксида. При этом ключевые гидроксильные функции, расположенные у атомов углерода C-3, C-7 и C-12, остаются незатронутыми в процессе синтеза, полностью сохраняя свою исходную реакционную способность для последующих целенаправленных химических модификаций. Графическое представление структурных формул синтезированных соединений данной серии (XXX, XXXI, XXIX, XL, XLI и XLII) приведено на схеме 2.9.

Сигналы протонов, относящиеся к новым заместителям, чётко выделялись в ПМР-спектрах, что дополнительно подтверждало успешность синтеза и селективность реакций.

Таким образом, комплексное применение масс- и ПМР-спектроскопии позволило всесторонне охарактеризовать синтезированные соединения, подтвердить их структурную идентичность и высокую чистоту, а также установить конфигурацию стероидного ядра и положение всех функциональных групп. Эти данные создают прочную основу для дальнейшего изучения биологической активности синтезированных гидразидных и тиосемикарбазидных производных холановых кислот, включая их потенциальное применение в качестве антимикробных, литолитических и гепатопротективных препаратов.

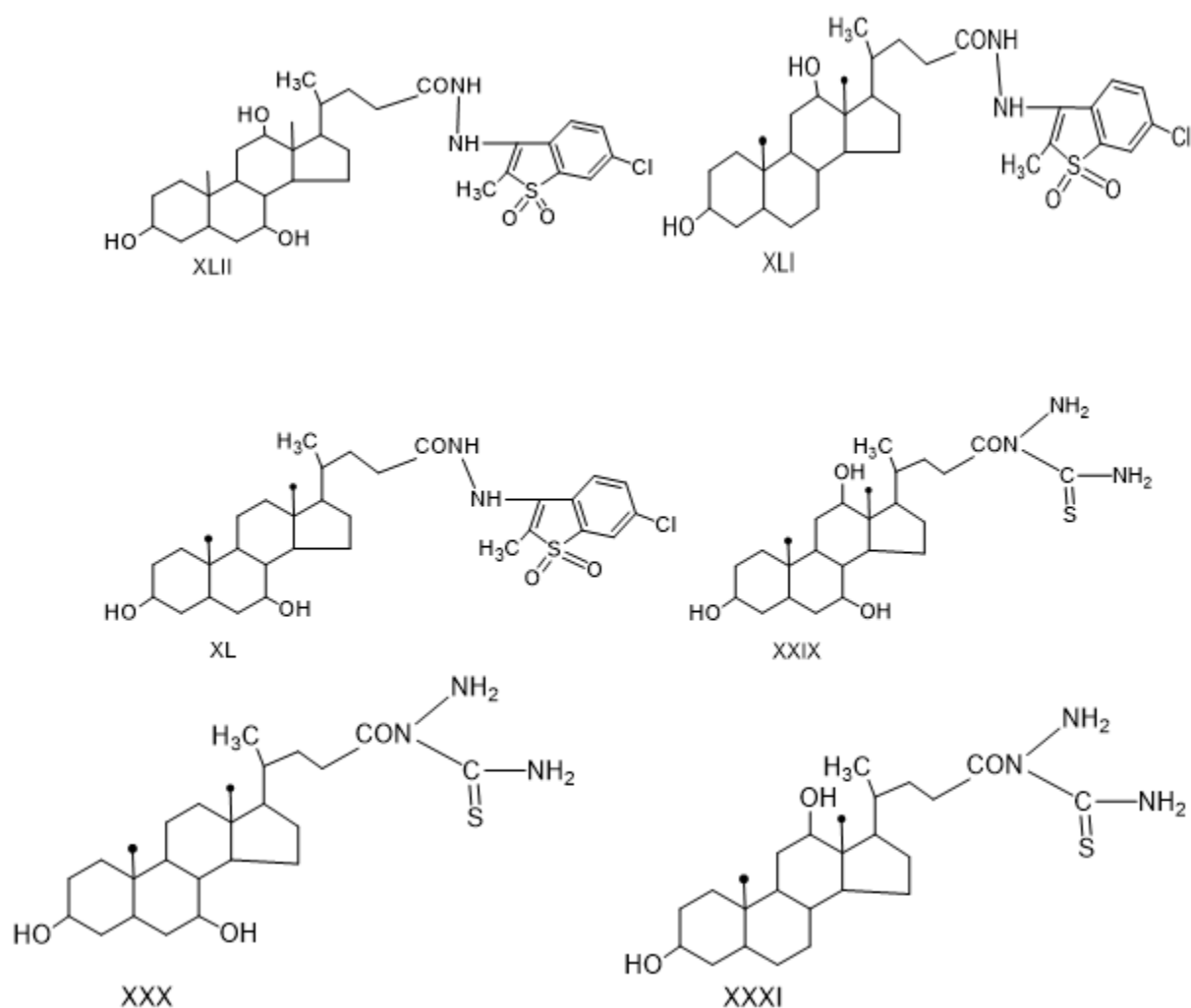


Схема 2.9 – Синтезированные соединения - XXX, XXXI, XXIX, XL, XLI и XLII

ПМР-спектр (XLII) (80 МГц, CDCl_3) предоставляет исчерпывающие доказательства корректности его строения. Спектр позволяет чётко идентифицировать все ключевые структурные фрагменты молекулы 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразида 3α , 7α , 12α -тригидрокси- 5β -холановой кислоты (рисунок 2.10).

Спектральная картина демонстрирует характерные сигналы, соответствующие метильным группам стероидной структуры. Протоны метильных групп, ассоциированные с атомами C-18, C-19 и C-21, регистрируются в виде синглетов в диапазонах 0.62–0.70 и 0.95–1.05 м.д., что находится в полном соответствии с теоретическими расчётами для предполагаемой молекулы.

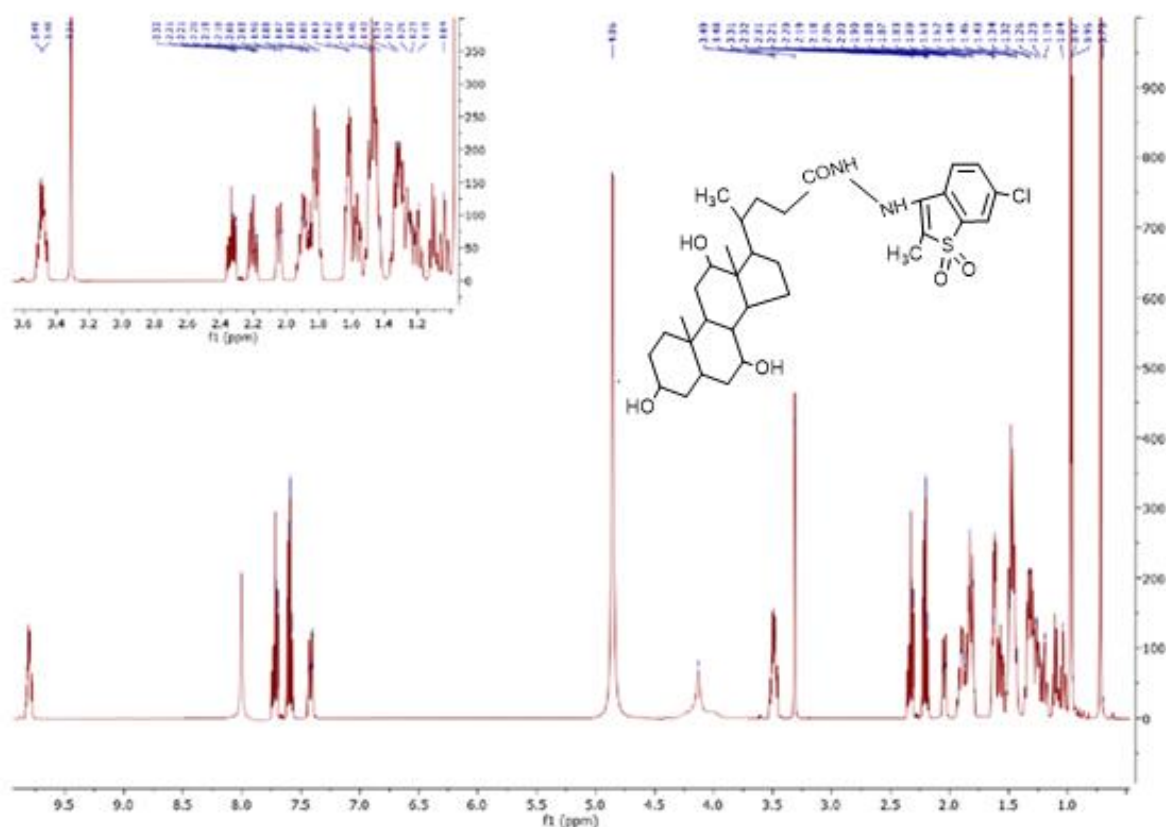


Рисунок 2.10 - ПМР-спектр соединения (XLII) - 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразида 3 α , 7 α , 12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты

Дублетный сигнал при 1.21 м.д. относится к метильным протонам в положении C-24, в то время как сложные мультиплеты в области 1.30–2.50 м.д. генерируются метиленовыми протонами циклических фрагментов остова (атомы C-1–C-7, C-11–C-14). Наличие мультиплета в интервале 2.15–2.55 м.д., отвечающего ациклическим метиленовым протонам боковой цепи (C-20–C-23), служит прямым доказательством её структурной сохранности в процессе синтеза. Резонансы протонов гидроксильных групп, расположенных у атомов C-3, C-7 и C-12, фиксируются в области 3.70–4.05 м.д., окончательно подтверждая наличие незащищённых гидроксильных функций в молекуле. Уширенный синглет вблизи 3,90 м.д. указывает на наличие гидроксильных протонов, включённых в водородные связи, что характерно для тригидроксильной структуры холанового ядра. Протоны этиленовой группы гидразидного фрагмента

проявляются в виде мультиплета с центрами около 3,60 м.д., что подтверждает успешное присоединение 6-хлор-2-метилбензотиофен-1,1-диоксида к гидразидной функции.

В спектральных данных также фиксируются важные сигналы, относящиеся к ацильному фрагменту и указывающие на возможные электронные взаимодействия с ароматической системой тиафена. Характерный широкий синглет в области 7,25–7,35 м.д. соответствует протону амидной связи ($N-H$) в гидразидной группе, что служит прямым подтверждением её присутствия в молекуле. Сигналы ароматических протонов 6-хлор-2-метилбензотиофенового фрагмента проявляются в области 7,10–7,85 м.д., отражая корректное включение ароматического кольца в молекулу.

ПМР-спектр 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразида $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты (XL), снятый при 80 МГц в дейтрированном хлороформе, позволяет подробно охарактеризовать молекулу и служит надёжным подтверждением её структуры (рисунок 2.11). Интерпретация спектральных данных позволяет однозначно идентифицировать характеристические сигналы, соответствующие метильным заместителям стероидного ядра. Сигналы протонов метильных групп, локализованных у атомов C-18, C-19 и C-21, наблюдаются в виде синглетов в интервалах 0,61–0,69 и 0,95–1,03 м.д. Дублетное расщепление сигнала при 1,20 м.д. соответствует метильной группе у атома C-24. Наличие множественных мультиплетов в области 1,30–2,45 м.д. объясняется вкладом метиленовых протонов, входящих в состав циклических фрагментов молекулы (атомы C-1–C-7, C-11–C-14). Сохранение ациклической структуры боковой цепи подтверждается регистрацией мультиплетных сигналов её протонов (C-20–C-23) в диапазоне 2,10–2,50 м.д., что согласуется с предполагаемой молекулярной структурой.

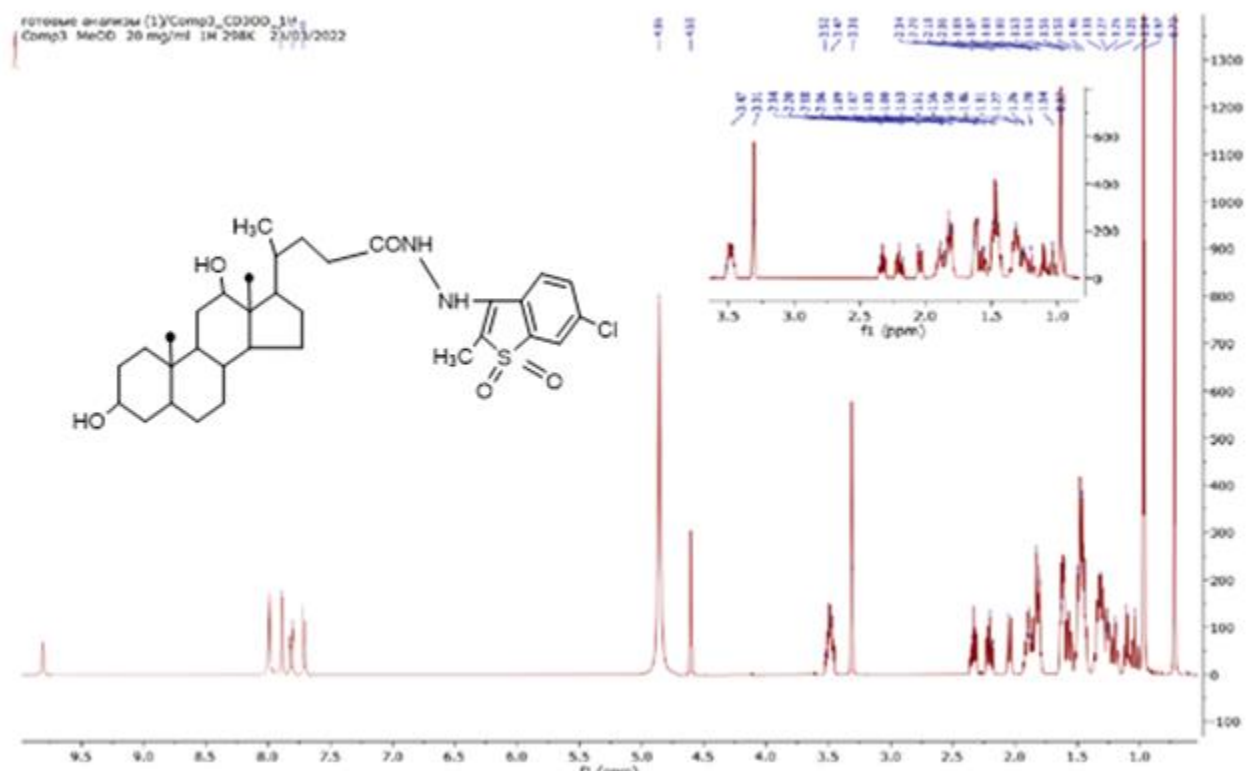


Рисунок 2.11 - ПМР-спектр соединения (XL) - 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразида 3 α , 7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты

Сигналы протонного магнитного резонанса, соответствующие гидроксильным заместителям при атомах C-3 и C-7, наблюдаются в спектральном диапазоне 3,65–4,00 м.д. Особого внимания заслуживает регистрируемый в данной области уширенный синглетный пик с центром вблизи отметки 3,85 м.д., он свидетельствует о наличии гидроксильных протонов, участвующих в образовании стабильных внутримолекулярных водородных связей. Протоны гидразидной функции, соединяющейся с 6-хлор-2-метилбензотиофен-1,1-диоксидом, наблюдаются как широкий синглет в области 7,20–7,35 м.д., что свидетельствует о формировании амидной связи. Ароматические протоны бензотиофенового фрагмента регистрируются в виде серии мультиплетных пиков в интервале 7,05–7,80 м.д., что убедительно доказывает присоединение тиофенового гетероцикла к гидразидному остову. Резонансные сигналы этиленовых

протонов, локализованных в гидразидном звене, фиксируются в диапазоне 3,55–3,65 м.д., что согласуется с ожидаемой структурой N-соединения.

Таким образом, ПМР-спектр соединения (XL) подтверждает корректность синтеза 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразида $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты, демонстрирует сохранение всех функциональных групп стероидного ядра, гидроксильных заместителей и наличие тиюфенового фрагмента через гидразидную связь. Эти данные создают надежную основу для последующих исследований биологической активности соединения, включая оценку противомикробного и литолитического действия.

Результаты анализа ПМР-спектра тиосемикарбазида $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты (XXIX), зарегистрированного при частоте 80 МГц в $CDCl_3$, обеспечивают полную и детальную характеристику молекулярной структуры данного соединения (рисунок 2.12).

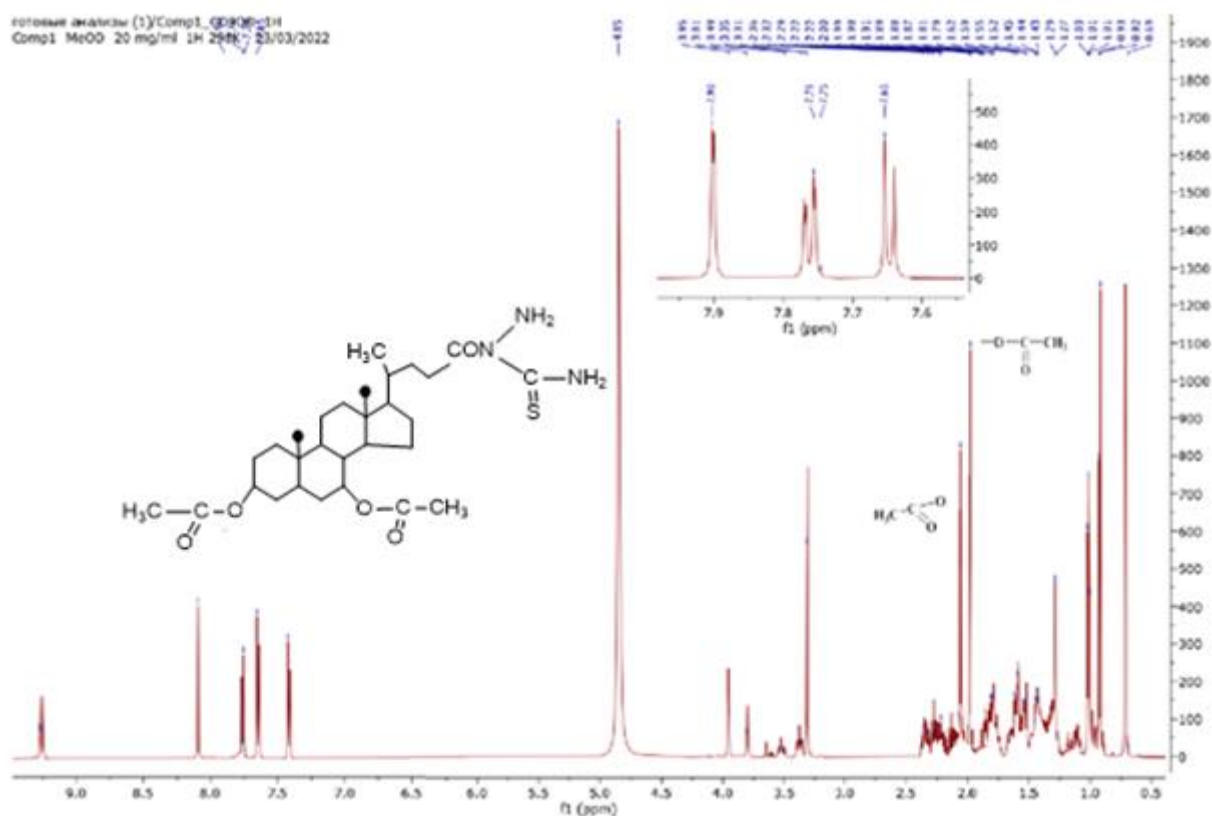


Рисунок 2.12 - ПМР-спектр соединения (XXIX) - тиосемикарбазида $2\alpha, 7\alpha$ -диацетокси- 5β -холановой кислоты

Спектр однозначно идентифицирует все ключевые структурные элементы. Сигналы метильных протонов стероидного ядра наблюдаются в ожидаемых областях: синглеты в интервале 0,60–0,70 м.д. соответствуют группам C-18 и C-19, а синглет при 0,95 м.д. относится к метилу C-21. Протоны метильных групп боковой цепи (C-26 и C-27) проявляются в виде синглетов в районе 0,82–0,85 м.д. Обширная мультиплетная область 1,25–2,50 м.д. образована метиленовыми протонами циклической системы (C-1–C-7, C-11–C-14), тогда как мультиплеты в диапазоне 2,15–2,55 м.д. соответствуют ациклическим метиленовым протонам боковой цепи (C-20–C-23).

Особое значение имеют сигналы в области 3,70–4,05 м.д., которые отнесены к протонам гидроксильных групп на C-3, C-7 и C-12, причем ширина сигналов и их сдвиг указывают на возможное участие этих гидроксильных групп во внутримолекулярных водородных связях, что характерно для стероидных молекул с несколькими гидроксильными заместителями.

Протоны тиосемикарбазидной функции $NH - CS - NH - SO$ проявляются в спектре как широкие синглеты в области 7,15–7,40 м.д., что подтверждает наличие тиокарбамидного фрагмента в молекуле. Сигналы протонов этиленового сегмента гидразидного фрагмента наблюдаются в области 3,50–3,65 м.д., что свидетельствует о правильной конформации бокового соединительного звена между стероидным ядром и тиосемикарбазидной группой.

Таким образом, ПМР-спектр соединения (XXIX) демонстрирует полное соответствие ожиданиям по структуре тиосемикарбазида $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты, подтверждает сохранность всех функциональных групп стероидного ядра, гидроксильных заместителей и наличие тиосемикарбазидного фрагмента. Эти данные являются надежной основой для последующих исследований химической активности и биологической активности данного соединения, включая его потенциал как противомикробного и литолитического агента.

ПМР-спектр тиосемикарбазида $3\alpha, 12\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты (XXXI), зарегистрированный при частоте 80 МГц в дейтерированном

хлороформе, позволяет подробно охарактеризовать структурные особенности молекулы и подтвердить правильность синтеза соединения. В спектре отчетливо видны сигналы метильных протонов стероидного ядра (рисунок 2.13).

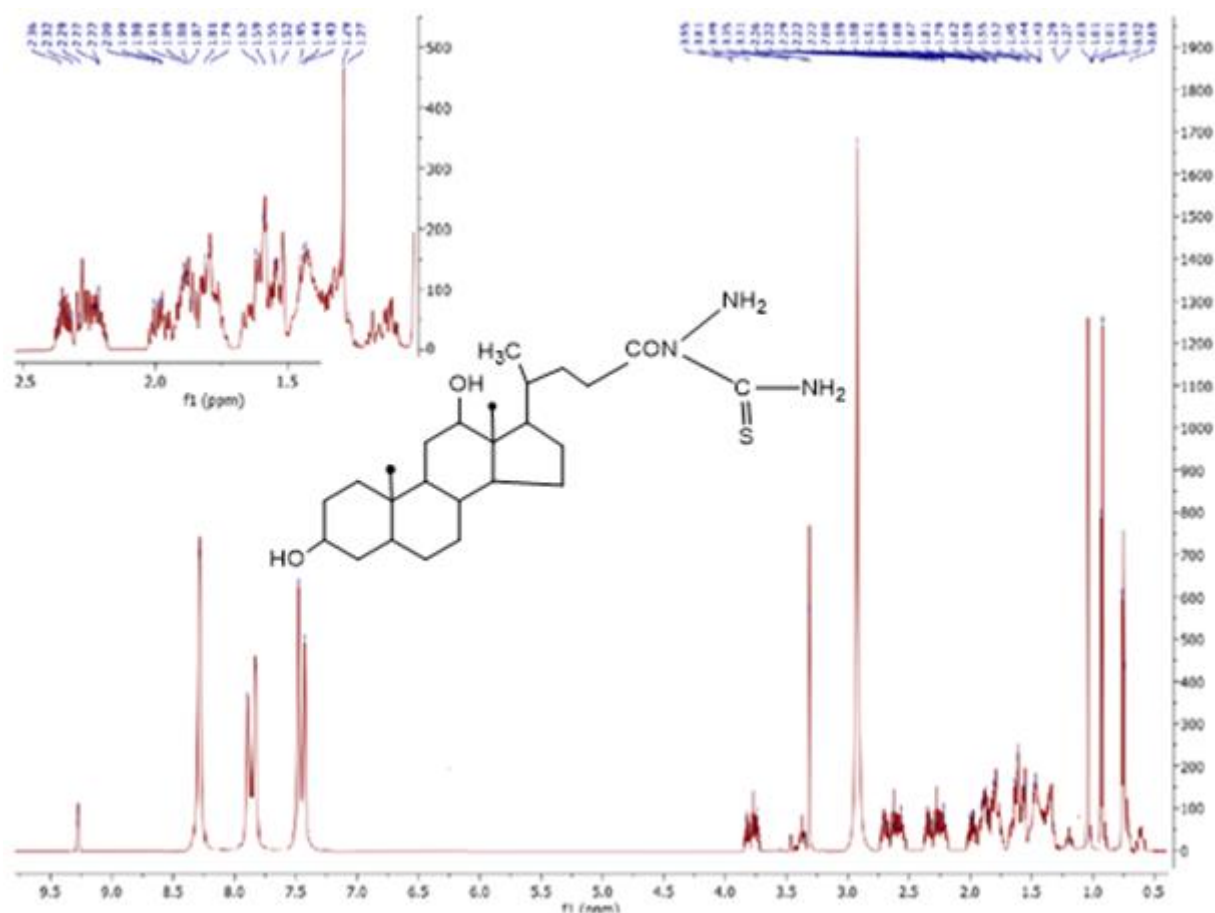


Рисунок 2.13 - ПМР-спектр соединения (XXXI) - тиосемикарбазида $3\alpha, 12\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты

Спектральные данные демонстрируют чёткое соответствие между наблюдаемыми сигналами и структурными элементами молекулы. Резонансы метильных групп C-18 и C-19 фиксируются в виде синглетов в интервале 0,60–0,70 м.д., в то время как синглет при 0,95 м.д. относится исключительно к метильной группе у атома C-21. Характерные синглетные сигналы в диапазоне 0,82–0,85 м.д. генерируются протонами метильных групп боковой цепи, связанных с атомами C-26 и C-27. Комплекс мультиплетов, наблюдаемый в области 1,20–2,50 м.д., обусловлен вкладом метиленовых протонов, входящих в состав циклических фрагментов C-1–C-7 и C-11–C-14. Параллельно,

в спектральном промежутке 2,15–2,50 м.д. фиксируются мультиплетные сигналы, относящиеся к протонам ациклических метиленовых звеньев в цепочке С-20–С-23. Присутствие гидроксильных заместителей в структуре соединения надёжно устанавливается благодаря появлению характеристических пиков в зоне 3,65–4,05 м.д., которые с высокой степенью достоверности приписаны протонам ОН-групп при атомах углерода С-3 и С-12. Их ширина и химический сдвиг свидетельствуют о возможном участии гидроксильных протонов во внутримолекулярных водородных связях, что характерно для молекул с несколькими -группами. Сигналы протонов тиосемикарбазидного фрагмента NH–CS–NH–NH₂ наблюдаются в виде широких синглетов в области 7,10–7,35 м.д., подтверждая наличие функциональной группы тиосемикарбазида. Этиленовые протоны гидразидной группы проявляются в диапазоне 3,50–3,65 м.д., что указывает на конформационно правильное соединение бокового звена с стероидным ядром. Таким образом, ПМР-спектр тиосемикарбазида (XXXI) подтверждает строение молекулы, целостность стероидного ядра, присутствие гидроксильных групп и тиосемикарбазидного фрагмента.

Анализ масс-спектра соединения (XLII) - 6-хлор-2-метилбензо(β) тиофен-1,1-диоксид-гидразида 3 α , 7 α , 12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты - действительно служит критически важным инструментом для всесторонней структурной верификации. Метод позволяет не только подтвердить расчётную молекулярную массу гибридной молекулы, но и получить информацию о её фрагментации, подтверждающую наличие ключевых структурных блоков (рисунки 2.14).

В масс-спектре наблюдается молекулярный ион [M]⁺ 634.28 (100.0%), 635.29 (35.7%) m/z 636.28 (32.0%), 637.28 (11.4%), 636.29 (6.2%), 636.28 (4.5%), 638.29 (2.0%), 637.28 (1.6%), 638.28 (1.4%), 636.29 (1.2%), соответствующие расчётной молекулярной массе соединения, что подтверждает успешный синтез целевого гидразидного производного. Интенсивность пика молекулярного иона указывает на достаточную стабильность молекулы в условиях электронного ионизационного источника.

Sample_1_100x_pos #1-44 RT: 0.01-1.01 AV: 44 NL: 3.11E4
T: FTMS +p ESIFull ms [150.00-2000.00]

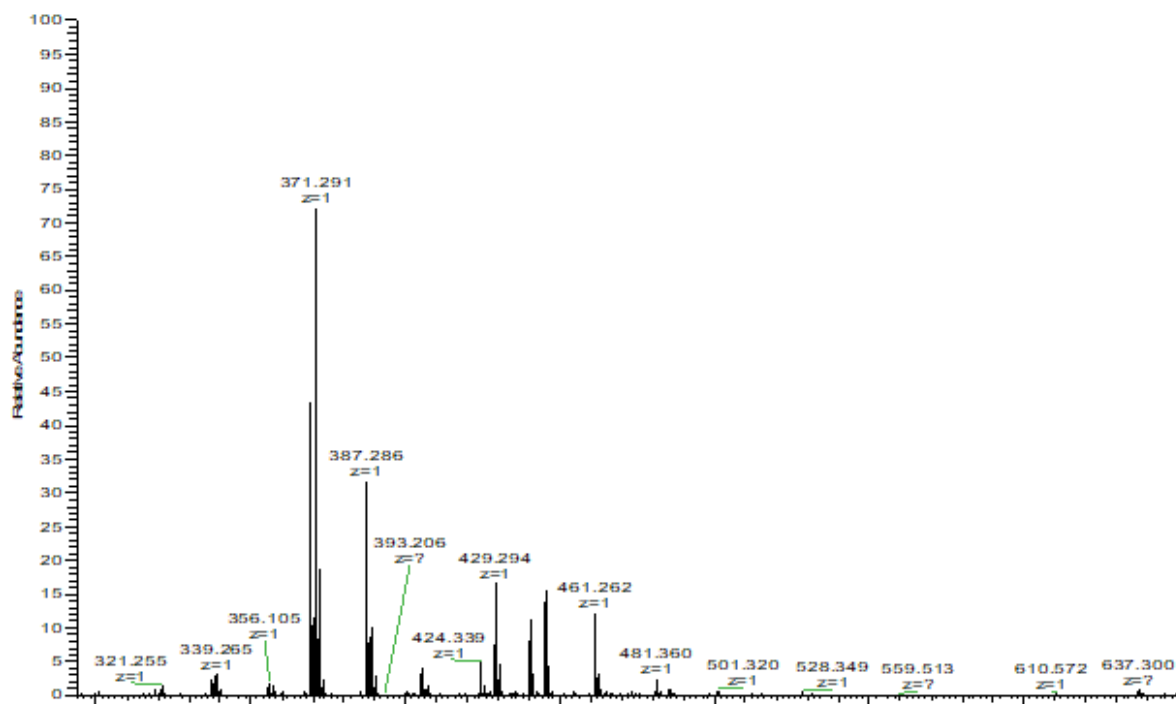


Рисунок 2.14 - Масс-спектр соединения (XLII) - 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразида $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты

Анализ картины фрагментации в масс-спектре рисунка 2.14 предоставляет серию диагностических пиков, соответствующих последовательному отщеплению ключевых функциональных групп. Наблюдаемое распределение ионов включает сигналы, чьи значения m/z указывают на характерные потери гидроксильных радикалов ($-OH$), а также на элиминирование ацильных фрагментов или частичное разрушение структуры тиюфенового гетероцикла. Особую информационную ценность представляют чётко регистрируемые пики, соответствующие отрыву одного или нескольких атомов водорода именно от гидроксильных групп, локализованных у атомов углерода C-3, C-7 и C-12, что служит прямым масс-спектрометрическим подтверждением не только наличия, но и точного положения гидроксильных заместителей в молекуле.

Пики фрагментации также включают фрагменты, характерные для 6-хлор-2-метилбензотиофенового звена, с m/z в диапазоне 120–150, что

подтверждает сохранность ароматического гетероциклического фрагмента после реакции нуклеофильного замещения. Появление этих пиков свидетельствует о том, что замещение водорода гидразидной группы прошло селективно и что хлор и метильные группы на ароматическом кольце остались нетронутыми.

Дополнительно в спектре наблюдаются малые пики, соответствующие возможной потере молекулы воды из гидроксильных групп или потере серо-содержащего фрагмента из тиафенового кольца. Эти пики позволяют судить о стабильности различных функциональных групп и выявляют наиболее слабые связи в молекуле.

Таким образом, масс-спектр (XLII) подтверждает молекулярную массу, целостность стероидного ядра, наличие гидроксильных групп на позициях C-3, C-7 и C-12, а также присутствие 6-хлор-2-метилбензотиафен-1,1-диоксида, что окончательно подтверждает успешность синтеза целевого гидразидного производного холановой кислоты. Эти данные служат основой для последующего анализа химической лабильности и биологического потенциала данного вещества, в частности, перспектив его использования в качестве антимикробного агента либо литолитического препарата.

На рисунке 2.15 зарегистрирован масс-спектр соединения (XL), представляющего собой 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразид 3α,7α-диацетокси-5β-холановой кислоты, данный спектр является источником данных для окончательного подтверждения его молекулярной архитектуры и изучения поведения при ионизации. Анализ спектра позволяет детально исследовать специфические пути фрагментации указанного соединения.

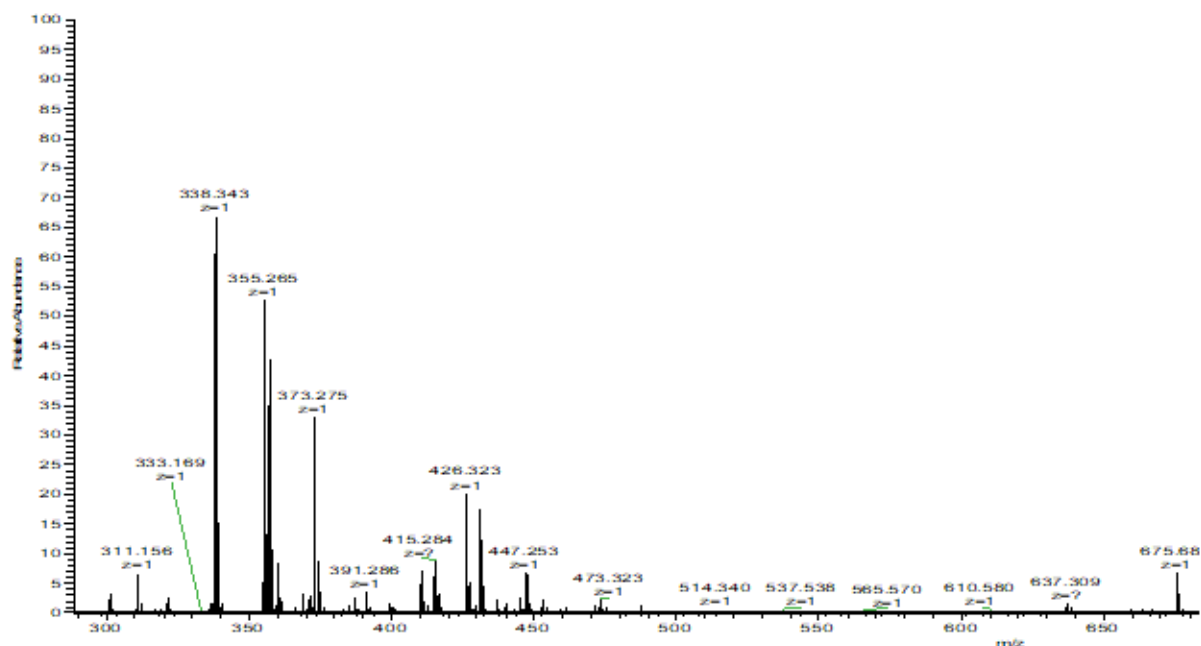


Рисунок 2.15 - Масс-спектр соединения (XL) - 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразида 3 α -ацетокси-7 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты

В спектре отчётливо наблюдается молекулярный ион $[M]^+$ 674.3 (100.0%) m/z 675.3 (38.9%), 676.3 (32.0%), 677.3 (12.4%), 676.3 (7.4%), 676.3 (4.5%), 678.3 (2.4%), 677.3 (1.8%), 678.3 (1.4%), 676.3 (1.2%), соответствующий расчётной молекулярной массе соединения, что свидетельствует о получении целевого продукта. Интенсивность молекулярного иона позволяет оценить стабильность молекулы в условиях электронного ионизационного источника, а также указывает на отсутствие значительной термической деградации. Фрагментация молекулы показывает характерные пики, которые позволяют идентифицировать функциональные группы. Так, наблюдаются пики, соответствующие потере одной или обеих ацетильных групп ($-\text{COCH}_3$) с C-3 и C-7. Эти пики свидетельствуют о стабильности основной структуры стероида и о корректной локализации ацетильных заместителей. Дополнительно, в спектре фиксируются фрагменты, характерные для 6-хлор-2-метилбензотиофенового кольца, с m/z в диапазоне 120–150. Эти пики подтверждают сохранность гетероциклического ароматического фрагмента после реакции

нуклеофильного замещения и селективность синтеза, при котором замещается только один атом водорода гидразидной группы. Также в спектре присутствуют малые пики, соответствующие потерям молекулы воды из гидроксильной группы на С-12 и частичной потере ацетильной группы, что отражает реакционную способность молекулы и слабые места в структуре. Фрагментация циклопентанофенантренового ядра проявляется в виде мультиплетов, соответствующих потерям метильных и метиленовых групп, что позволяет более точно подтвердить стерическую конфигурацию стероидного скелета.

Таким образом, масс-спектр соединения (XL) подтверждает молекулярную массу соединения, присутствие ацетильных групп на С-3 и С-7, гидроксильной группы на С-12 и 6-хлор-2-метилбензотиофенового фрагмента. Эти данные окончательно подтверждают правильность синтеза целевого гидразидного производного холановой кислоты и обеспечивают основу для дальнейшего изучения его химической реакционной способности и потенциальной биологической активности, включая возможности применения в качестве противомикробного или литолитического средства.

Анализ масс-спектра соединения (XXIX) показал, что кроме основной массы, были обнаружены в незначительном количестве также вторичные массы: $M^+ m/z$: 486.3 (100.0%), 487.3 (27.0%), 484.3 (4.5%), 488.3 (3.5%), 489.3 (1.2%), 487.3 (1.1%) (рисунок 16).

Наблюдаемые на рисунке 2.16 для соединения (XLII) сигналы в виде триплетов при 3,70 и 4,55 м.д. с высокой вероятностью соответственно относятся к протонам амидных NH –групп, которые присоединяются к группе $=C=O$, и к $-CH_2-$ группе, расположенной вблизи атома хлора.

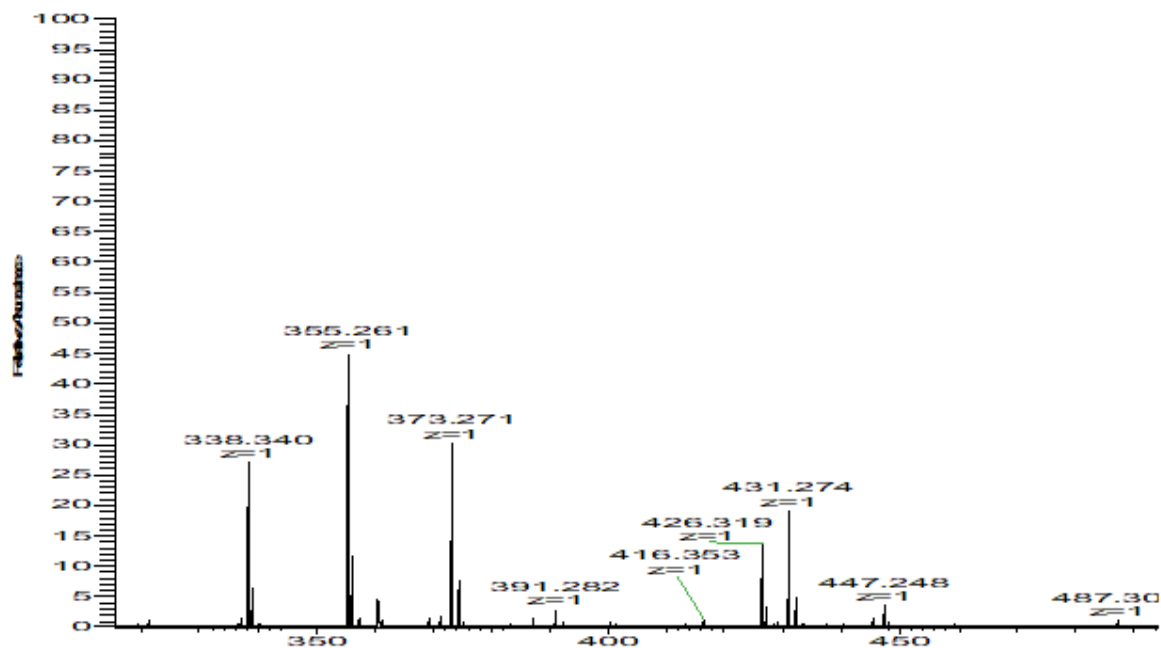


Рисунок 2.16 - Масс-спектр соединения (XXIX) - тиосемикарбазида $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты

Сигналы протонов ароматической системы бензольного фрагмента в молекуле (H_4, H_5, H_6, H_7) регистрируются в виде мультиплетов в области от 7,35 до 7,86 м.д., что соответствует их ожидаемому положению в спектре (см. рисунок 1).

В спектральной картине соединения (XLI) (см. рисунок 2.17) присутствует типичный резонансный пик при 2,27 м.д., однозначно указывающий на наличие метильных заместителей в составе изучаемой структуры. Сигналы протонов метильных фрагментов регистрируются в виде синглетных пиков, локализованных в интервалах 3,00 и 4,35 м.д. Протоны, принадлежащие ароматической системе бензольного фрагмента в молекулах холановых кислот, проявляются в диапазоне от 7,40 до 7,86 м.д.

На рисунках 2.10 и 2.14 представлены масс- и ПМР-спектры гидразидного производного - 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид- $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты – соединения (XL). Анализ спектра демонстрирует мультиплеты в области 6,75–7,86 м.д., соответствующие

протонам ароматического фрагмента, а также характерный сигнал в области 8,75 м.д., отнесённый к протону -группы гидразидного мостика.

При анализе масс-спектра и спектра ПМР соединения (XLII) фиксируется наличие характерного сигнала метильных протонов, проявляющегося в диапазоне от 2,10 м.д. до 7,66 м.д. (рисунок 2.5).

Как видно на рисунке 2.15, в спектроскопических данных (масс- и ПМР-спектр) для соединения (XLII) отчётливо определяется сигнал в области 2,20 м.д., который соответствует протонам метильной группы – CH_3 , локализованной в структуре молекулы 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразида 3α , 7α , 12α -тригидрокси- 5β -холановой кислоты.

Дополнительно регистрируются синглетные сигналы, относящиеся к протонам аминогруппы NH_2 , расположенные в области 6,50 м.д.. Ароматическая часть молекулы демонстрирует спектральные проявления в виде двух дублетов и одного синглета, которые наблюдаются в интервалах 7,55 м.д. и 7,70 м.д.

Для соединения (XXXI) масс-спектр и ПМР-спектр показывают наличие двух синглетов в области 2,75 м.д.. Сигналы, принадлежащие группе $\text{NH}_2\text{—NH}_2$, фиксируются в диапазоне 3,25 м.д. и 3,60 м.д., тогда как протон, связанный с -группой, проявляется в области около 8,0 м.д., что подтверждает наличие соответствующего функционального фрагмента в структуре.

При рассмотрении спектров протонного ядерного магнитного резонанса холановых кислот фиксируется проявление сигналов протонов H_4 , H_5 , H_6 , H_7 , относящихся к бензольному фрагменту молекулы. Эти резонансные пики регистрируются в области химических сдвигов δ 7,35–7,40 м.д., что подтверждает характерное распределение электронного окружения в ароматической системе.

Эта зона характерна для ароматических протонов, находящихся в условиях замещённого бензольного кольца, что соответствует типичной электронной плотности в фенильном фрагменте молекулы. Интенсивность и форма сигналов подтверждают, что эти протоны эквивалентны по окружению и

находятся в близкой пространственной позиции относительно функциональных групп, прикреплённых к стероидной цепи.

Количество водородных атомов, относящихся к этой части молекулы, оценивалось по интегральной кривой спектра, что позволило количественно соотнести наблюдаемые пики с теоретически предсказанными значениями для данных соединений. Интеграция сигналов показала соответствие числу протонов, что дополнительно подтверждает чистоту исследуемых соединений и правильность их структурной интерпретации.

Кроме того, анализ спин-спинового расщепления (J-куполы) показал характерные взаимодействия между соседними протонами в бензольной системе, что позволяет точно идентифицировать их положения на кольце. Сопоставление наблюдаемых химических сдвигов с литературными данными по подобным холановым кислотам подтверждает, что ароматическая часть молекулы сохраняет стандартную конфигурацию и не подверглась побочным замещениям.

Таким образом, комплексный анализ спектров ЯМР исследованных соединений (XXIX, XXX, XXXI, XL, XLI, XLII) позволяет не только подтвердить предполагаемое строение бензольного фрагмента, но и оценить электронные эффекты заместителей на кольцо, а также убедиться в корректности синтеза и чистоте полученных продуктов. Этот подход обеспечивает надёжную структурную характеристику холановых кислот и их производных, что имеет важное значение для дальнейшего изучения их биологической активности и применения в фармакологической практике.

ГЛАВА 3. ПОИСК ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ПОЛУЧЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Среди синтезированных нами соединений в ряду холановых кислот присутствуют следующие представители: $3\alpha,7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановая кислота; тиосемикарбазидное производное $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты; а также непосредственно $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановая кислота, которые подвергли углублённым лабораторным испытаниям, направленным на всестороннюю оценку их потенциальной биологической активности.

Для оценки их потенциала как фармакологически значимых веществ применялись современные методы газовой хроматографии, позволяющие точно определить содержание и чистоту холановых кислот в полученных соединениях.

Испытания включали изучение метаболических и биохимических свойств этих производных, с целью выявления их эффективности при лечении и диагностике жировой болезни печени (стеатоза). В рамках газохроматографического анализа исследовались как количественные показатели содержания холановых кислот, так и качественные изменения структуры молекулы, которые могли возникать в процессе синтеза или при взаимодействии с биологическими системами.

Полученные результаты показали, что ряд синтезированных соединений обладает выраженной селективной активностью, способной влиять на обмен липидов и стимулировать процессы детоксикации в печени. Отдельное внимание уделялось исследованию фармакокинетических параметров и способности соединений к связыванию с желчными кислотами, что имеет ключевое значение для терапии заболеваний печени, связанных с нарушением жирового обмена.

Таким образом, лабораторные испытания подтвердили, что новые производные холановых кислот не только соответствуют заявленной химической структуре, но и демонстрируют перспективные биологические свойства, способные послужить основой для создания инновационных гепатопротекторных

средств и диагностических препаратов. Полученные результаты формируют прочный фундамент для последующих доклинических и клинических этапов изучения, направленных на уточнение оптимальных режимов дозирования, раскрытие механизма фармакологического действия и выявление возможных терапевтических преимуществ при лечении НАЖБ.

3.1. Изучение токсичности и противомикробной активности некоторых тиосемикарбазидов холановых кислот

Медицинская наука современности сталкивается с одной из наиболее значимых задач - созданием высокоэффективных антибактериальных препаратов [142–143].

В рамках наших работ подробно представлены усовершенствованные методики синтеза стероидных производных холановых кислот, включающих гетероциклические фрагменты, и результаты этих подходов систематизированы в научных публикациях. Исследователи [144–145] пришли к выводу, что антимикробная активность соединений значительно возрастает при введении в их молекулярную структуру гетероциклических остатков.

На основании полученных данных в программу наших экспериментов включили изучение противомикробных свойств соединений: (XXIX) - тиосемикарбазида $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты и (XXX) - тиосемикарбазида $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты. Безопасность оценивали на животных, что подтвердило их потенциал для медицины. Использовано 30 мышей (24–26 г) и 25 крыс (120–140 г), что обеспечило высокую достоверность и репрезентативность полученных результатов

Проведённые токсикологические исследования показали, что максимально переносимая доза тиосемикарбазида $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты (соединения XXIX) - для белых мышей составляет МПД (100) 550 мг/кг, а значение ЛД₅₀ достигает 650 мг/кг. Критическая смертельная доза ЛД₁₀₀ для данного соединения фиксируется на уровне 1020 мг/кг, что демонстрирует пределы переносимости вещества при лабораторных испытаниях.

Установлено, что для тиосемикарбазидного производного 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (соединение XXX) величина ЛД₁₀₀ фиксируется на уровне 450 мг/кг, тогда как показатель ЛД₅₀ составляет 600 мг/кг; данные значения наглядно иллюстрируют дифференциацию токсикологических характеристик среди изученных аналогов. При этом летальная доза (ЛД₁₀₀) для данного вещества достигает 980 мг/кг.

При 70-дневном подкожном введении 0,014 г/кг соединений XXIX и XXX крысам отклонений не выявлено. Патологоанатомически изменений в печени, селезёнке, почках, мышцах, надпочечниках, лимфоузлах нет.

Сводная информация по сравнительной оценке безопасности соединений XXIX и XXX (тиосемикарбазидов 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холановой и 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислот) с референс-препаратом этонием (антимикробное, антисептическое средство) при подкожном введении лабораторным мышам представлена в таблице 3.1.

Таблица 3.1 - Сравнительный анализ токсикологических характеристик соединений XXIX и XXX и эталона (этония) у лабораторных животных

Соединения	Токсикологические характеристики (мг/кг)		
	МПД	ЛД ₅₀	ЛД ₁₀₀
XXIX	550	650	1020
XXX	450	600	980
Этоний	265	510	990

Антимикробную активность соединений XXIX и XXX определяли *in vitro* методом разведений на полевых штаммах стафилококка, нокардии, пастереллы, коринебактерий от животных с респираторными инфекциями. Сравнение с этонием проведено в трёх опытах (таблица 3.1).

Диапазон минимальных подавляющих концентраций для соединения (XXIX) в отношении стафилококковых культур зафиксирован на уровне 72–107 мкг/мл; для нокардий этот показатель варьировался от 120 до 200 мкг/мл; коринебактерии подавлялись при 90–110 мкг/мл, а пастереллы - при 70–90 мкг/мл, что свидетельствует о разнообразии антибактериального спектра

данного вещества. Для соединения (XXX) установлены следующие интервалы значений: стафилококки - 80–120 мкг/мл, нокардии - 130–225 мкг/мл, корине-бактерии - 115–135 мкг/мл, пастереллы - 90–115 мкг/мл [146].

Таблица 3.2 подтверждает: оба соединения бактерицидны в отношении указанных штаммов и сопоставимы по эффективности с этонием [146].

Таблица 3.2 - Бактерицидность соединений: XXIX - тиосемикарбазида 3 α , 7 α , 12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты и XXX - 3 α , 7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (в мг/мл)

Соединения	Виды бактерий			
	Стафило- кокки	Нокардии	Корин-бакте- рии	Пастереллы
XXIX	0.073-0.108	0.12-0.20	0.09-0.11	0.07-0.09
XXX	0.08-0.12	0.13-0.125	0.115-0.135	0.09- 0.12
Этоний	0.030-0.067	0.067-0.133	0.067-0.133	0.193-0.442

По итогам выполненного экспериментального цикла всестороннему анализу подверглись две важнейшие биологические характеристики, присущие некоторым гидразидным производным холановых кислот, - их острая токсичность и антимикробный потенциал. В роли репрезентативных модельных образцов выступили соединение XXIX, представляющее собой тиосемикарбазид 3 α , 7 α , 12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты, и соединение XXX - тиосемикарбазид 3 α , 7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты.

3.2. Оценка гепатопротективного и холелитолитического потенциала пропан-1,2-диолового эфира 3 α , 7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты

В современной органической и фармацевтической химии одним из ключевых векторов развития остаётся поиск лекарственных средств, которые сочетают в себе ряд важнейших характеристик: высокую эффективность, избирательность действия, продолжительный терапевтический эффект, безопасность для организма.

Изучен пропан-1,2-диоловый эфир 3 α , 7 β -дигидрокси-5 β -холановой

кислоты. Он подавляет липиды, повышает фосфолипиды в желчи и крови, снижает холестерин и триглицериды, увеличивает содержание холановых кислот. Это позволило исследовать его гепатопротекторное и холелитолитическое действие при экспериментальном холелитиазе.

В опытах использованы 20 хомяков (55–70 г) и 25 крыс (140–205 г). Проведено 25 серий опытов, свыше 50 анализов биологических образцов. Образцом в исследовании являлся эфир $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановой кислоты. Количественные биохимические показатели в сыворотке крови определяли методом газожидкостной хроматографии - измеряли холестерин, холановые кислоты, жирные кислоты, активность АсАТ, АлАТ, ЩФ.

При гиперинсулинизме в жировой ткани активируется липолиз, что приводит к массивному высвобождению свободных жирных кислот. В печени при этом наблюдается замедление окислительных процессов, что провоцирует накопление триглицеридов в гепатоцитах. Подобная метаболическая дисфункция создаёт предпосылки для развития жировой болезни печени. Пропан-1,2-диоловый эфир $3\alpha,7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты демонстрирует выраженный защитный эффект при воздействии агрессивных кислотных агентов. Продуктом такого взаимодействия становятся надмолекулярные структуры — смешанные мицеллярные структуры. Их основное назначение сводится к элиминации деструктивного воздействия токсичных кислот на барьерные свойства клеточных мембран. Уникальная способность соединения формировать двойной молекулярный слой (растворимый одновременно в липидной и водной среде) обеспечивает его высокое сродство к клеточным мембранам. Благодаря этому мицеллы встраиваются в мембраны, не вызывая их разрушения. Кроме того, пропан-1,2-диоловый эфир $3\alpha,7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты обнаруживает выраженное защитное действие: внедряясь в структуру клеточных мембран, он нейтрализует деструктивный эффект существующих токсичных мицеллярных агрегатов. Данный феномен сопровождается двумя ключевыми последствиями: уменьшением площади воспалительного очага и ингибированием цитолиза - гибели гепатоцитов.

На инбредных мышах с литогенной диетой изучали действие эфира в дозе 25 мг/кг/сутки (при стандартной дозе УДХК 14 мг/кг/сутки). Курс - 2 месяца, что позволило обеспечить необходимую временную базу для регистрации долгосрочных эффектов.

Итоги экспериментальной серии зафиксировали улучшение биохимии: нормализация высших жирных и желчных кислот; полное растворение желчных камней у всех животных.

Метод ГЖХ подтвердил преимущество исследуемого эфира перед УДХК по гепатопротекции и литолизу - камни растворялись быстрее и эффективнее. Хроматография показала, что под действием эфира растёт уровень $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты в желчи и сыворотке, стимулируется синтез ненасыщенных жирных кислот, снижается образование насыщенных, увеличивается содержание фосфолипидов.

Таким образом, полученные данные демонстрируют выраженный гепатопротективный и холелитолитический потенциал пропан-1,2-дионового эфира $3\alpha, 7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты. Его активность превосходит эффекты урсодезоксихолевой кислоты как по нормализации биохимических показателей, так и по скорости растворения желчных камней.

3.3. Применение газохроматографического анализа холановых и жирных кислот в диагностике жировой болезни печени

Литературные данные указывают на дефицит сведений о распределении холановых кислот в желчи и плазме при ЖКБ, особенно их динамики на стадиях литогенеза и при других патологиях печени. Слабо изучены соотношения кислот в биосредах и в составе камней.

Соответственно, возникает необходимость создания точных методик для определения уровней холестерина, холановых и жирных кислот у пациентов с нарушениями функции печени, а также исследования их концентрационных изменений под действием лекарств, поскольку такие методы способны существенно повысить качество диагностики и контроль эффективности

терапии.

Наше исследование направлено на разработку усовершенствованного подхода к анализу холановых кислот. Мы ставим задачу создать методику, которая, в сопоставлении с имеющимися аналогами, обеспечит более высокую прецизионность и информационную ёмкость при количественном определении содержания основных представителей ряда холановых кислот:

- 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты,
- 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты,
- 3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты,
- 3 α ,7 α ,12 α -трикетто-5 β -холановой кислоты,
- 3 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты.

Метод должен быть простым и малозатратным [147–151]. Внутренний стандарт - метиловый эфир 3 α ,7 α -дигидрокси-12-кетто-5 β -холановой кислоты. Принципиальным достижением стала оптимизация режимов количественного анализа желчных кислот, а также создание прикладного алгоритма интерпретации получаемых результатов для целей диагностики стеатоза печени. Совокупность предложенных решений обладает признаками научной новизны, поскольку в литературе аналогичные разработки до настоящего момента не фигурировали.

Согласно [148], свободные жирные кислоты играют ключевую роль в патогенезе стеатоза: они высвобождаются из висцерального жира, через воротную вену попадают в печень и кровоток, нарушают функцию инсулиновых рецепторов, усиливая инсулинорезистентность. В печени избыток жирных кислот стимулирует триглицеринов и липопротеидов, повышая их уровень в крови. Это создаёт условия для развития жировой болезни печени.

Традиционные лабораторные показатели дают лишь частичное представление о механизмах развития заболевания, не отражая всей сложности метаболических нарушений. В научной литературе описан альтернативный подход к диагностике жировой болезни печени [149–150], основанный на оценке метаболизма холановых кислот. Суть метода заключается в анализе

способности печени очищать портальную кровь от циркулирующих холатов. При развитии патологии наблюдается выраженное повышение общего количества холановых кислот, что служит индикатором нарушения нормальной работы органа.

В основе рассматриваемой научной работы лежит представление о том, что доминирующим патогенетическим механизмом развития ожирения служит избыточная аккумуляция холестерина, а также жирных и холановых кислот в гепатоцитах. Однако данный подход имеет ограничения для диагностики жировой болезни печени: отсутствуют данные о содержании отдельных холановых кислот в сыворотке пациентов, не учитываются холиеновые кислоты и избыток холестерина - предшественника первичных холановых кислот. Перечисленные пробелы закономерно минимизируют диагностический потенциал применяемых в настоящее время аналитических подходов.

Исходя из вышеизложенного, основная цель настоящего исследования формулируется как поиск и обоснование новых методологических подходов к количественному определению холановых кислот в биологических субстратах. Приоритетной задачей выступает разработка аналитической методики, которая, в сопоставлении с традиционными диагностическими средствами, будет характеризоваться повышенной прецизионностью и расширенной информационной ёмкостью при идентификации и количественной оценке индивидуальных представителей холановых кислот, а именно:

- 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты,
- 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты,
- 3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты,
- 3 α ,7 α ,12 α -трикетто-5 β -холановой кислоты,
- 3 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты.

Для методики важны простота выполнения и невысокая трудоёмкость, что позволит внедрить метод в рутинную клиническую практику повысить точность постановки диагноза [151].

Холановые кислоты в сыворотке определяли на газовом хроматографе

«Хром 5» (программирование температуры) [152].

Известно, что в случае метаболического нарушения в жировой ткани происходит активация ферментов гидролиза триглицеридов. Этот процесс приводит к массивному высвобождению свободных жирных кислот в системный кровоток. Повышенная концентрация СЖК стимулирует усиленный синтез холестерина, а впоследствии - образование его производных, в том числе холановых кислот. Избыточное накопление отдельных фракций жирных и холановых кислот оказывает выраженное токсическое воздействие на клеточные мембраны. Особую роль играет взаимодействие свободных жирных кислот с альбумином: при их связывании происходит высвобождение билирубина. Последний, в свою очередь, потенцирует повреждающее действие холановых кислот на клетки, усугубляя цитотоксический эффект. Ключевым звеном метаболизма холестерина является его трансформация в холановые кислоты, которая протекает непосредственно в гепатоцитах. Данная функция относится к числу наиболее важных и характерных для гепатоцитов. Поэтому содержание холановых кислот в сыворотке крови при заболеваниях печени является надёжным показателем, отражающим изменения в их биосинтезе. Анализ качественного и количественного состава этих соединений даёт содержательную информацию о работе печёночных клеток. На основе полученных данных можно: судить об активности обменных процессов в печени; обнаруживать начальные проявления гепатоцеллюлярной недостаточности; наблюдать за развитием патологических состояний печени во времени.

Предложенный новый диагностический метод предусматривает включение количественного определения жёлчных кислот в комплекс обследования пациентов с подозрением на жировой гепатоз. Основные преимущества метода заключаются в его научной новизне, меньшей трудоёмкости по сравнению с традиционными способами и относительно низкой стоимости проведения исследования.

Предлагаемый диагностический подход базируется на количественном определении содержания холановых кислот в сыворотке крови у пациентов с

жировой болезнью печени посредством газожидкостной хроматографии. Полученные в ходе анализа данные обладают высокой клинической информативностью и могут выступать в роли дополнительного верифицирующего критерия при уточнении клинического диагноза, расширяя возможности стандартных лабораторных исследований.

Применение метода позволяет выявлять специфические изменения в профиле холановых кислот, оценивать степень метаболических нарушений в печени и получать объективные количественные показатели, необходимые для мониторинга течения заболевания.

В качестве примера на рисунке 3.1 представлена хроматограмма, демонстрирующая пики метиловых эфиров холановых кислот в сыворотке крови здоровых людей.

Ключевое преимущество предлагаемого диагностического подхода к диагностике жирового гепатоза заключается в исключительной чувствительности анализа, ориентированного на количественное определение холановых кислот. Принципиально важным обстоятельством выступает тот факт, что сдвиги в концентрации данных соединений в сывороточном русле регистрируются на более ранних этапах по сравнению с изменениями иных маркеров, характеризующих работу печени. Это позволяет выявлять патологические процессы на более ранних стадиях и повышает диагностическую ценность метода.

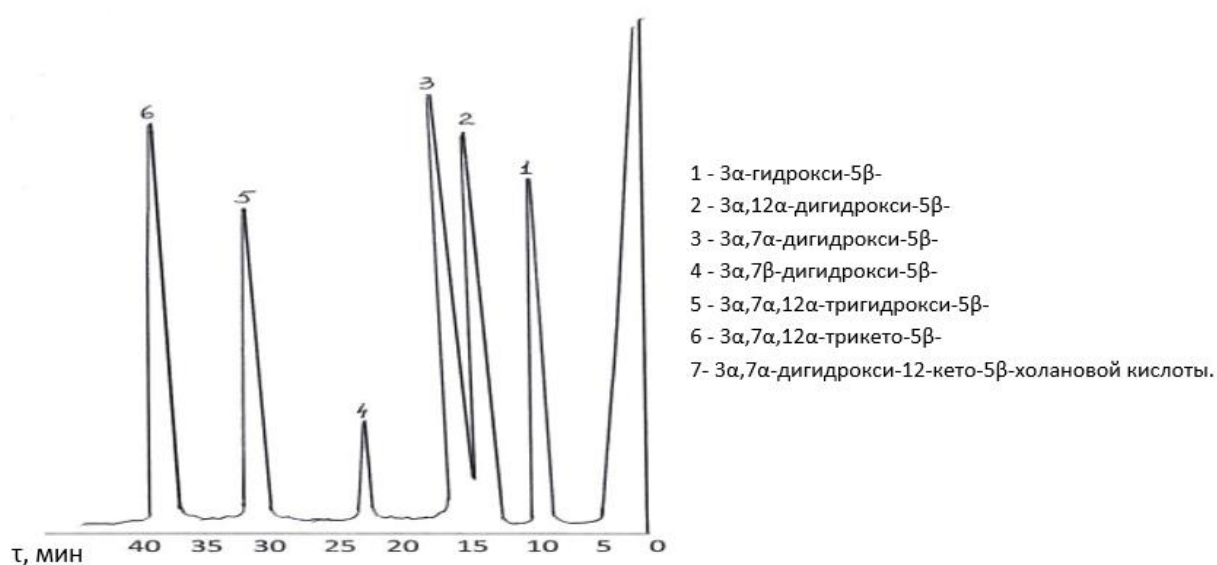


Рисунок 3.1 – Хроматограмма, полученная при анализе контрольной смеси метиловых эфиров холановой кислоты

Количественные показатели и соотношение отдельных фракций холановых кислот служат объективным индикатором функционального состояния гепатоцитов. Их значения варьируются в зависимости от степени тяжести жировой болезни печени, что даёт возможность: отслеживать динамику патологического процесса; оценивать эффективность проводимой терапии; прогнозировать дальнейшее развитие заболевания.

С биохимической точки зрения холановые кислоты представляют собой конечный продукт метаболизма холестерина и главный путь его выведения. До 80% холестерина окисляется до холановых кислот. Их синтез идёт в гладком эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов из вновь синтезированного холестерина. Определение холановых кислот в сыворотке при жировой болезни печени клинически значимо: позволяет оценить метаболизм в печени и функциональное состояние гепатоцитов; служит инструментом мониторинга эффективности лечения.

Полученные в ходе исследования данные убедительно демонстрируют диагностическую значимость определения уровня холановых кислот - этот показатель может служить дополнительным критерием при верификации

жировой болезни печени. Статистически значимые различия в профиле холановых кислот у пациентов с разными формами патологии подтверждают информативность метода.

В процессе исследования был выполнен подробный анализ концентраций ключевых холановых кислот в сыворотке крови пациентов со стеатозом. Были получены следующие результаты:

- $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановая кислота: $0,42 \pm 0,08$ мг/мл;
- $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановая кислота: $0,092 \pm 0,01$ мг/мл;
- $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -трикето- 5β -холановая кислота: $0,013 \pm 0,002$ мг/мл;
- $3\alpha, 12\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановая кислота: $0,037 \pm 0,007$ мг/мл;
- 3α -гидроксихолановая кислота: $0,016 \pm 0,003$ мг/мл;
- $3\alpha, 7\beta$ -дигидрокси- 5β -холановая кислота: $0,096 \pm 0,014$ мг/мл;
- $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси-12-кето- 5β -холановая кислота: $0,41 \pm 0,070$ мг/мл,

что отражено в таблице 3.3.

При переходе патологического процесса в стадию стеатогепатита зафиксировано заметное повышение концентрации ряда холановых кислот: $3\alpha, 7\alpha$ -дигидроксихолановая - $+0,110 \pm 0,022$ мг/мл; $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -тригидроксихолановая - до 1,17 мг/мл; $3\alpha, 12\alpha$ -дигидроксихолановая - $+0,041 \pm 0,003$ мг/мл; $3\alpha, 7\alpha, 12\alpha$ -трикетохолановая - $+0,15 \pm 0,004$ мг/мл. Соответственно, по полученным результатам сделано заключение: при стеатозе и стеатогепатите суммарный уровень холановых кислот в сыворотке существенно повышен. Динамика изменений профиля холановых кислот соответствует прогрессированию заболевания - от стеатоза к стеатогепатиту. Количественные показатели отдельных фракций холановых кислот могут использоваться как объективные маркеры стадии патологического процесса.

На основании полученных данных построен график зависимости уровня холановых кислот от стадии НАЖБП (рисунок 3.2).

Таблица 3.3 - Показатели содержания холяновых кислот в сыворотке крови: контрольная группа (здоровые) и клинические группы (стеатоз печени, стеатогепатит) ($M \pm m$), мг/мл

Холяновые кислоты	Контрольная группа: здоровые (24 человека)	Клинические группы	
		со стеатозом (63 человека)	со стеатогепатитом (21 человек)
3 α -гидрокси-5 β -	0,0010 $\pm$ 0,0002	0,016 $\pm$ 0,003	0,038 $\pm$ 0,008
3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -	0,0033 $\pm$ 0,0003	0,037 $\pm$ 0,007	0,0041 $\pm$ 0,003
3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -	0,0066 $\pm$ 0,0005	0,092 $\pm$ 0,010	0,110 $\pm$ 0,022
3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -	0,0060 $\pm$ 0,0004	0,096 $\pm$ 0,014	0,115 $\pm$ 0,026
3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -	0,0068 $\pm$ 0,0005	0,420 $\pm$ 0,080	1,170 $\pm$ 0,090
3 α ,7 α ,12 α -трикетто-5 β -	0,0065 $\pm$ 0,0003	0,013 $\pm$ 0,002	0,015 $\pm$ 0,004
3 α ,7 α -дигидрокси-12-кетто-5 β -	0,0062 $\pm$ 0,0002	0,410 $\pm$ 0,070	1,140 $\pm$ 0,080
Σ холяновых кислот	0,036 $\pm$ 0,0024	0,706 $\pm$ 0,186	2,55 $\pm$ 0,233

Визуализация результатов чётко выявляет тенденцию: концентрация исследуемых соединений закономерно возрастает при прогрессировании патологии - от стадии стеатоза к стадии стеатогепатита. Согласно литературным источникам [153], холяновые кислоты связываются с жирными кислотами, образуя растворимые холиеновые кислоты. Они транспортируются в стенку кишечника, где в эпителии распадаются на исходные компоненты.

В составе растворимых молекулярных комплексов одновременно присутствуют холяновые и жирные кислоты. При этом их количественное соотношение характеризуется строгой стехиометрической зависимостью: в составе комплекса на один остаток жирной кислоты приходится фиксированное число молекул холяновой кислоты - от двух до четырёх.

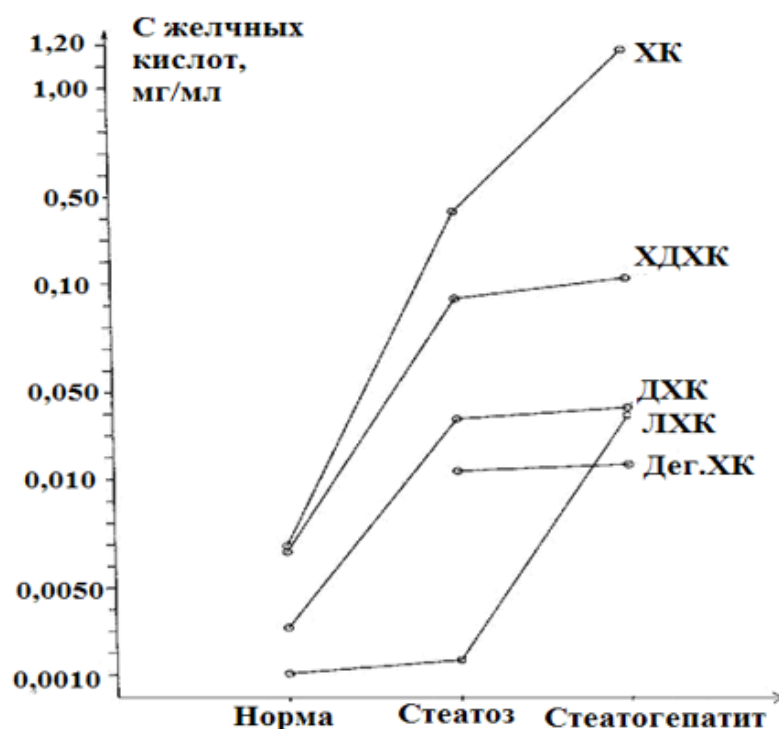


Рисунок 3.2 - Уровень холяновых кислот в сыворотке при НАЖБП в зависимости от тяжести патологии

Руководствуясь данной закономерностью, мы определили стратегический вектор последующей работы: приоритетное внимание уделено газохроматографическому профилированию высших жирных кислот в сыворотке крови; полученные количественные данные систематизированы в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Содержание жирных кислот в сыворотке у здоровых, больных НАЖБП и НАСГ (% от суммы, $M \pm m$)

Жирные кислоты	Кодовое обозначение	Здоровые (22 человека)	Клинические группы	
			НАЖБП	со стеатогепатитом (25 человек)
Пальмитиновая	$C_{(16:0)}$	$19,50 \pm 0,70$		$23,98 \pm 0,86$
Стеариновая	$C_{(18:0)}$	$9,50 \pm 0,55$		$12,59 \pm 0,73$
Олеиновая	$C_{(18:1)}$	$24,05 \pm 0,94$		$33,46 \pm 1,31$
Линолевая	$C_{(18:2)}$	$22,80 \pm 0,31$		$6,99 \pm 0,09$

Линоленовая	C _(18:3)	6,62±0,09		7,96±0,11
Арахидоновая	C _(20:4)	8,80±0,27		15,06±0,50
Сумма:				
Насыщенные		29±1,41		36,57±1,78
Мононасыщенные		24,05±1,04	33,31±1,3	33,46±1,31
Полиненасыщенные		38,22±1,69	28,82±1,22	30,01±1,32

В рамках выполненного исследования зафиксировано, что при жировой болезни печени усилен приток свободных жирных кислот в печень и снижено их окисление, что ведёт к накоплению триглицеридов в гепатоцитах. Анализ жирнокислотного состава триглицеридов показал следующее процентное распределение основных компонентов:

- пальмитиновая кислота - 23,65 ± 0,78%;
- стеариновая кислота - 15,06 ± 0,82%;
- олеиновая кислота - 33,31 ± 1,3%;
- линолевая кислота - 10,07 ± 0,13%;
- линоленовая кислота - 6,97 ± 0,08%;
- арахидоновая кислота - 11,78 ± 0,37% [157].

Опираясь на совокупность экспериментальных данных, разработан оригинальный диагностический алгоритм верификации жировой дистрофии печени. Предлагаемый метод базируется на газохроматографическом количественном анализе высших жирных кислот в сыворотке крови и входит в арсенал средств клинико-биохимической лабораторной диагностики. Его диагностический потенциал реализуется в трёх ключевых направлениях:

- в качестве прогностического критерия при оценке эффективности проводимой терапии гепатобилиарных заболеваний;
- как инструмент доклинического выявления метаболических расстройств на ранних стадиях;
- в роли метода объективного контроля за динамикой течения

патологического процесса.

При сопоставлении стандартных биохимических маркеров выявлено, что степень гиперферментемии (показатели АсАТ и АлАТ) не может служить достоверным индикатором степени тяжести поражения печени. Констатируется отсутствие значимой корреляционной связи между активностью аминотрансфераз и морфологическими проявлениями стеатоза либо фиброзной трансформации печёночной ткани [154].

Характерными биохимическими признаками жировой болезни печени являются: двукратное повышение активности гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТ) и аналогичное увеличение уровня щелочной фосфатазы (ЩФ).

Согласно литературным данным [155], альтернативным подходом к диагностике неалкогольной жировой болезни печени является исследование биоптата печени. Морфологический анализ позволяет выявить признаки стеатоза, свидетельствующие о нарушении регуляции синтеза и секреции триглицеридов. Однако следует подчеркнуть, что ключевые молекулярные механизмы данных процессов до настоящего времени изучены неполно и требуют дальнейшего уточнения.

Существенным ограничением морфологического метода является невозможность точного определения степени участия насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в развитии патологического процесса [156]. В частности, гистологическое исследование не позволяет дифференцировать вклад отдельных типов жирных кислот, установить их количественные соотношения в липидных включениях, либо осуществлять непрерывное отслеживание трансформаций показателей на последовательных этапах прогрессирования патологии.

Другой подход к диагностике жировой болезни печени - анализ липидного профиля сыворотки. Его обоснованность опирается на связь между избытком свободных жирных кислот в печени и развитием ожирения, а также стеатозных изменений. Современные данные [157] подтверждают, что гиперлипидемия свободных жирных кислот играет ключевую роль в патогенезе

заболевания, инициируя каскад метаболических нарушений.

Для более детального изучения жирнокислотного состава применяется газохроматографический метод с анализом метиловых эфиров жирных кислот. На рисунке 3.3 представлена хроматограмма, демонстрирующая спектр высших жирных кислот в исследуемом образце, относительные концентрации отдельных компонентов и особенности распределения насыщенных и ненасыщенных соединений.

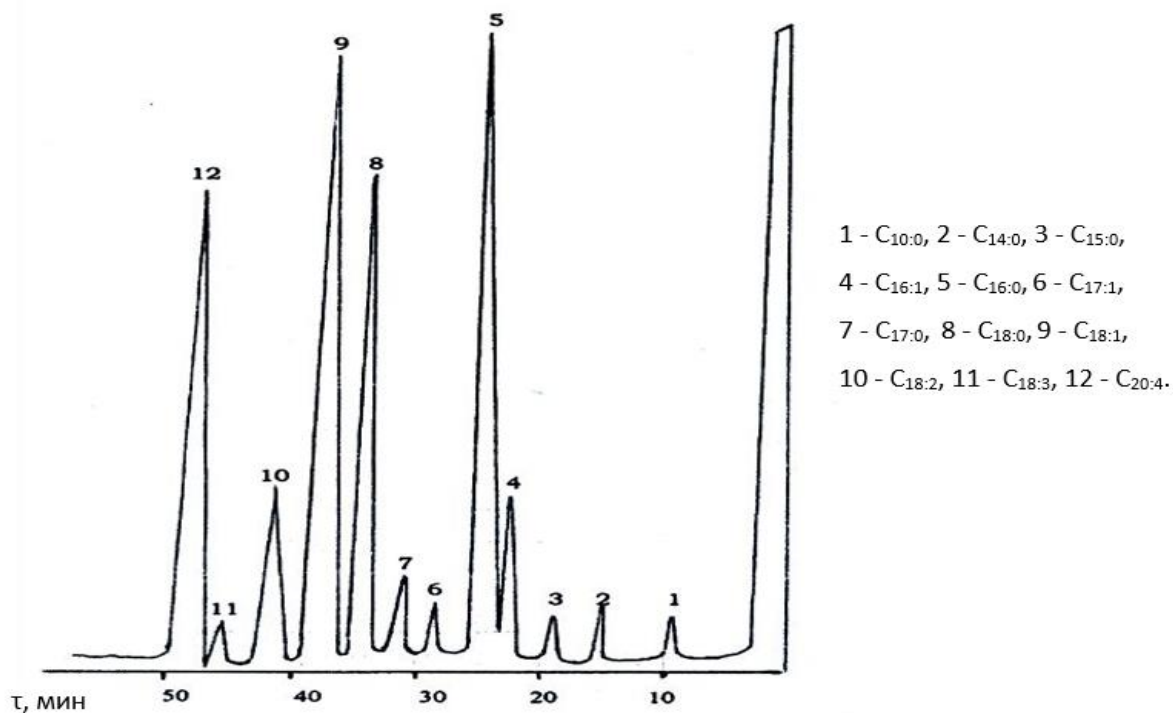


Рисунок 3.3 - Хроматограмма метиловых эфиров высших жирных кислот, выделенных из сыворотки крови здоровых лиц

Соответственно, основное направление проведённого исследования - это определение высших жирных кислот в сыворотке у больных НАЖБП методом ГЖХ. Полученные данные представляют собой дополнительный диагностический критерий, уточняющий диагноз. Полученные результаты подтверждают достоверность метода и обосновывают его применение как вспомогательного теста при НАЖБП. Соответственно, разработанная методика отличается высокой точностью и превосходит аналоги по ключевым параметрам. Её преимущества заключаются в высокой воспроизводимости

результатов, значительно меньшей продолжительности анализа и экономичном расходовании минимальных объёмов реактивов.

ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

4.1. Техника эксперимента, используемые реактивы и условия синтеза

ИК-спектры вышеуказанных производных холановых кислот были записаны как кристаллические образцы на спектрометр Spectrum 65 FT-IR (Perkin Elmer), который оснащен MIRACLE ATR (ZnSe) в Институте химии им. В. И. Никитина АН Республики Таджикистан. Каждый записанный спектр был получен в среднем на 16-20 сканирований, которые варьировались от 4000-600 см^{-1} с разрешением 4 см^{-1} . Перед измерением образцы были высушены для фонового спектра. Каждый записанный спектр был проанализирован и установлен с помощью программного обеспечения Perkin Elmer Spectrum, версии 10.03.07.

Спектры ^1H и ^{13}C -ЯМР были измерены в приборе Bruker AC-400: AC-300, AM-400, AMX-400 и 600 с рабочей частотой 300, 400 и 600 MHz в Техническом Институте физики и химии города Урумчи АН КНР и Университета L'Aquila в Италии. Химические сдвиги были измерены относительно тетраметилсилоксана (TМС) как внутреннего стандарта. Концентрация исследуемых образцов составляла 20 мг на 0.7 мл растворителя. В качестве растворителей были использованы CDCl_3 , DMSO-d_6 .

Молекулярная масса образцов была измерена прибором Finigal MAT 95 с чувствительностью 10 mA/мин. , с отсасывающим расщеплением от 3 до 4 kV и со скоростью расщепления 5 kV. Масс-спектры были измерены на приборе QTOF Ultima 3/Fa Mikromass (ESI-technique, LockSpray, PtG 1000 как реферант) в Техническом Институте физики и химии города Урумчи АН КНР.

Температура плавления образцов была измерена прибором для определения температуры плавления Boetus. Элементный анализ полученных соединений был проведен в микроаналитической лаборатории Университета L'Aquila в Италии.

Исследуемые соединения были синтезированы в лаборатории Химии гетероциклических соединений Института химии В. И. Никитина АН РТ и подверглись биологическому скринингу в Техническом Институте физики и

химии города Урумчи АН КНР и Институтом проблем биологической безопасности ТАСХН.

Чистота полученных соединений и ход прохождения реакций контролировали тонкослойной хроматографией на стандартных пластинках “SilufolUV-254” в системах бензол-дибутиловый эфир-бутанол-1 (2:1:1); бензол-дибутиловый эфир-этилацетат (2:1:1); толуол-этилацетат-диэтиловый эфир (2:1:1); бензол-дибутиловый эфир-изопропанол (5:2:1); толуол-дибутиловый эфир-этанол (3:2:1). Пятна на хроматографической пластинке рассматривали в камере с ультрафиолетовым излучением при длине волны 150-300 нм в йодной камере.

4.2. Синтез 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты [163]

К 3 л бычьей желчи добавляют 250 г NaOH, кипятят 18–20 ч в кварцевом сосуде, обеспечивая полный гидролиз конъюгированных желчных кислот. После подкисления образуется вязкая зелёная масса, затвердевающая до кристаллического состояния.

Твёрдый продукт измельчают, промывают водой, растирают в ступке, сушат в эксикаторе над H_2SO_4 (6–8 суток) до порошкообразного состояния. Затем смешивают с абсолютным этанолом в объёме, равном исходной навеске.

Через 2 суток смесь фильтруют под вакуумом. Твёрдый остаток кипятят в 600 мл метанола до появления осадка, который отделяют; фильтрат используют для выделения 3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты. Осадок перекристаллизовывают из метанола, кристаллы отделяют и сушат до постоянной массы.

Конечные данные опыта:

Выход 40 грамм (87%). $T_{пл.}=198-199$ градусов Цельсия.

Соединение имеет формулу $C_{24}H_{40}O_5$, для которой:

найдено: C - 70,57%, H - 9,86%,

вычислено: C - 70,58%, H - 9,80%.

4.3. Синтез 3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты [163]

Метанольный фильтрат, собранный после отделения кристаллического продукта, упаривают до половины исходного объёма, в результате чего из концентрированного раствора выпадает дополнительная порция осадка. Выделенное твёрдое вещество отфильтровывают и подвергают многократной перекристаллизации из метанола с целью достижения высокой степени чистоты. Полученный белый кристаллический порошок тщательно осушают в эксикаторе над безводным хлоридом кальция до полного удаления следов растворителя и влаги.

Конечные данные опыта:

Выход 12 грамм (75%). $T_{пл.}=177-178$ градусов Цельсия.

Соединение имеет формулу $C_{24}H_{40}O_4$, для которой:

найденно: C - 73.39%, H - 10.16%,

вычислено: C - 73.36%, H - 10.18%.

4.4. Синтез 3 α -гидрокси-5 β -холановой кислоты [163]

Берут 8 г 3 α -гидрокси-12-кетохолановой кислоты и соединяют её с 2,5 г гидразингидрата (82%), после чего добавляют 4,6 г раствора гидроксида калия, предварительно растворённого в 25 мл этиленгликоля, кипятят 2 ч с обратным холодильником. Затем переключают на нисходящий холодильник, отгоняют гидразингидрат с водой до 195°C и выдерживают до прекращения выделения N_2 .

Охлаждённую массу разбавляют 1:1 водой, подкисляют HCl до pH=3, экстрагируют бензолом или этилацетатом. Экстракт промывают, сушат Na_2SO_4 , упаривают, остаток перекристаллизуют из этанола.

Конечные данные опыта:

Выход 7.0 грамм (86%). $T_{пл.}=184-185$ градусов Цельсия.

Соединение имеет формулу $C_{24}H_{40}O_3$, для которой:

найденно: C - 76.53%, H - 10.61%.

вычислено: C - 76.59%, H - 10.63%.

4.5. Синтез 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты [163]

В колбу с обратным холодильником загружают 10 г 3 α ,7 α -диацето-12-кетометилхолата, добавляют 3,5 г гидразингидрата и 6,5 г КОН в 28 мл этиленгликоля. Кипятят 2,5 ч, затем переключают на нисходящий холодильник, отгоняют гидразин с водой до 195°C и выдерживают до прекращения выделения N_2 .

По завершении реакции реакцию смесь охлаждают до комнатной температуры, охлаждённую смесь разбавляют водой 1:1, подкисляют HCl до pH=3 и многократно экстрагируют этилацетатом. Экстракт промывают водой, сушат Na_2SO_4 , упаривают. Остаток перекристаллизовывают из этанола.

Конечные данные опыта:

Выход 8.0 грамм (68%). $T_{пл.}$ =140-141 градусов Цельсия.

Соединение имеет формулу $C_{24}H_{40}O_4$, для которой:

найденно: C - 73.31%, H – 10.12%,

вычислено: C - 73.36%, H – 10.18%.

4.6. Синтез 3 α ,7 α ,12 α -трикетто-5 β -холановой кислоты

На первой стадии синтеза 7 г (0,0134 моль) 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты растворяют в 250 мл ледяной уксусной кислоты. В полученный прозрачный раствор при перемешивании постепенно вводят 30,5 г (0,14 моль) хромата калия (K_2CrO_4), предварительно растворённого в 90 мл дистиллированной воды. Реакционную смесь выдерживают при комнатной температуре (25°C) в течение 24 часов, создавая условия для протекания окисления в мягком температурном режиме.

По завершении выдержки реакцию массу разбавляют водой до момента появления характерного помутнения, свидетельствующего о выпадении твёрдого продукта. Осадок отделяют фильтрованием и многократно промывают водой до достижения нейтрального значения pH = 7. Выделенный твёрдый продукт подвергают перекристаллизации из этилового спирта, благодаря

чему удаётся получить очищенное кристаллическое соединение с высокой степенью чистоты.

Конечные данные опыта:

Выход 4.8 грамм (96%). $T_{пл.}=237-238$ градусов Цельсия.

Соединение имеет формулу $C_{24}H_{34}O_5$, для которой:

найдено: $C - 71.06\%$, $H - 9.97\%$,

вычислено: $C - 71.09\%$, $H - 9.95\%$.

4.7. Синтез метилового эфира 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты [50]

В колбу вносят 80 г (0,21 моль) 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты, растворяют в 250 мл метанола, добавляют 4 мл конц. HCl. Смесь кипятят с обратным холодильником и хлоркальциевой трубкой 20 мин, затем оставляют на ночь при комнатной температуре, позволяя системе достичь равновесия и завершить протекание побочных реакций. На следующий день содержимое фильтруют для отделения твёрдой фазы, а затем высушивают при 100°C в термостате. Выделенный продукт подвергают перекристаллизации из метанола, получая очищенное кристаллическое соединение с высокой степенью чистоты.

Конечные данные опыта:

Выход 98.0 грамм (93%). $T_{пл.}=156-157$ °C.

Соединение имеет формулу $C_{25}H_{42}O_5$, для которой:

найдено: $C - 73.81\%$, $H - 10.39\%$,

вычислено: $C - 73.89\%$, $H - 10.34\%$.

По аналогичной синтетической схеме были получены метиловые эфиры ряда дополнительных холановых кислот, соответствующих соединениям, обозначенным как VI, VII, VIII, IX и X. Получение указанных веществ осуществлялся в идентичных условиях, что обеспечивало воспроизводимость результатов и позволило выделить целую серию метиловых эфиров с высокой степенью чистоты.

4.8. Синтез метилового эфира 3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты

В колбу на 50 мл вносят 0,4 г (0,00125 моль) 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты, 30 мл безводного метанола и каплю H_2SO_4 (конц.). Кипятят 2,5–3 ч, охлаждают, экстрагируют эфиром (3 раза по 50 мл). Экстракт промывают водой до pH=7, сушат Na_2SO_4 . После удаления влаги раствор фильтруют, а затем испаряют органический растворитель до сухого остатка.

Конечные данные опыта:

Выход 0.42 грамма (88%). $T_{пл.}=75-76\text{ }^{\circ}C$.

Соединение имеет формулу $C_{25}H_{42}O_4$, для которой:

найденно: C – 73.85%, H – 10.39%,

вычислено: C – 73.89%, H – 10.34%.

В соответствии с описанной выше методикой были синтезированы и выделены дополнительные сложноэфирные производные на основе 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты, а именно соединения, обозначенные как XI, XII, XIII, XIV и XV. Условия проведения реакций, а также приёмы выделения и очистки целевых продуктов полностью воспроизводили параметры, отработанные при получении предыдущих аналогов.

4.9. Синтез метилового эфира 3 α ,7 α ,12 α -трикетто-5 β -холановой кислоты

В круглодонную колбу вместимостью 50 мл помещают 0,5 г (0,0008 моль) 3 α ,7 α ,12 α -трикеттохолановой кислоты, 15 мл безводного MeOH и каплю конц. H_2SO_4 . Кипятят 2,5–3 ч, охлаждают, экстрагируют эфиром (3 раза по 30 мл). Объединённые эфирные вытяжки промывают водой до достижения нейтрального значения pH (около 7), после чего высушивают над безводным сульфатом натрия (Na_2SO_4). Далее проводят фильтрацию для удаления твёрдых частиц, а затем испаряют органический растворитель, получая сухой остаток продукта.

Конечные данные опыта:

Выход 0.26 грамм (95%). $T_{пл.}=241-242\text{ }^{\circ}C$.

Соединение имеет формулу $C_{25}H_{36}O_5$, для которой:

найдено: $C - 72.19\%$, $H - 8.55\%$,

вычислено: $C - 72.11\%$, $H - 8.65\%$.

Аналогично синтезированы эфиры $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикетохолановой кислоты - соединения XVII–XX. Условия проведения реакций, включая температурный режим, продолжительность и способы выделения, полностью соответствовали параметрам, использованным при синтезе предыдущих аналогов.

4.10. Получение гидразида $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты

В колбу на 50 мл вносят 4 г (0,010 моль) пропилового эфира $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидроксихолановой кислоты, 22 мл пропилового спирта, 2,2 мл гидразин-гидрата. Кипятят 6 ч, упаривают, конечный продукт перекристаллизовывают из метанола.

Конечные данные опыта:

Выход 4.2 грамма (86%). $T_{пл.} = 120-121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Соединение имеет формулу $C_{24}H_{42}N_2O_4$, для которой:

найдено: $C - 68.27\%$, $H - 9.91\%$,

вычислено: $C - 68.24\%$, $H - 9.95\%$.

4.10.1. Получение 6-хлор-2-метилбензо(b)тиофен-1,1-диоксид-гидразида $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ - тригидрокси- 5β -холановой кислоты

В трёхгорлую колбу с мешалкой и обратным холодильником загружали 0,8 г (0,00158 моль) гидразида $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидроксихолановой кислоты, 0,38 г (0,00158 моль) 3,6-дихлор-2-метилбензо(b)тиофен-1,1-диоксида и 2,5 мл сухого пиридина. Смесь нагревали при $80-85^{\circ}\text{C}$ (3–3,5 ч) при перемешивании. По окончании выливали на 100 г льда, осадок отфильтровывали, промывали водой до $pH=7$ и сушили на воздухе.

Конечные данные опыта:

Выход 0.8 грамм (88%). $T_{пл.} = 165-166\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Соединение имеет формулу $C_{33}H_{42}ClN_2O_5S$, для которой:

найдено: $C - 64.68\%$, $H - 6.81\%$,

вычислено: $C - 64.65\%$, $H - 6.85\%$.

По аналогичной экспериментальной методике с соблюдением всех реакционных параметров были получены и очищены дополнительные целевые гидразидные производные холановых кислот, соответствующие соединениям, которые в научной литературе идентифицированы как соединения XLIV, XLV, XLVI, XLVII и XLVIII.

4.10.2. Синтез пропан-1,2-диолового эфира 3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты

В колбу с обратным холодильником загружают 15 г (0,036 моль) натриевой соли 3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты в 50 мл метанола, добавляют 3,98 г (0,036 моль) α -хлоргидрина глицерина в 10 мл метанола. Кипятят 6 ч, фильтруют от NaCl, упаривают, остаток перекристаллизовывают из метанола.

Конечные данные опыта:

Выход 15.0 грамм (89%). $T_{пл.} = 210-211\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Соединение имеет формулу $C_{27}H_{47}O_6$, для которой:

найдено: $C - 69.31\%$, $H - 10.09\%$,

вычислено: $C - 69.37\%$, $H - 10.03\%$.

4.10.3. Получение 6-хлор-2-метилбензо(b)тиофен-1,1-диоксид-гидразида 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты (XLI)

В трёхгорлую колбу с мешалкой и обратным холодильником загружали 8 г (0,022 моль) гидразида 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты и 35 мл сухого пиридина. Нагревали при 80–85 $^{\circ}\text{C}$ 3–3,5 ч, выливали на 100 г льда. Осадок отфильтровывали, промывали до pH=7, сушили на воздухе, перекристаллизовывали из спирта.

Конечные данные опыта:

Выход 8.0 грамм (84%). $T_{пл.} = 176-177\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Соединение имеет формулу $C_{33}H_{44}N_2O_5SCl$, для которой:

найдено: $C - 46.66\%$, $H - 6.49\%$,

вычислено: $C - 46.77\%$, $H - 6.54\%$.

В строгом соответствии с описанной выше экспериментальной схемой были синтезированы и выделены дополнительные тиосемикарбазидные производные в ряду холановых кислот. Полученные соединения идентифицированы и обозначены в работе как XL, XLI, XLII, XLIII, XLIV, XLV, XLVI и XLVII; условия проведения реакций, а также приёмы очистки и выделения целевых продуктов полностью воспроизводили параметры, отработанные для ранее описанных аналогов.

4.10.4. Синтез 3 α ,7 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты из 3 α -ацето-7 α -гидроксиметилхолата [164]

В трёхгорлую колбу с мешалкой, холодильником и капельной воронкой загружали 20 г (0,037 моль) 3 α -ацето-7 α -гидроксиметилхолата в 90 мл диоксана. При комнатной температуре по каплям добавляли раствор 7–8 г КОН в 40 мл воды, перемешивали 30 мин. Выпавшие кристаллы 3 α ,7 α -дигидроксихолановой кислоты отфильтровывали, промывали ацетоном (15–20 мл) и перекристаллизовывали из этанола.

Конечные данные опыта:

Выход 13.0 грамм (74.4%). $T_{пл.} = 177-178\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Соединение имеет формулу $C_{24}H_{40}O_4$, для которой:

найдено: $C - 73.31\%$, $H - 10.11\%$,

вычислено: $C - 73.36\%$, $H - 10.18\%$.

4.10.5. Синтез 3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холановой кислоты из 3 α ,12 α -дигидрокси-7-кетометилхолата [123]

В колбу с обратным холодильником загружают 20 г 3 α ,12 α -дигидрокси-7-кетометилхолата, добавляют 7 г гидразингидрата и раствор 11,2 г КОН в 55 мл этиленгликоля. Кипятят 2,5 ч, затем переключают на отгонку и удаляют

гидразин с водой до 195°C. Поддерживают эту температуру до прекращения выделения N_2 . Когда реакционная масса остынет до комнатной температуры, её обрабатывают следующим образом: добавляют объём воды, равный объёму исходной смеси. Затем проводят подкисление, используя концентрированную соляную кислоту, до достижения значения $pH = 3$. На следующем этапе выполняют многократную экстракцию с применением этилацетата. Полученный экстракт тщательно промывают дистиллированной водой, а затем подвергают сушке с использованием безводного сульфата натрия. После того как растворитель полностью удалён, оставшийся твёрдый остаток подвергают процедуре перекристаллизации. Операцию повторяют несколько раз, используя в качестве растворителя этиловый спирт.

Конечные данные опыта:

Выход 13.9 грамм (74.4%). $T_{пл.} = 177-178\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Соединение имеет формулу $C_{24}H_{40}O_4$, для которой:

найденно: $C - 73.39\%$, $H - 10.14\%$,

вычислено: $C - 73.36\%$, $H - 10.18\%$.

4.10.6. Синтез 3 α ,7 α -диацетокси-метилхолата из 3 α -ацетокси-7 α -гидроксиметилхолата [122]

В колбу на 250 мл загружали 2 г (0,004 моль) 3 α -ацетокси-7 α -гидроксиметилхолата, 9–10 мл бензола, 2,5 мл пиридина и 2,5 мл уксусного ангидрида. Смесь выдерживали 15 ч при 25°C. Бензольный слой отделяли, промывали водой и HCl, упаривали; остаток перекристаллизовывали.

Конечные данные опыта:

Выход 1.88 грамм (87.0%). $T_{пл.} = 43-44\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Соединение имеет формулу $C_{27}H_{42}O_5$, для которой:

найденно: $C - 72.69\%$, $H - 9.46\%$,

вычислено: $C - 72.64\%$, $H - 9.41\%$.

4.10.7. Синтез тиосемикарбазида 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты

В колбу с обратным холодильником загружали 2 г (0,0025 моль) 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты, 1 г (0,025 моль) тиосемикарбазида и 25 мл абсолютного этанола. Нагревали 4–4,5 ч при 75–80°C, выливали в 100 мл воды. Осадок отфильтровывали, промывали до pH=7 и сушили на воздухе.

Конечные данные опыта:

Выход 0.85 грамм (91.0%). $T_{пл.}=244-256\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Соединение имеет формулу $C_{25}H_{43}O_4SN_3$, для которой:

найденно: C – 62.31%, H – 8.93%,

вычислено: C – 62.32%, H – 8.94%.

По аналогичной методике осуществлён синтез ряда производных тиосемикарбазидов на основе холановых кислот. В результате получены соединения, обозначенные XXIX, XXX, XXXI, XXXII, XXXIII и XXXIV.

ВЫВОДЫ

1. Впервые осуществлён детальный анализ последовательных стадий синтеза производных холановых кислот. В разработанную схему вошли ключевые этапы - этерификация, ацилирование, окисление, а также реакции гидразидов и тиосемикарбазидов глицидных эфиров с различными нуклеофильными реагентами. Реализация многоступенчатой методики позволила получить ряд новых соединений, проявляющих выраженную биологическую активность и обладающих значительным потенциалом для комплексного применения в медико-биологических исследованиях и фармакологии.

2. Установлены оптимальные условия синтеза сложных эфиров трёх ключевых соединений: $3\alpha, 7\beta$ -дигидрокси- 5β -, $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -, 3α -ацетокси- 7α -гидрокси- 5β -холановой кислоты. Полученные эфирные производные рассматриваются как перспективные полупродукты, которые могут быть использованы в качестве исходных соединений для разработки лекарственных средств различного спектра действия – гепатопротективного, гипохолестеринемического, холелитолитического, противовоспалительного и антимикробного.

3. Детально проанализированы реакции ацилирования разнообразных эфиров $3\alpha, 7\alpha$ -дигидрокси- 5β -холановой кислоты. Реализация данных превращений позволила успешно синтезировать серию ацилпроизводных, обладающих заранее заданной структурой. Выявлена инертность гидроксильных групп, расположенных в положениях 3α - и 7α - молекулы стероида: в условиях проведённых реакций они не вступали во взаимодействие. Этот факт вносит существенный вклад в понимание реакционной способности рассматриваемых сложных эфиров и позволяет дополнить существующие представления о механизме и особенностях протекания реакций ацилирования с участием данных соединений.

4. Подобраны и экспериментально обоснованы оптимальные условия проведения реакции окисления для ряда сложных эфиров $3\alpha, 7\alpha$ -диацетокси- 5β -холановой кислоты. Систематический анализ параметров процесса

позволил выявить комбинацию факторов, обеспечивающую максимальный выход целевого продукта при минимальном образовании побочных соединений. На основе оптимизированной методики синтезированы кетопроизводные заданной структуры, которые могут быть использованы в дальнейшем для создания литолитических препаратов.

5. Впервые проведён комплексный анализ химических свойств тиосемикарбазида-3 α , 7 α -дигидроксихолановой кислоты. Особое внимание было уделено исследованию реакций тиосемикарбазидного фрагмента стероида с первичными аминами. Осуществлён скрининг условий проведения реакций, что позволило определить оптимальные параметры взаимодействия. Синтезированные вещества представляют значительный интерес как потенциальные биологически активные соединения.

6. Детально изучено химическое поведение ряда гидразидов холановых кислот в реакциях взаимодействия с 3,6-дихлор-2-метил-бензо(β)тиофен-1,1-диоксидом. Экспериментальные данные показали, что данные взаимодействия позволяют целенаправленно синтезировать многочисленные производные холановых кислот, обладающие выраженной противомикробной активностью.

7. Впервые выполнено сравнительное исследование методом газовой хроматографии, направленное на определение содержания холановых и высших карбоновых кислот в сыворотке крови пациентов с жировой болезнью печени. Полученные результаты позволили выявить характерные изменения липидного профиля, отражающие состояние обмена жиров и особенности накопления триглицеридов в организме, что позволит усовершенствовать диагностические процедуры и разработать более результативные терапевтические стратегии для лечения жировой болезни печени.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соколик, В.Н. Синтез поликатионных амфифилов на основе холевой кислоты / В. Н. Соколик, М. А. Маслов, Н. Г. Морозова, Г. А. Серебренникова // Вестник МИТХТ. - 2010. - Т. 5. - № 6. - С. 58-62.
2. Флехтер, О.Б. Синтез и противовирусная активность амидов и конъюгатов бетулоновой кислоты с аминокислотами / О. Б. Флехтер [и др.] // Биоорганическая химия. - 2004. - Т. 30. - № 1. - С. 89-98.
3. Константинова, Т.В. Синтез холестеринсодержащих катионных амфифилов с гетероциклическими основаниями / Т. В. Константинова, В. Н. Клыков, Г. А. Серебренникова // Биоорганическая химия. - 2001. - Т. 27. - № 6. - С. 453-456.
4. Arunachalam, Kannan. Synthesis and anti-HIV activity of a bile acid analog of cosalane / Arunachalam Kannan, Erik De Clercg, Christophe Pannecouque [et al.] // Tetrahedron. - 2001. – V. 57. - P. 9385-9391.
5. Серебренникова, Г.А. Модульные транспортные системы на основе катионных и нейтральных амфифилов для генной терапии / Г. А. Серебренникова, М. А. Маслов, Н. Г. Морозова // Вестник МИТХТ. - 2011. - Т. 6. - № 5. - С. 72-86.
6. Соколова, Т.В. Получение катионных амфифилов на основе дезоксихолевой кислоты / Т. В. Соколова, М. А. Маслов, Г. А. Серебренникова // Биоорганическая химия. - 2004. - Т. 30. - № 5. - С. 531- 536.
7. Salunke, D.B. Bile acid-polyamine conjugates as sunthetic ionophores / D. B. Salunke, B. G. Hazra, V. S. Pore // ARKIVOC. - 2003. – Vol. IX. – P. 115-125.
8. Singhal, A. Gene Therapeutics: Methods and Applications of Direct Gene Transfer / A. Singhal, L. Huang // Ed. J. A. Wolff. - Boston: Birknauser, 1994. - P. 1-10.
9. Gene and cell therapy: Therapeutic mechanisms and strategies // Ed. N. S. Templeton. - Boca Raton: CRC Press, 2009. – P. 1101.
10. Zuhorn, I.S. Gene delivery by cationic lipid vectors overcoming cellular

barriers / I. S. Zuhorn, J. B. Engbert, D. Hoekstra // *Eur. Biophys. J.* - 2007. - V. 36. - P. 34.

11. Bile acid conjugates of a nonsteroidal glucocorticoid receptor modulator / N. Tu [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* - 2004. – V. 14. – P. 4179-4183.

12. Synthesis and anti-HIV activity of a bile acid analog of cosalane / A. Kannan, De. E. Clercg [et al.] // *Tetrahedron.* - 2001. – V. 57. – P. 9385-9391.

13. Paschke, R. Novel spacer linked bile acid-cisplatin compounds as a model for specific drug delivery, synthesis and characterization / R. Paschke, J. Kalbitz, C. Paetz // *Inorg. Chim. Acta.* - 2000. – V. 304. – P. 241-249.

14. New organotropic compounds. Synthesis characterization and reactivity of Pt (II) and Au (III) complexes with bile acids: DNA interactions and «in vitro» anticancer activity / R. Paschke [et al.] // *J. Inorg. Biochem.* - 2003. – V. 94. – P. 311-320.

15. Саид, В.С. Синтез и превращения полифункциональных производных 1,3,4-тиадиазола [3,2-а] пиримидина: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.03 / Саид Вали Султан. – Душанбе, 2012. – С. 3-8.

16. Ахрем, А. А. Полный синтез стероидов / А. А. Ахрем, Ю. А. Титов. – М.: Наука, 1967. - С. 5-7.

17. Лазурьевский, Г.В. Практические работы по химии природных соединений / Г. В. Лазурьевский, И. В. Терентева, А. А. Шамшурин. – М.: Высшая школа, 1966. - С. 125-126.

18. Bjorkhem, I. Biosynthesis and metabolism of bile acids in man / I. Bjorkhem, H. Danielsson // -In: *Progress in liver disease*, v. eds. by H. Popper and, F. Schaffner. - New-York, Grunige and Stratton, 1976. - P. 850-851.

19. Мансурова, Х.Х. Актуальные вопросы патологии печени. – Вып. 9 / Х. Х. Мансурова / Под ред. акад. Х. Х. Мансуровой. – Душанбе: Дониш, 1985. - С. 6-9.

20. Origins of cell selectivity of cationic steroid antibiotics / B. Ding [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* - 2004. – V. 126. – P. 13642-13648.

21. Фердман, Д.Л. Биохимия / Д. Л. Фердман. – М.: Высшая школа,

1966. – С. 318-343.

22. Васильев, Р.Х. Бескровные методы удаления желчных камней / Р. Х. Васильев. – М.: Высшая школа, 1989. - С. 228-229.

23. Shefer, S. Biosynthesis of chenodesoxycholic acid in man. Stereospecific Side-chain hydroxylation of 5β -cholestane $3\alpha,7\alpha$ -diol / S. Shefer, F. W. Chend, A. K. Batt // J. Clin. Invest. - 1978. - V. 62. - P. 539-545.

24. McCormick, W.C. Cholic acid synthesis as an index of the severity of liver disease in man / W. C. McCormick // J. Clin. Invest, 1973. - V. 14. - P. 895-902.

25. Fieser, L.F. Atol oxidation of steroids is / L. F. Fieser // J. Am. Chem. Soc. - 1949. - V. 72. - P. 5531-5534.

26. Fieser, L.F. Selective oxidation and acylation in the acids series / L. F. Fieser, S. Rajagaplan // J. Am. Chem. Soc. - 1950. - V. 72. - P. 5533.

27. Кадыров, А.Х. Синтез моноглицидных эфиров желчных кислот / А. Х. Кадыров, И. М. Насыров, И. Г. Решетова // Известия АН ТаджССР. – Отд. физ.-мат., хим. наук. - 1999. - № 2 (112). - С. 71-72.

28. Harlewood, G.A. Recent developments in our knowledge of bile salts / G. A. Harlewood // J. Physiol. Revs. - 1955. - V. 35. - P. 178.

29. Несмеянов, А.Н. Начала органической химии / А. Н. Несмеянов, Н. А. Несмеянов. – М.: Химия, 1970. - С. 672-673.

30. Архем, А.А. Изыскание избирательных иммуноотрапных вещества класса гетеростероидов / А. А. Архем, Б. Б. Кузьмицкий, Ф. А. Лахвич [и др.] // Химия и биология иммунорегуляторов. – Рига: Изд. «Зинатне», 1985. - С. 265.

31. Nair, P. Role of bile acids and neutral sterols in familial cancer syndromes of the colon / P. Nair, N. Turjman // Dis. Colon Rectum. - 1983. - Vol. 52. - P. 629-632.

32. Sinacos, E. Bile acid changes after high-dose ursodeoxycholic acid treatment in primary sclerosing cholangitis: Relation to disease progression / E. Sinacos, H. U. Marshall, K.V. Kowdley [et al.] // Hepatology. - 2010. - V. 52. - P. 197-203.

33. Fedorowski, T. Transformation of chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid by human intestinal bacteria / T. Fedorowski, G. Salen, G. S. Tint, E.

Mosbach // Gastroenterology. - 1979. - V. 77. - P. 1068-1073.

34. Huanq, Minlon. Simple modification of the Wolff-Kishnerreduction / Huanq Minlon // J. Amer. Chem. Soc. - 1949. - V. 68. - P. 2488-2490.

35. Fieser, L.F. Oxidation of steroids / L. F. Fieser, S. Rajaapplans // J. Amer. Chem. Soc. - 1949. - V. 72. - P. 5531-5533.

36. Palmer, K.R. Inraductal mono-octanoïn for the direct dissolution of bile duct stones / K. R. Palmer, A. F. Hoffmann // Experience in 343 patients- Guts. - 1986. - V. 27. - № 1. – P. 196-202.

37. Bouchies, J.A. Gallstones-Urso-Cheno: Report / J. A. Bouchies. -1990. - № 446. - P. 26-31.

38. Кадыров, А.Х. Некоторые реакции $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидроксихолановой кислоты / А. Х. Кадыров, Д. Х. Халиков // Региональное совещание республик Средней Азии и Казахстана по химическим реактивам: Тезисы докладов. - Ташкент, 1990. - Т. 1. - Ч. II. - С. 2.

39. Кадыров, А.Х. $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидроксихолановая кислота и синтезы на его основе / А. Х. Кадыров, З. Д. Назарова, И. Г. Решетова // Доклады АН Республики Таджикистан. - 1991. - Т. 34. - № 9. - С. 564-466.

40. Miller, A.D. Cationic Liposomes for Gene Therapy / A. D. Miller // Angew. Chem. Int. Ed. - 1998. - V. 37. - №13-14. - P. 1768-1785.

41. Кадыров, А.Х. Синтез и биологическая активность некоторых производных желчных кислот / А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров, А. Ш. Гиясов. – Душанбе: Хаём, 2002. - С. 98-100.

42. Dissolution of Cholesterol Gallstones in Mice by the Oral Administration of a Fatty Acid Bile Acid Conjugate / T. Gilat, A. Leikin- Frenkel, I. Goldiner [et al.] // Hepatology. - 2002. - V. 35. - № 3. – P. 597-600.

43. Provention of Diet-induced Fatty Liver in Experimental animals By the Oral Administration of a Fatty Acid Bile Acid Conjugate (FABAC) / T. Gilat, A. Leikin-Frenkel, I. Goldiner [et al.] // Hepotology. - 2003. - V. 38. - № 2. – P. 436-442.

44. ABCA1 dependent but Apo A1 independent cholesterol and

phosphatidylcholineefflux mediated by FABAC / I. Goldiner, A. Leikin- Frenkel, T. Gilat [et al.] // 25th ELC (European Lipoprotein Club) Annual Meeting. – 2002.

45. Целебные свойства продуктов жизнедеятельности [Электронный ресурс]. – URL: <http://mewo.ru>

46. Максимов, В. А. Современный взгляд на процессы желчеобразования и желчевыделения / В. А. Максимов [Электронный ресурс]. – URL: www.SOLVAY-PHARMA.RU.

47. Лейшнер, У. Практическое руководство по заболеваниям желчевыводящих путей / У. Лейшнер. – М., 2001. – 264 с.

48. Шаранин, Ю.А. 2'-Аминоандрост-2-[2,3в] тиофен / Ю. А. Шаранин, В.К. Проманенков // Химия природных соединений. - 1980. - № 11. - С. 1564-1565.

49. Шведов, В.И. Реакции енаминов / В. И. Шведов, А. Н. Гринев // Журнал органической химии. - 1965. - № 12. - С. 2228-2231.

50. Кадыров, А.Х. Синтез и биологическая активность сложных эфиров холановых кислот / А. Х. Кадыров, М. М. Муродова, К. Х. Хайдаров // Республиканская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы семейной медицины», посвящённая 75-летию чл.-корр. РАМН, проф. Ю. Б. Исхаки. – Душанбе, 2007. – С. 32-33.

51. Муродова, М.М. Модификационный синтез некоторых производных холановых кислот / М. М. Муродова, А. Х. Кадыров, З. Д. Назарова, К. Х. Хайдаров // Доклады АН Республики Таджикистан. - 2006. - Т. 49. - № 10-12. – С. 933-938.

52. Назарова, З.Дж. Синтез и свойства аминотиофенсодержащих желчных кислот / З. Д. Назарова, М. М. Муродова, А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров // Республиканская конференция «Достижения в области химии и химической технологии». - Душанбе, 2002. - С. 77-79.

53. Кадыров, А.Х. Некоторые реакции 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты / А.Х. Кадыров, Д. Х. Халиков // III Региональное совещание республик Средней Азии и Казахстана по химическим реактивам. - Ташкент,

1990. – Т. 1. - Ч. II. - С. 266.

54. Кадыров, А.Х. Синтез и биологическая активность некоторых производных желчных кислот / А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров, А.Ш. Гиёсов. - Душанбе: Хаём, 2000. - С. 4-10.

55. Муродова, М.М. Гидразиды некоторых производных холановых кислот / М. М. Муродова, З. Д. Назарова, А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров // Доклады АН Республики Таджикистан. - 2005. - Т. 48. - № 2. - С. 18-20.

56. Назарова, З.Д. $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -Тригидроксихолановая кислота и синтезы на её основе: ввтореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.03 / З. Д. Назарова. - Душанбе, 1999. - С. 13-16.

57. Назарова, З.Д. $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -Тригидроксихолановая кислота и синтезы на её основе: ввтореф. дис. ... канд. хим. наук: 02.00.03 / З. Д. Назарова. - Душанбе, 1999. - С. 37-41.

58. Назарова, З.Д. Синтез тетрагидробензо/в/тиофенсодержащих стероидов / З. Д. Назарова, А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров // Доклады АН Республики Таджикистан. - 1998. - Т. 41. - № 11-12. - С. 63-66.

59. Назарова, З.Дж. Синтез и свойства аминотиофенсодержащих желчных кислот / З. Д. Назарова, М. М. Муродова, А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров Республиканская конференция «Достижения в области химии и химической технологии». - Душанбе, 2002. - С. 77-79.

60. Назарова, З.Дж. Синтез и свойства новых производных желчных кислот / З. Д. Назарова, М. М. Муродова, А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров // Республиканская конференция «Достижения в области химии и химической технологии». - Душанбе, 2002. - С. 198.

61. Муродова, М.М. Синтез новых производных желчных кислот / М. М. Муродова, А. Х. Кадыров, З. Д. Назарова, К. Х. Хайдаров // Доклады АН Республики Таджикистан. - 2005. - Т. 48. - № 2. - С. 21-25.

62. Бахроми, М.Т. Синтез и исследования литолитических свойств «Триоин» / М. Т. Бахроми, А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров // Научно- теоретическая конференция профессорско-преподавательского состава и студентов,

посвященная году образования и технических знаний. – Душанбе, 2010. - С. 193-194.

63. Пат. № TJ 358. «Триоин» в качестве препарата, растворяющего холестериновые и пигментные камни желчного пузыря и желчных протоков / А. Х. Кадыров, М. Т. Бахроми, К. Х. Мироджов [и др.]. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Таджикистан от 30.07.2010 г.

64. Пат. РТ № TJ 237. Глицериновый эфир 3 α -7 α -дигидроксихолановой кислоты, способ его получения и его применение в качестве лекарственного препарата / А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров, В. А. Назаров, З. Д. Назарова. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Таджикистан от 2000 г.

65. Бахроми, М.Т. Исследование литолитических свойств «Триоин»-а / М. Т. Бахроми, А. Х. Кадыров // Годичная научно-практическая конференция «Современная медицина и новые технологии», посвящённая году образования и технической культуры. – Душанбе, 2010. – С. 210-213.

66. Бахроми, М.Т. «Триоин» - растворитель холестериновых желчных камней при желчнокаменной болезни / М. Т. Бахроми, А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров // Здравоохранение Таджикистана. - 2010. - № 1. – С. 69-72.

67. Бахроми, М.Т. «Триоин» и его литолитические свойства (in vitro) / М. Т. Бахроми, А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров // Известия АН Республики Таджикистан. - 2010. - № 1. – С. 74-78.

68. Бахроми, М.Т. Литолитические свойства «Триоин»-а / М. Т. Бахроми, А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров // Здравоохранение Таджикистана. - 2010. – № 2. – С. 21-24.

69. Бахроми, М.Т. Влияние сухой холилитогенной гиперлипидемической диеты на характер изменения содержания желчных кислот и других компонентов желчи у экспериментальных хомяков / М. Т. Бахроми // Вестник Авиационны. - 2010. - № 3. – С. 21-24.

70. Бахроми, М.Т. Растворение желчных камней «Триоин»-ом (in vitro) / М. Т. Бахроми, А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров // Научно-теоретическая

конференция профессорско-преподавательского состава и студентов, посвящённая году образования и технических знаний. – Душанбе, 2010. – С. 192-193.

71. Balasubramaniam, R.P. Structural and functional analysis of cationic transfection lipids: The hydrophobic domain / R. P Balasubramaniam, M. J. Bennet, A. M Aberle [et al.] // Gene Therapy. - 1996. - V. 3. - P. 163-172.

72. Зеленин, А.В. Генная терапия на границе третьего тысячелетия / А. В. Зеленин // Вестник РАН. - 2001. - Т. 71. – С. 387-404.

73. Yoshimura, T. Anchoring and bola cationic amphiphiles for nucleotide delivery. Effects of orientation and extension of hydrophobic regions / T. Yoshimura, S. Hasegawa, N. Hirashima [et al.] // Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2001. - V. 11. - P. 2897-2901.

74. Ren, T. Synthesis of Cationic Amphiphiles on the Basis of Deoxycholic Acid / T. Ren, G. Zhang, D. Liu, F. Liu // Bioorg. Med. Chem. Lett. - 2000. - V. 10. - P. 891-894.

75. Wolker, S. Cationic facial amphiphiles: a promising class of transfection agents / S. Wolker, M. J. Sofia, R. Kakarla [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1996. - V. 93. - P. 1585-1590.

76. Vandenburg, V.R. Non-leaky vesicle fusion and enhanced cell transfection using a cationic facial amphiphile / V. R. Vandenburg, B. D. Smith, M. N. Prevez-Payan, A. P. Davis // J. Am. Chem. Soc. - 2000. - V. 122. - P. 3252-3253.

77. Kwann, K.H. Dissolution Kinetics of cholesterol in simulated bile. Influence of simulated bile composition / K. H. Kwann, W. J. Hiquchi, A. F. Hofmann // J. Pharm. Sci. - 1987. - V. 67. - № 12. - P. 1711-1714.

78. Геня, Л.П. Новые возможности в лечении желчнокаменной болезни / Л. П. Геня, А. Л. Гребнев // Клиническая медицина. - 1988. - № 5. - С. 30-37.

79. Hoffmann, A.F. Chenodeoxycholic acid Therapy of Gallstones. Progress Report / A. F. Hoffmann, G. Paumgartner // Schaffer verlaq. – Stuttgart, New-York, 1975. - P. 23.

80. The lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results:

The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering // JAMA. - 1984. - № 251. - P. 365-374.

81. Mansurova, F.H. Conques in bile chemistry and dissolonqed of cholesterol calcull under prolonqed therapy with chenodeoxy-cholic acid / F. H. Mansurova // Cheno-Urso-Report. - 1988. - № 9. - P. 259-268.

82. Мансуров, Х.Х. О сдвигах в метаболизме желчных кислот в процессе хеноурсо-терапии / Х. Х. Мансуров, Ф. Х.Мансурова, З. Д. Рамазонова // Симпозиум «Новое в диагностике и лечении болезней органов пищеварения. Диетотерапия в гастроэнтерологии». - Душанбе, 1988. - С. 282-285.

83. Lindor, K.D. High dose ursodeoxycholic acid for the treatment of primary Sclerosing cholangitis / K. D. Lindor, K. V.Kowdley, V. A. Luketic [et al.] // Hepatology. - 2009. - V. 50. – P. 808-814.

84. Sinacos, E. Bile acid Changes after high-doss ursodeoxycholic acid treatment in primary Sclerosing cholangitis: Relation to disease progression / E. Sinacos, H. U. Marschall, K. V. Kowdley // Hepatology. - 2010. - V. 52. – P. 197-203.

85. Вовк, Е.К. Жировая болезнь печени в практике терапевта / Е. К. Вовк, Е. Ю. Тихоновская, А. Н. Камаровский // Терапевт. - 2010. - № 4. – С. 17-20.

86. Coun, M. Dietary cholesterol Influences chenodexy-cholic acid inhibition of Hepatic Choesterol synthesis / M. Coun, A. Chunq // Gastroenterology. - 1976. - V. 70. - P. 163-174.

87. Гребнев, А.Л. Отдалённые результаты холелитической терапии у больных желчнокаменной болезнью препаратами хено- и урсодезоксихолевой кислот / А. Л. Гребнев, Л. П. Геня // Клиническая медицина. - 1991. - № 6. - С. 63-66.

88. Гребнев, А.Л. Опыт применения препарата хенофальк у больных желчнокаменной болезнью / А. Л. Гребнев, В. С. Голчевская, Л. П. Геня. - Душанбе, 1981. - С. 121-123.

89. Гребнев, А.Л. Белковый и пигментный обмен в печени у больных желчнокаменной болезнью до и после лечения хено- и урсодезоксихолевыми

кислотами / А. Л. Гребнев [и др.] // Клиническая медицина. - 1988. - № 3. - С. 96-99.

90. Ross, F.E. Gas-liquid chromatographic assay of serum bile acids / F. E. Ross, C. R. Pennington, A. D. Boucher // J. Analytical Biochemistry. - 1987. - V. 80. – P. 458-465.

91. Kuksis, A. Gas-liquid chromatographic of bile acids / A. Kuksis, B. A. Gordon // J. Amer. Chem. Soc. - 1964. - V. 2. - P. 360-361.

92. Ruben, A.T. Sample reversephasic high pressure liquid chromatographic determination of conjugated bile acids in serum and bile using a novel compression separationsystem / A. T. Ruben, P. A. Gerard // Ceinica chemical acta. - 1982. - V. 119. - P. 302-309.

93. Bonnazi, P. Bile acid analysis: A. Rapid and sensitive Gas-Liquid Chromatographic metod / P. Bonnazi, C. Calazesu, R. Galeazzi // Pharmacological Pe-search communications. - 1984. - V. 16. - № 6. - P. 549-552.

94. Samuelson, K. Serum and Urinary bile acids in Patents with Primery Biliary Cirosis / K. Samuelson, A. Aly, C. Jobbansson, A. Norman // J. of Gastroenterology. - 1982. - V. 17. - № 1. - P. 121-128.

95. Goldman, M. Bile Acids Metaboliet in Cirrhosis. VIII. Quantitative Evaluation of Bile acid sinthesis from $[7\beta\text{-}^3\text{H}]$ 7α - Hydroxychole sterol and $[G\text{-}^3\text{H}]$ 26- Hydroxychole sterol / M. Goldman, Z. V. Reno [et al.] // Hepatology. – 1982. - V. 2. - № 1. - P. 59-66.

96. Street, I.M. The quantitative stimation of bile acids and their conjugates in human biological fluids / I. M. Street, D. I. Trafford, H. L. Makin // J. Lipid. Res. - 1983. – V. 24. - P. 491-511.

97. Мансуров, Х.Х. Современные представления о механизме образования желчных камней: В кн.: Желчнокаменная болезнь / Х. Х. Мансуров. - Душанбе, 1981. - С. 25-29.

98. Мансуров, Х.Х. О генезе алитогенности желчи у собак: В кн.: Желчнокаменная болезнь / Х. Х. Мансуров, А. К. Кахаров. - Душанбе, 1981. - С. 29-31.

99. Кадыров, А.Х. К сравнительной оценке методом газожидкостной хроматографии состава желчных кислот в пузырной желчи человека и собаки: В кн.: Актуальные вопросы патологии печени / А. Х. Кадыров, Х. Х. Мансуров. – Душанбе, 1985. - Вып. 9. - С. 43-47.

100. Кадыров, А.Х. Определение желчных кислот в желчи методом газожидкостной хроматографии / А. Х. Кадыров, Г. Б. Тамурадова, М. А. Гафарова // Лабораторное дело. – 1986. - № 6. - С. 343-345.

101. Сайфуддинов, А.К. Газохроматографическая оценка желчных кислот в желчи здоровых людей и у больных желчнокаменной болезнью / А. К. Сайфуддинов, А. Х. Кадыров, Ф. Х. Мансурова, К. Х. Хайдаров // Республиканская конференция «Актуальные проблемы производства лекарственных препаратов на основе местного сырья». - Душанбе, 2003. - С. 152-157.

102. Кадыров, А.Х. Определение конъюгированных желчных кислот методом газожидкостной хроматографии / А. Х. Кадыров // Всесоюзный симпозиум «Желчнокаменная болезнь». – Душанбе: Дониш, 1981. - С. 73-74.

103. Кадыров, А.Х. Исследование содержания желчных кислот у здоровых лиц и у больных с различной патологией печени и желчевыделительной системы / А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров, З. Д. Назарова // Вестник Авиценны. - 2003. - № 1-2. - С. 339-345.

104. Кадыров, А.Х. Определение желчных кислот сыворотки крови методом газожидкостной хроматографии / А. Х. Кадыров, З. М. Орзиев // Лабораторное дело. - 1986. - № 6. - С. 26-28.

105. Кадыров, А.Х. Определение содержания сывороточное желчных кислот у больных гепатита, циррозом печени / А. Х. Кадыров, А. К. Сайфуддинов, Ф. Х. Мансурова // III Республиканская научная конференция общества биохимиков РТ «Вклад биохимиков Таджикистана в развитие биологической науки». - Душанбе, 2003. - С. 93-95.

106. Сайфуддинов, А.К. Сравнительная оценка содержания желчных кислот сыворотки крови у больных с хроническим холециститом / А. К. Сайфуддинов, А. Х. Кадыров, Ф. Х. Мансурова, К. Х. Хайдаров // Международная

научно-практическая конференция «Актуальные проблемы физиологии человека и животных». - Душанбе, 2003. - С. 55-59.

107. Bergstrom, S. Formation and tism of bile acids / - In: Code CF, Heidel W., eds. Handbook of physiology. - Sect. 6. – Vol. 5 / S. Bergstrom, H. Danielsson. - Washington DC, American physiological Society, 1988. - P. 2391-2407.

108. Пат. РТ № TJ 283. Способ определения холестерина в сыворотке крови методом газожидкостной хроматографии / А. Х. Кадыров, Г. К. Мироджов, А. А. Кодиров [и др.]. - Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Таджикистан от 2009 г.

109. Мироджов, Г.К. Определение содержания холестерина в сыворотке крови здоровых и больных людей на различных этапах литогенеза методом газожидкостной хроматографии / Г. К. Мироджов, А. Х. Кадыров, А. А. Кодиров // Республиканская конференция «Образование и техническая культура в развитии биологических наук». – Душанбе, 2010. – С. 45-74.

110. Раджабов, Г.О. Влияние урсодезоксихолевой кислоты+сиафор на характер изменения содержания желчных кислот в сыворотке крови у больных с метаболическим синдромом / Г. О. Раджабов, А. Х. Кадыров, М. Н. Ходжимуродов, А. А. Кодиров // Здравоохранение Таджикистана. - 2009. - № 3. – С. 27-30.

111. Раджабов, Г.О. Газохроматографические исследования желчных кислот в сыворотке крови больных с метаболическим синдромом на фоне терапии эссенциал+сиафор / Г. О. Раджабов, А. Х. Кадыров, М. Н. Ходжимуродов, А. А. Кодиров // Здравоохранение Таджикистана. - 2009. - № 3. – С. 154-156.

112. Кодиров, А.А. Сравнительная оценка желчных кислот в сыворотке крови здоровых лиц и больных со стеатозом печени и стеатогепатитом / А. А. Кодиров, Г. О. Раджабов, А. Х. Кадыров // Годичная научно-практическая конференция молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибн Сино, посвящённая 20-летию независимости Республики Таджикистан. – Душанбе, 2011. – С. 417-419.

113. Кадыров, А.Х. Синтез эталонных образцов холановых кислот / А. Х. Кадыров, М. Р. Суриев, М. Б. Тошев, К. Х. Хайдаров // Доклады АН Республики Таджикистан. - 2008. - Т. 51. - № 10. - С. 746-749.
114. Маслов, М.А. «Пинцетообразные» структуры на основе изостевиола / М. А. Маслов, Е. В. Сычева, Н. Г. Морозова, Г. А. Серебренникова // Известия РАН. - Серия химия. - 2000. - № 3. - С. 385-400.
115. Fujiwara, T. Gene transfection activities of amphiphilic steroid-polyamine conjugates / T. Fujiwara, S. Hasegawa, N. Hirashima [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. - 2000. - V. 1468. - P. 396-402.
116. Султонмамадова, М.П. Синтез сложных эфиров $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ - трикетохолановой кислоты / М. П. Султонмамадова, А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров // Доклады АН Республики Таджикистан. - 2011. - Т. 54. - № 8. - С. 649-652.
117. Кадыров, А.Х. Синтез сложных эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты и их продуктов ацилирования / А. Х. Кадыров, З. Д. Назарова, М. П. Султонмамадова // Журнал научных публикаций аспирантов и докторантов. - 2012. - № 7. - С. 107-110.
118. Физер, Л. Органическая химия / Л. Физер, М. Физер. - М.: Химия, 1969. - Т. 1. - С. 70.
119. Вайсбергер, А. Органические растворители / А. Вайсбергер, Э. Проскауэр, Д. Риддук, Д. Тунис. - М.: Наука, 1975. - С. 518.
120. Вяхирев, Д.А. Руководство по газовой хроматографии / Д. А. Вяхирев, А. Ф. Шушунова. - М.: Высшая школа, 1987. - С. 224-239.
121. Назарова, З.Д. Исследование структурных особенностей биологически активных моноглицидных эфиров желчных кислот / З. Д. Назарова, А. Х. Кадыров, Т. Х. Абдуллаев, К. Х. Хайдаров // Доклады АН Республики Таджикистан. - 1998. - Т. 41. - № 11-12. - С. 17-21.
122. Наканиси, И. Инфракрасные спектры и строение органических соединений / И. Наканиси. - М.: Мир, 1965. - С. 36-39.
123. Кадыров, А.Х. Синтез, свойства веществ, растворяющих холестериновые камни желчного пузыря на основе некоторых стероидов и других

кислот / А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров, З. Д. Назарова // Вестник Авиценны. - 2006. - Т. 1-2. - С. 339-345.

124. Сайфуддинов, А.К. Исследование содержания желчных кислот в желчи и сыворотке крови методом ГЖХ: дис. ... канд. биол. наук / А. К. Сайфуддинов. – Душанбе, 2004. - С. 68-72.

125. Кадыров, А.Х. Глицериновый эфир $3\alpha,7\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты, способ его получения и применения в качестве лекарственного средства / А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров // НПИ Центр Республики Таджикистан. - 2002. - № 23. - Сер. 34.57.21.

126. Муродова, М.М. Модификационный синтез некоторых производных холановых кислот / М. М. Муродова, А. Х. Кадыров, З. Д. Назарова, К. Х. Хайдаров // Доклады АН Республики Таджикистан. - 2006. – Т. 49. - № 10-12. – С. 933-938.

127. Kannon, E. Synthesis and anti-HIV activity of a bile acid analog of cosalane / E. Kannon, C. Declercq, M. Pannecougue [et al.] // Tetrahedron. - 2001. - № 57. - P. 9385-9391.

128. Султонмамадова, М.П. Исследование реакции ацилирования сложных эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты / М. П. Султонмамадова, А. Х. Кадыров // Республиканская конференция «Комплексообразование в растворах». - Душанбе, 2012. - С. 35-36.

129. Кадыров, А.Х. Синтез моноглицидных эфиров желчных кислот / А. Х. Кадыров, И. Г. Решетова, И. М. Насыров // Известия АН ТаджССР. - Отд. физ.-мат., хим. и геол. наук. – 1989. - Т. 112. - № 32. – С. 71-72.

130. Султонмамадова, М.П. Синтез на основе метиловых эфиров холановых кислот / М. П. Султонмамадова, А. Х. Кадыров // Республиканская конференция «Химия: исследования, преподавание и технология», посвящённая «Году образования и технических знаний». – Душанбе, 2010. – С. 28-30.

131. Султонмамадова, М.П. Синтез диэтиламино-оксипропиловых эфиров холановых кислот / М. П. Султонмамадова, А. Х. Кадыров // Республиканская конференция «Химия: исследования, преподавание и технология»,

посвящённая «Году образования и технических знаний» – Душанбе, 2010. – С. 33-34.

132. Муродова, М.М. Гидразиды некоторых производных холановых кислот / З. Д. Назарова, А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров // Доклады АН Республики Таджикистан. - 2005. - Т. 48. - № 2. - С. 18-20.

133. Назарова, З.Д. Синтез и свойства аминотиофенсодержащих желчных кислот / З. Д. Назарова, М. М. Муродова [и др.] // Республиканская конференция «Достижения в области химии и химической технологии». - Душанбе, 2002. - С. 198.

134. Кадыров, А.Х. Глицериновый эфир $3\alpha,7\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты для растворения холестерина желчных камней / А. Х. Кадыров, З. Д. Назарова, К. Х. Хайдаров // Доклады АН Республики Таджикистан. - 1997. - Т. 40. - № 1-2. - С. 72-75.

135. Султонмамадова, М.П. Поведение некоторых гидразидов холановых кислот в реакциях нуклеофильного замещения / М. П. Султонмамадова, А. Х. Кадыров, К. Х. Хайдаров // Известия АН Республики Таджикистан. Отд. физ.-мат., хим., геол. и техн. наук. - 2011. - № 3 (144). – С. 86-90.

136. Султонмамадова, М.П. Изучение реакции гидразидов холановых кислот / М. П. Султонмамадова, А. Х. Кадыров // Республиканская конференция «Химия: исследования, преподавание и технология», посвящённая «Году образования и технических знаний». – Душанбе, 2010. – С. 16-17.

137. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М. Л. Беленький. – М.: Медицинская литература, 1963. - С. 105-106.

138. Шахов, А.Г. Методические рекомендации по диагностике, профилактике и лечению респираторных болезней телят / А. Г. Шахов, С. М. Сулеймонов. - Тамбов, 1985. - С. 35-36.

139. Салимов, Т.М. Антимикробная активность 1,3,4-тиадиазоло[3,2- α]пиримидина / Т. М. Салимов, З. Г. Сангов, З. Д. Ашурова [и др.] // Здоровье Таджикистана. - 2009. - № 3. - С. 173-176.

140. Теддер, Дж. Промышленная органическая химия / Дж. Теддер, А. Нехватал, А. Джубб / Пер. с англ. - М.: Мир, 1997. - С. 404-416.
141. Burger, F. Medical Chemistry, 3r ed. Wiley-Interscience. / F. Burger. - New-York, 1970.
142. Максимов, В.А. Билиарная недостаточность / В. А. Максимов, А. Л. Чернышев, К. М. Тарасов, В. А. Неронов. - М.: Изд. Товарищество «Адамант», 2008. – С. 21-28.
143. Lonardo, A. Hepatic-steatosis and insulin resistence: does etiology make differences / A. Lonardo, S. Lambardini, F. Scaglioni [et al.] // J. Hepatol. - 2006. - № 44 (1). – P. 190-196.
144. Grempler, R. Evidence for an indirect transcriptional regulation of glucose- 6-phosphatase gene expression by liver x receptors / R. Grempler, S. Gunter, K. R. Steffensen [et al.] // Am. J. Gastroenterol. - 2006. - V. 101 (1). – P. 70-75.
145. Вахрушева, Я.М. Жировой гепатоз / Я. М. Вахрушева, Е. В. Сычкова // Терапевтический архив. - 2007. - Т. 78. - № 11. - С. 83-86.
146. Пат. РТ № TJ 525. Способ диагностики жировой болезни печени / А. Х. Кадыров, Г. К. Мироджов, М. Н. Худжамуродов [и др.]. - Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Таджикистан от 4.09.2011 г.
147. Кадыров, А.Х. Содержание желчных кислот в сыворотке крови здоровых и больных метаболическим синдромом с проявлением желчнокаменной болезни / А. Х. Кадыров, Ф. Х. Мансурова, М. Н. Худжамуродов // Российский журнал Гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. Приложение № 32. – Москва. - 2008. - Т. 18. - № 5. - С. 117.
148. Кадыров, А.Х. Исследование содержания желчных кислот в сыворотке крови здоровых лиц и больных со стеатозом печени и стеатогепатитом. - В кн.: Вопросы питания и регуляция гомеостаза. - Выпуск 10 / А. Х. Кадыров, Г. О. Раджабов, А. А. Кодиров [и др.]. – Душанбе, 2010. – С. 138-143.
149. Ивашкин, В.Т. Диагностика и лечение неалкогольной жировой болезни печени: Методические рекомендации / В. Т. Ивашкин, О. М. Дропкина,

Ю. О. Шульпекова. - М.: ООО «Издательский дом» М-Вести, 2009. - С. 20.

150. Donnlly, K.L. Sources of fatty acids stored liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease / K. L. Donnlly, C. J. Smith [at al.] // J. Clin. Invest. - 2005. – V. 115. – P. 1343-1351.

151. Подымова, С.Д. Жировой гепатоз. Неалкогольной стеатогепатит (эволюция представлений о клинико-морфологических особенностях, прогнозе, лечении) / С. Д. Подымова // Терапевтический архив. - 2006. - № 4. - С. 32- 38.

152. Вершинин, В.И. Газовая хроматография / В. И. Вершинин, Ю. С. Дугов, А. А. Родин. Вяхирев. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: Химия, 1991. – 240 с.

153. Вайсбергер, А. Органические растворители / А. Вайсбергер, Э. Проскоуэр, Д. Риддук, Д. Тунис. – М.: Наука, 1975. - С. 518.

154. Чудаков, И.Е. Микро- и полумикроопределение серы в органических соединениях, нефтях и нефтепродуктах. Методы анализа органических соединений нефти, их смесей и производных / И. Е. Чудаков, Г. Д. Гальперн, Н. П. Волынский. - М.: АН СССР, 1960. - С. 20-21.

155. Караулова, К.Н. Синтез 2-метил-1-тиаиндана и перегруппировка аллиларилсульфидов / К. Н. Караулова, Д. Ш. Майпонова, Г. Д. Гальперн // Журнал органической химии. - 1960. - Т. 30. - С. 3292-3297.

156. Климова, В.А. Основные микрометоды анализа органических соединений / В. А. Климова. - М.: Химия, 1967. - С. 69-76.

157. Муродова, М.М. Синтез и свойства некоторых производных холановых кислот: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.03 / М. М. Муродова. - Душанбе, 2007. – С. 31-42.

158. Абдуллозода, С.И. Синтез, химические превращения и получение тиосемикарбазид-3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холановых кислот / С. И. Абдуллозода, З. Дж. Назарова, Р. О. Рахмонов, Ю. Ходжибоев // XVIII Нумановские чтения. - Душанбе, 2023. - С. 135-138.

159. Абдуллозода, С.И. Синтез и исследование тиосемикарбазид-

3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холановых кислот / С. И. Абдуллозода, Р. О. Рахмонов, Ю. Ходжибоев // XIX Нумановские чтения. - Душанбе, 2024 С.125-128.

160. Абдуллозода, С.И. Синтез и исследование изопропиловых эфиров холановых кислот / С. И. Абдуллозода, А. Х. Кадыров, Н. Ю Самандаров, Х. С. Рахимова // Наука и мир. Международный научный журнал. – 2020. № 10 (86). - С. 30-33.

161. Абдуллозода, С.И. Синтез свойства пропиловых и изопропиловых эфиров на основе холановых кислот / С. И. Абдуллозода, М. М. Муродова // Вестник Таджикского национального университета. Серия естественных наук. – 2020. - № 3. - С. 205-211.

162. Абдуллозода, С.И. Модификационный синтез на основе 3 α ,7 α -ди-ацетокси-5 β -холановой кислоты / С. И. Абдуллозода, Б. С. Ёрова, Г. З. Пиров, А. А. Нурмадзода // Вестник науки. Международный научный журнал. – 2021. - № 10 (43). - С. 130-136.

163. Абдуллозода, С.И. Синтез и свойства ряда производных холановых кислот и метиловых эфиров / С. И. Абдуллозода, А. А. Нурмадзода, Г. З. Пиров // Вестник Томского государственного университета. Химия. – 2021. - № 21. - С. 42-48.

164. Абдуллозода С.И. Синтез некоторых производных холановых кислот на основе тиосемикарбазидов / С. И. Абдуллозода, З. Дж. Назарова, М. П. Султонмамадова [и др.] // Наука и мир. Международный научный журнал. – 2022. - № 9 (109). - С. 35-38.

165. Абдуллозода, С.И. Синтез химических превращений 6-хлор-2-метилбензо(β)тиофен-1,1-диоксид-гидразида 3 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холановых кислот / С. И. Абдуллозода, Г. З. Пиров, З. Дж. Назарова // Вестник науки. Международный научный журнал. – 2023. - № 6 (63). - С. 933-937.

166. Абдуллозода, С.И. Синтез и химические превращения на основе 3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты / С. И. Абдуллозода // Вестник Томского государственного университета. Химия. - 2022. - № 28. - С. 34-38.

167. Абдуллозода, С.И. Изучение противомикробной активности

некоторых тиосемикарбазидов холановой кислоты / С. И. Абдуллозода, Р. О. Рахмонов // Международная научно-практическая конференция, посвящённая «Реализации Стратегии развития точных и математических наук на 2020-2040 годы и Государственной целевой программе развития математических, точных и естественных наук на 2021-2025 годы». – Худжанд, Институт промышленности и сервиса, 2025. - С. 221-225.

168. Пат. ТЈ № 662 (Республика Таджикистан). Тиосемикарбазид $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидрокси- 5β -холановой кислоты, обладающий противомикробной активностью / С. И. Абдуллозода, З. Дж. Назарова, М. П. Султонмамадова [и др.]. - Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Таджикистан от 2022 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ



Республика Таджикистан

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) Описание изобретения К МАЛОМУ ПАТЕНТУ

(21) 2201621

(22) 07.01.2022

(46) Бюл. 186, 2022

(71)(73) Абдуллозода С.И. (ТJ)

(72) Абдуллозода С.И. (ТJ); Акилова М.М. (ТJ); Назарова З.Дж. (ТJ); Султонмамадова М.П. (ТJ); Рахмонов Р.О. (ТJ); Кобилов Н.К. (ТJ); Нурмадзода А.А. (ТJ)

(54) ТИОСЕМИКАРБАЗИД 3 α ,7 α ,12 α -ТРИГИДРОКСИ-5 β -ХОЛАНОВОЙ КИСЛОТЫ, ОБЛАДАЮЩИЕ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

(56) 1. Кадыров А.Х., Мироджов Г.К., Назарова З.Дж., Махкамova Б.Х., Султонмамадова М.П., Самандаров Н.Ю., Абдурахимова М.К. // 3-хлорбензо[б]тиофен-2-карбоновой кислоты, обладающей антибактериальной активностью// Малый Патент РТ № ТJ 583. 2013 г.

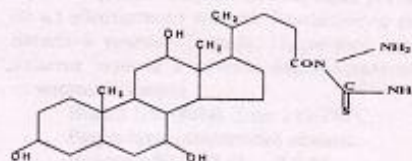
2. Кадыров А.Х., Махкамova Б.Х., Самандаров Н.Ю., Назарова З.Дж., Кадыров Ш. А., Султонмамадова М.П. // 12 α -тозилоксиэфир-3 α ,7 α -диаци-токси-5 β -метилхолановой кислоты в качестве противомикробного средства// Малый Патент РТ № ТJ 662.2014г.

(19) ТJ (11) 1284

(51) МПК: C07J9/00

(57) Изобретение относится в области органической химии для стероидных соединений в частности синтеза новых биологически активных химических соединений, которые проявляют антибактериальность по отношению к полевым культурам: (стафилококка, нокардии, коринебактерии, пастареллы, выделенных от животных, заболевшие респираторными заболеваниями).

Тиосемикарбазид 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-5 β -холановой кислоты, структурной формулы,



РЕСПУБЛИКА ТАДЖИКИСТАН

ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

МАЛЫЙ ПАТЕНТ

№ TJ 1284

на изобретение

*Тиосемикарбазид 3 α , 7 α , 12 α - тригидроксн -5 β -холановой кислоты,
обладающие противомикробной активностью*

Патентообладатель Абдуллозода С.И.

Страна Республика Таджикистан

Автор (ы) Абдуллозода С.И., Акилова М.М., Назарова З.Дж.,
Султонмамадова М.П., Рахмонов Р.О., Кобилов Н.К., Нурмадзода А.А.

Приоритет изобретения 07.01.2022

Дата подачи заявки 07.01.2022

Заявление № 2201621

Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Республики Таджикистан

9 августа 2022

Малый
патент действителен с 7 января 2022 г. по 7 января 2032 г.

