

**АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ ТАДЖИКИСТАН
ИНСТИТУТ ХИМИИ ИМ. В.И. НИКИТИНА**

На правах рукописи

Султонмамадова Майна Парвонаевна

**СИНТЕЗ НА ОСНОВЕ $3\alpha,12\alpha$ -ДИГИДРОКСИ- И
 $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -ТРИКЕТОХОЛАНОВОЙ КИСЛОТЫ**

02.00.03 – Органическая химия

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор **Кадыров**
Абдурахмон Хафизович

Душанбе – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Список сокращений.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА I. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА СТЕРОИДОВ РЯДА ХОЛАНОВЫХ КИСЛОТ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	12
1.1. Известные пути синтеза ряда производных холановых кислот.....	13
1.2. Область применения холановых кислот и их некоторых производных.....	21
1.3. Газохроматографическое определение холановых кислот в некоторых биологических объектах.....	26
ГЛАВА II. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ХОЛАНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ В РЕАКЦИЯХ РАЗЛИЧНОГО ХАРАКТЕРА (ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ).....	30
2.1. Синтез сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидрокси и 3 α ,7 α ,12 α - трикетохолановых кислот.....	32
2.2. Поведение сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты в реакции ацилирования	45
2.3. Окисление ацилпроизводных некоторых сложных эфиров холановых кислот.....	51
2.4. Синтез оксиаминопропиловых эфиров 3 α ,12 α -дигидрокси- холановой кислоты.....	56
2.5. Исследование некоторых гидразидов холановых кислот в реакциях нуклеофильного замещения.....	63
ГЛАВА III. ПОИСК ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	69
3.1. Изучение противомикробной активности некоторых гидразид- производных холановых кислот.....	69

3.2. Исследование холелитолитических и гепатопротективных свойств пропан-1,2-диолового эфира 3 α ,7 β -дигидрокси-лановой кислоты.....	73
3.3. Использование газохроматографических результатов по определению содержания холановых и жирных кислот в диагностике жировой болезни печени.....	75
ГЛАВА IV. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	85
4.1. Техника эксперимента, растворы и реактивы.....	85
4.2. Выделение 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты-(IV) по [163].....	87
4.3. Выделение 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты (II) по [163].....	88
4.4. Синтез 3 α -гидроксихолановой кислоты (I) по [163].....	88
4.5. Синтез 3 α ,7 α -дигидроксихолановой кислоты (III) по [163].....	89
4.6. Синтез 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты (V) по [163].....	89
4.7. Синтез метилового эфира 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты (IX) по [50].....	90
4.8. Синтез метилового эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты (XI).....	90
4.9. Синтез метилового эфира 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты (XVI).....	91
4.10. Синтез 3-ацето 12-гидрокси метилового эфира холановой кислоты (XXIII).....	91
4.10.1. Получение гидразида 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты (XLII) по [55].....	92
4.10.2. Получение этилового эфира пара-амино-фенил-2-оксипропилового эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты (XXXVII).....	92
4.10.3. Получение 3-хлорбензо(b)тиофен-2-карбоксии гидразида 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты (XLIV).....	93
4.10.4. Синтез пропан-1,2-диоловый эфир 3 α ,7 β -дигидрокси-	

холановой кислоты (XXI).....	93
4.10.5. Синтез 3-хлорбензо b тиофен-2-карбокси гидразид-3 α , 7 α -дигидрокси-12-кетохолановой кислоты (XLIX).....	94
4.10.6. Синтез 12 α -тозилоксиэфира 3 α ,7 α -диацетокси-5 β - метилхолановой кислоты (XXII).....	94
4.10.7. Получение пропилового эфира 3 α ,7 α ,12 α - трикето- холановой кислоты по [163].....	95
4.10.8. Синтез 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты из 3 α -ацето, 12 α -гидроксиметилхолата по [44].....	95
4.10.9. Синтез 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты из 3 α ,12 α -дигидрокси-7-кетометилхолата по [56].....	96
4.10.10. Синтез 3 α -ацето-12 α -кетометилхолата (XXVIII), исходя из 3 α -гидрокси-12 α -кетометилхолата по [122].....	97
ВЫВОДЫ	98
ЛИТЕРАТУРА	100

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;

ИК - инфракрасный (спектр);

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;

TSC1 - пара-толуолсульфохлорид.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. 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 производные холановых кислот, как 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-, 3 α ,7 α -дигидрокси-, 3 α ,12 α -дигидрокси-, 3 α -гидрокси- и 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановые кислоты, содержащие гидроксильные группы, легко окисляемые до кетогрупп, а также их ацилпроизводные, что дает ряд возможностей получения новых производных холановых кислот, которые могут проявлять свойства холелитолитических, противовоспалительных, антимикробных, гепатопротективных препаратов и поликатионных амфифилов [1-10].

Холановые кислоты являются C₂₄-стероидами с холановым скелетом, который может быть получен из перегнана присоединением к C₂₀-атому n-пропилового радикала или отщеплением от холестанового скелета конечной изопропильной группы в C₁₇-боковой цепи (в действительности последнее кажется более убедительным, так как холановые кислоты являются метаболитами холестерина). Надо отметить, что во всех главных производных кольцах А и В находятся в цис-положении (5 β -холан).

C₂₄-атом несет карбоксильную функцию. Гидроксильные группы (обычно в α -конфигурации) находятся в положениях 3, 6, 7 и 12.

В желчи содержится большое количество холановых кислот (порядка 1-2%), в крови же их содержание примерно на четыре порядка ниже. Определение содержания холановых кислот является важной задачей 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 гиполипидимических препаратов. Весьма хорошим оказался метод модификации структуры уже известных синтетических лекарственных средств на примере стероидов, изучаемых 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 [11-14].

Для этого нахождение наиболее приемлемых условий получения ряда аналогов холановых кислот на примере сложных эфиров, ацилпроизводных, кетопроизводных и замещенных гидразид- и глицидпроизводных, одновременно модификация их строения с целью получения новых стероидов с заданными биологическими свойствами, представляют актуальную задачу в программе развития органической химии.

Поставленная **цель работы** посвящена систематическому исследованию холановых кислот в реакциях различного характера в синтезе эфиров, оксиаминопропиловых эфиров, гидразидпроизводных, ацилпроизводных и кетопроизводных и соединений, с целью выявления их биологической активности, получению доказательств строения полученных продуктов, а также поиску областей применения синтезированных соединений.

Для достижения поставленной цели в работе **решены следующие основные задачи:**

- изучение реакции образования сложных эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидрокси- и $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикетохолановых кислот;
- исследование поведения сложных эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты в реакции ацилирования;

- разработка условий проведения реакции окисления ряда алкилпроизводных 3 α -ацето-12 α -гидроксихолановой кислоты;
- поиск оптимальных условий синтеза оксиаминопропиловых эфиров на основе глицидного эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты;
- изучение поведения гидразидпроизводных и глицидпроизводных некоторых холановых кислот в реакциях нуклеофильного замещения;
- газохроматографическое определение содержания холановых и высших жирных кислот в сыворотке крови;
- поиск путей практического применения синтезированных веществ;

Для достижения поставленной цели выполнены следующие исследования:

- синтезированы различные сложные эфиры 3 α ,12 α -дигидрокси- и 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановых кислот;
- изучена реакционная способность сложных эфиров в условиях реакции ацилирования;
- исследовано поведение сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты в условиях реакции окисления;
- найжены оптимальные условия реакций взаимодействия глицидных эфиров и гидразидпроизводных некоторых холановых кислот с первичными аминами и хлорангидами кислот, с целью последующего изучения противомикробной активности полученных веществ;
- проведено исследование по определению содержания холановых и жирных кислот в сыворотке крови методом газожидкостной хроматографии, с целью применения в установлении диагноза и эффективного лечения жировой болезни печени.

Научная новизна диссертационной работы заключается в следующем:

- найжены пути синтеза сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидрокси- и 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановых кислот с использованием различных спиртов;

-проведены реакции ацилирования различных сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты, где было установлено, что гидроксильная группа в положении у С-12 не затрагивается, а выход продуктов ацилирования при использовании изопропилового и бутилового эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты повышается;

-впервые было исследовано поведение ацилпроизводных сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты в реакциях окисления и установлено, что выходы продуктов окисления увеличиваются при использовании изопропилового и н-бутилового эфиров;

-найлены оптимальные условия синтеза гидразидпроизводных холановых кислот, с целью рассмотрения поведения соответствующих гидразидов в реакциях нуклеофильного замещения с хлорангидридами различных кислот, где показано, что выход гидразидпроизводных увеличивается при использовании хлорангидридов высших жирных кислот.

Практическая значимость работы: 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 3-хлорбензо[b]тиофен-2-карбоксихидразид 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-, 3-хлорбензо[b]тиофен-2-карбоксихидразид 3 α ,7 α ,12 α -трикетон-, 12 α -тозилокси эфир 3 α ,7 α -диацетокси-5 β -метилхолановых кислот проявляют низкую токсичность и выраженную антимикробную активность по отношению к полевым культурам стафилококка, нокардии, пастереллы, коринебактерий, выделенных из животных, заболевших респираторными заболеваниями.

Пропан-1,2-диоловый эфир 3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты проявляет холелитолитическое, гипохолестеринемическое и гепатопротективное свойства.

На защиту выносятся:

-разработанные методики синтеза некоторых сложных эфиров, ацетатных, кетонных, гидразидпроизводных, алкиламинооксипропиловых эфиров 3 α ,12 α -дигидрокси- и 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановых кислот;

-исследования безвредности 12 α -тозилокси эфира 3 α ,7 α -диацетокси-5 β -метил холановой-, 3-хлорбензо[b]тиофен-2-карбоксихидразид 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси- и 3-хлорбензо[b]тиофен-2-карбоксихидразид 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислот. Показано, что указанные соединения проявляют противомикробную активность по отношению к полевым культурам стафилококка, нокардии, пастереллы, коринебактерий, которые выделены из животных, заболевших респираторными заболеваниями.

-изучение холелитолитических, гипохолестеринемических и гипотопротективных свойств пропан-1,2-дионового эфира 3 α ,7 β -дигидрокси-5 β -холановой кислоты;

-результаты газохроматографического определения содержания холановых и жирных кислот в сыворотке крови можно использовать для диагностики и эффективного лечения больных гепатобилиарной системы.

-ряд полученных сложных эфиров холановых кислот можно использовать в качестве эталонных образцов при определении содержания холановых кислот в сыворотке крови у больных с жировой болезнью печени, методом ГЖХ.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на: Республиканской научной конференции «Химия: исследования, преподавание, технология», посвященной «Году образования и технических знаний» (Душанбе, 2010); Международной конференции «Химия производных глицерина: синтез, свойства и аспекты их

применения», посвященной Международному году химии и памяти член-корр. АН РТ, д.х.н., проф. Б.Х.Кимсанова (Душанбе, 2011); Республиканской конференции «Комплексообразование в растворах» (Душанбе, 2012); Республиканской конференции «Перспективы синтеза в области химии и технологии гетеросоединений», посвященной 20-летию кафедры высокомолекулярных соединений и химической технологии (Душанбе, 2013).

Публикации. По результатам диссертационного исследования опубликовано 17 научных работ, в том числе 2 в рецензируемых журналах, включённых в список ВАК РФ, получены 5 патентов Республики Таджикистан.

Вклад автора состоит в постановке задач исследований, выборе способов их решения, синтезе, получении и обработке экспериментальных данных, проведении физико-химических анализов и обобщении результатов эксперимента, формулировке выводов и положений диссертации, в проведении фармако-биохимических исследований.

Структура и объём работы. Диссертационная работа состоит из введения, четырёх глав, основного текста, выводов, списка использованной литературы из 171 наименования. Диссертационная работа изложена на 121 страницах компьютерного набора, включает 13 рисунков и 12 таблиц.

ГЛАВА I. СИНТЕЗ И СВОЙСТВА СТЕРОИДОВ РЯДА ХОЛАНОВЫХ КИСЛОТ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

Исследования по разработке и усовершенствованию методов синтеза новых производных холановых кислот, изучению их реакционной способности и методов функционализации, а также поиск областей возможного практического применения соединения этого ряда является весьма перспективным. Технология синтеза таких соединений и их отходы должны быть экологически безвредными и при попадании в окружающую среду легко усваиваться микроорганизмами [15].

В связи с этим проведение модификационного синтеза различных производных холановых кислот продолжает оставаться одним из приоритетных направлений развития химии стероидов.

Проведение исследований в области химии стероидов, в частности, производных холановых кислот, которые являются интересными потому, что эти соединения могут быть использованы для получения холелитических препаратов и уже используются в полусинтезе некоторых гормонов [16,17,18,19].

Недавно на основе $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ –тригидроксихолановой кислоты были получены катионные стероидные антибиотики, которые взаимодействуют с липидом А и обладают как бактериостатической, так и бактерицидной активностью [20].

В организме холановые кислоты и их соли способствуют гидролизу жиров [21].

Известно, что при желчнокаменной болезни происходит нарушение метаболических процессов холестерина и одновременно изменяется содержание холановых кислот, которые под воздействием фермента 7α -гидроксилазы образуются из холестерина [22], одновременно ряд холановых

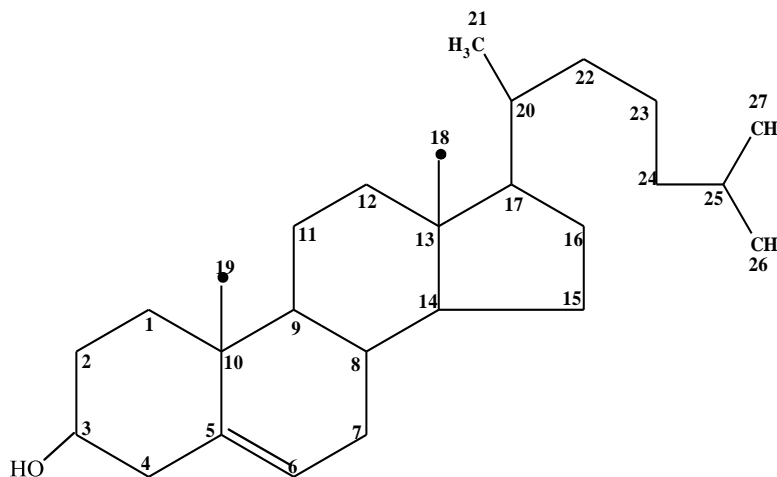
кислот являются холелитолитическими препаратами при лечении желчнокаменной болезни.

Синтезу новых аналогов холановых кислот посвящено незначительное количество работ [23-27].

Далее рассматриваются сведения о методах синтеза некоторых производных холановых кислот путём модификации их карбоксильных, кетонных и других функциональных групп, а также их анализов в биологических жидкостях.

1.1. Известные пути синтеза ряда производных холановых кислот

Стероиды широко распространены в живой природе. Спирты-стерины (стеролы, у которых X-OH, R-углеводородный остаток), находятся в животных и растительных тканях и составляют до 7% холестерина в расчете на сухую массу. Они входят в состав животных жиров.



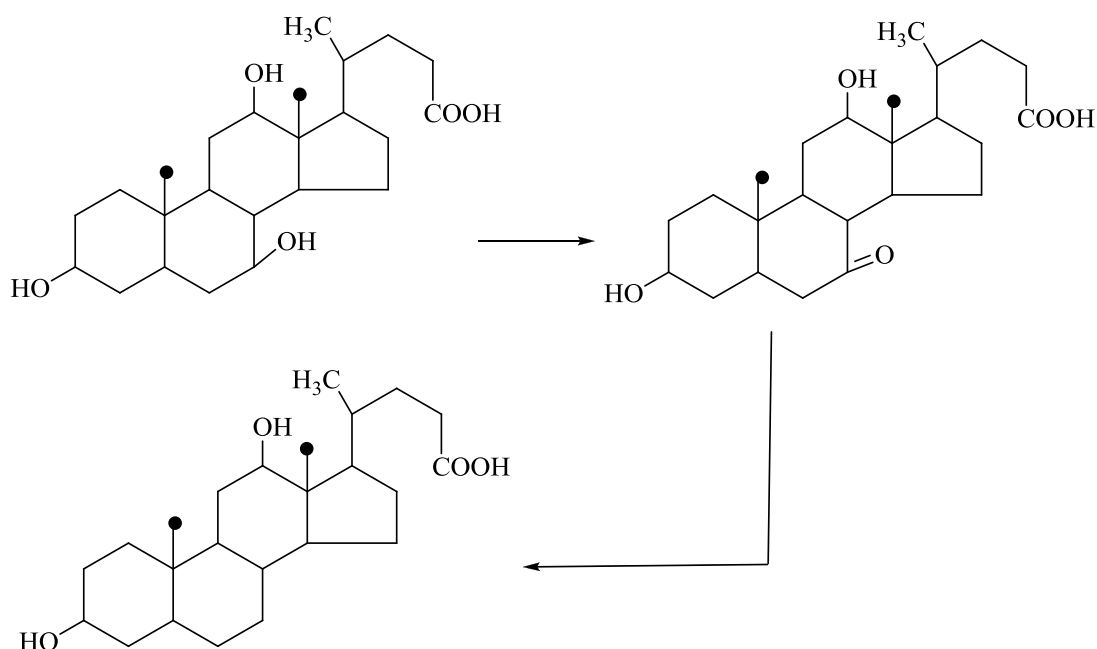
Из холестерина в организме образуются очень важные в биологическом отношении вещества (стероидные гормоны, холановые кислоты).

Экспериментально показано, что укорачивание боковой цепи холестерина наиболее интенсивно происходит в печени, то есть в органе, где образуются холановые кислоты.

Ранее было известно выделение $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты из различных природных источников [28,29].

Есть сведения о том, что модифицированные 8-аза-стероиды проявляют биологическую активность в качестве регулятора иммунного ответа [30].

Существует мнение о том, что при метаболических процессах $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановые кислоты подвергаются различным конъюгациям. Оно превращается под действием кишечной микрофлоры и в результате образуются 7-кето-литохолевая или литохолевая кислоты:

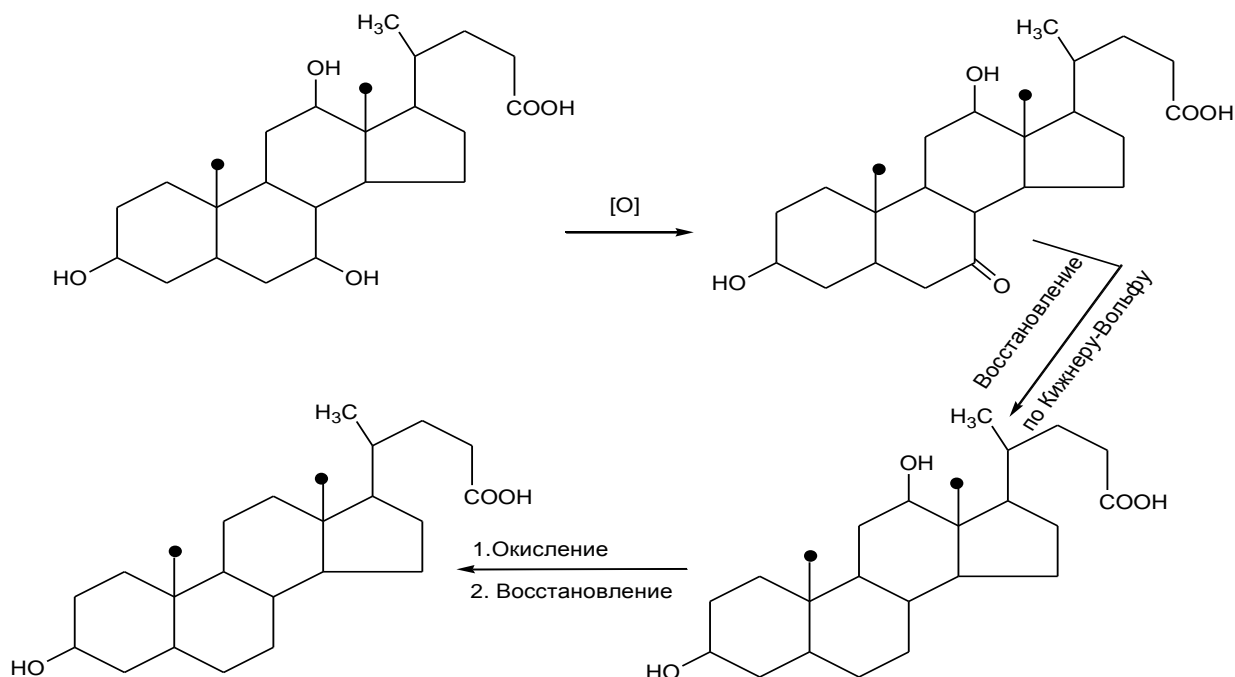


Литохолевая кислота подвергает разрыву ДНК, проявляет комутагенные свойства и приводит к поражению желчных протоков, печеночной недостаточности [31, 32]. У практически здоровых людей до 41% $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановой кислоты превращается в 3α -гидроксихолановую кислоту в течение 2 ч инкубации *in vitro* и до 100% *in vivo* в течение от 12 до 24 час [33].

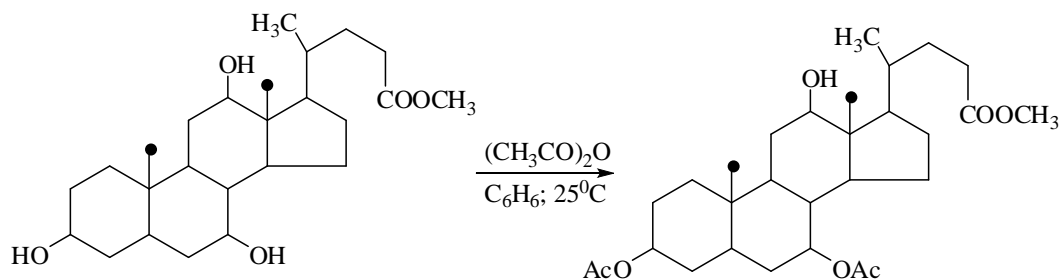
В результате окисления аксиальный гидроксил в положение 7α окисляется гораздо легче, поэтому его можно окислить до карбонила, а затем

по Кижнеру-Вольфу восстановить до CH_2 -группы, в результате чего получается $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановая кислота [29].

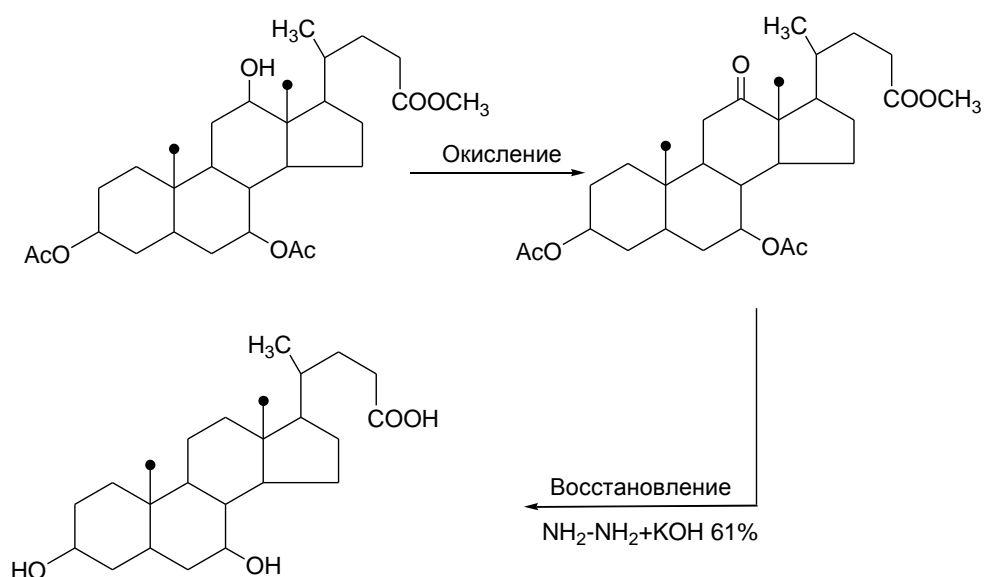
При повторении такой операции то же произойдет с гидроксилом в положении 12 и получится 3α -гидроксихолановая кислота.



Избирательное ацилирование в положениях $3\alpha,7\alpha$ - в молекуле $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидроксихолановой кислоты происходит при использовании уксусного ангидрида в среде бензола в присутствии сухого пиридина при 25°C [34].

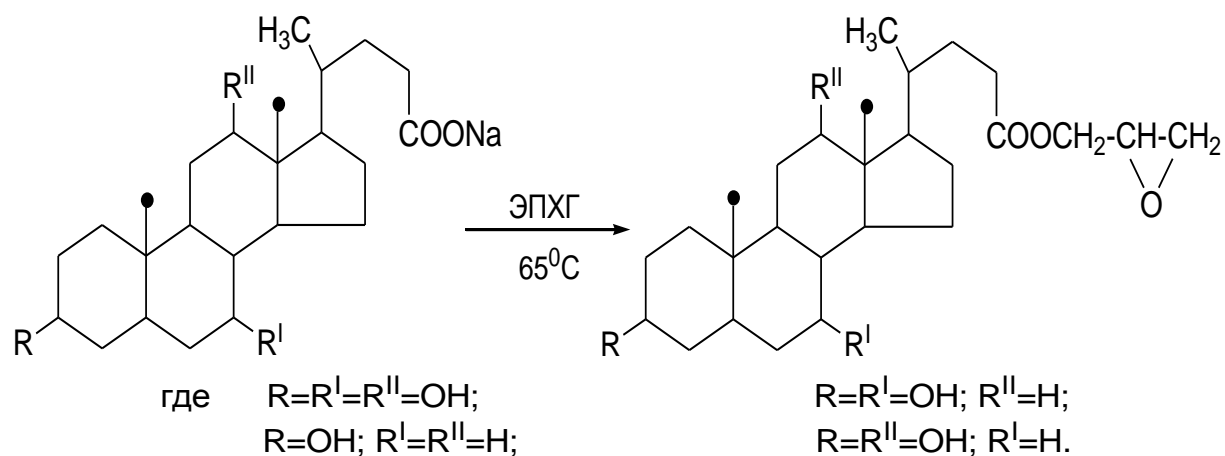


Далее окисление OH -группы у C-12 и восстановление приводит к образованию $3\alpha,7\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты [35-36].



Для удаления желчных камней есть и другой способ кроме хирургического вмешательства. Это, растворение химическим путем холестериновых желчных камней [37, 38].

Другие исследователи с целью получения холелитолитических препаратов синтезировали моноглицидные эфиры холановых кислот. Авторы с использованием натриевых солей холановых кислот и эпихлоргидрина получили моноглицидные эфиры [39-40].



Есть сведения по развитию исследований по синтезу стероидных катионных амфифилов [3, 6]. Авторы описывают в данных работах получение новых представителей класса катионных амфифилов на основе

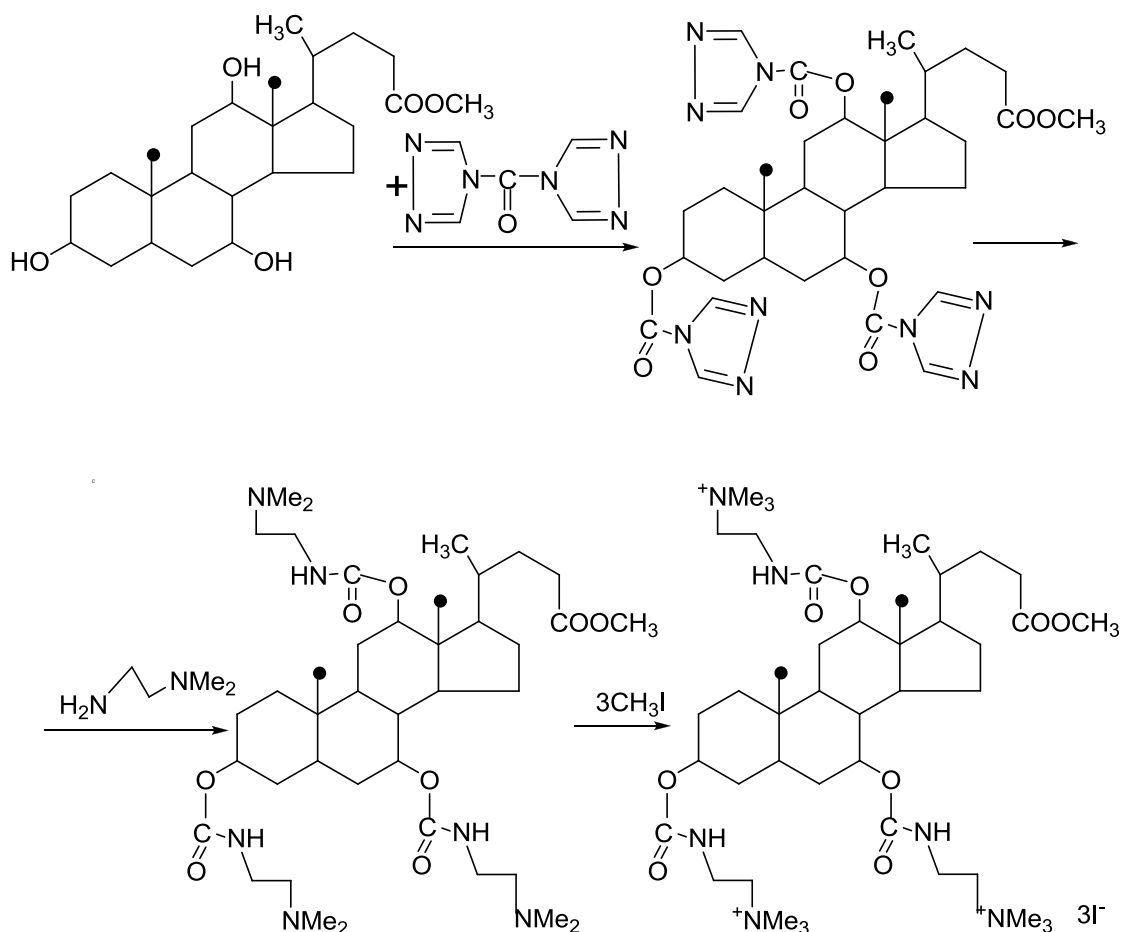
3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты, в которых положительно заряженные группировки прикреплены к гидрофобному стероидному остову через линкеры различной природы. Используемая 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановая кислота, является полифункциональным соединением, позволяет синтезировать поликатионные амфифилы, содержащие несколько положительно заряженных групп.

В качестве исходного соединения использовали метиловый эфир 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты, что обеспечивало защиту карбоксильной группы при проведении последующих превращений.

При взаимодействии метилхолата с 1,1'-карбонилимидазолом в дихлорметане в присутствии триэтиламина был получен трисимидазолид с выходом 49%. Наряду с трисимидазолидом выделен 3 α ,7 α -бисимидазолид (выход 18%), обладающий меньшей хроматографической подвижностью.

Взаимодействие трисимидазолида с N,N-диметилэтилендиамином в дихлорметане давало третичный амин с выходом 34%. Дальнейшая кватернизация последнего метилиодидом при 80⁰С в метилэтилкетоне приводит к образованию катионного липида с выходом 99%.

В последнее десятилетие проводится интенсивное изучение новых представителей класса катионных амфифилов липидной природы с целью выявления взаимосвязи структура - биологическая активность [41].



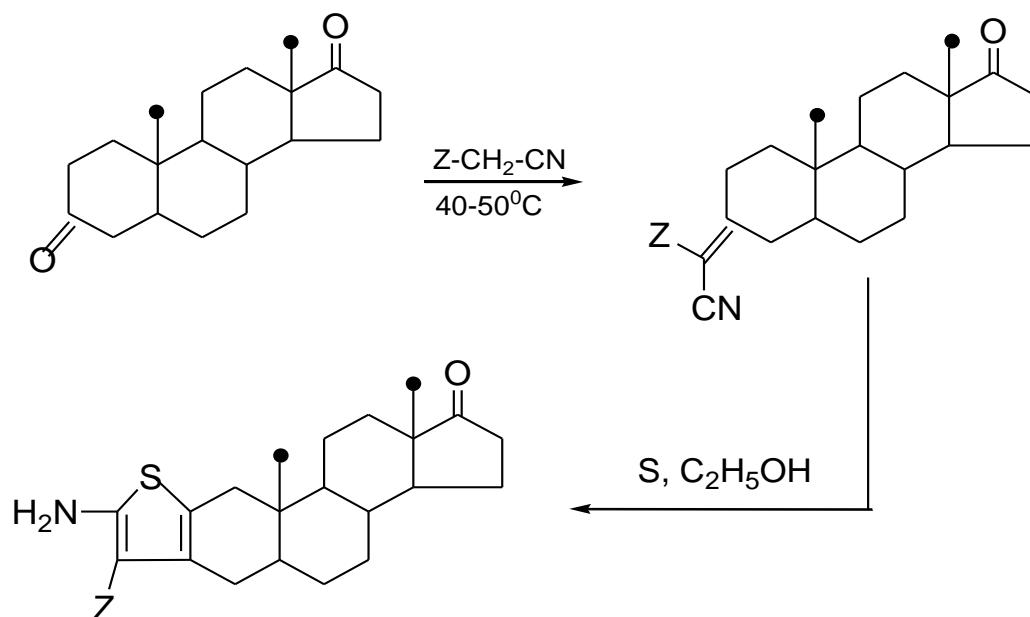
В последние годы появились новые производные холановых кислот на примере конъюгатов жирных кислот и холановых кислот (FABAC). Эти препараты увеличивают солюбилизацию холестерина в желчи и растворение желчных камней.

Первый родоначальник этих препаратов назвали «Арамхол». Этот эфир образуется из холановой, арахидоновой кислот, проявляет литолитические свойства и одновременно является гипохолестеринемическим и гиполипидемическим препаратом.

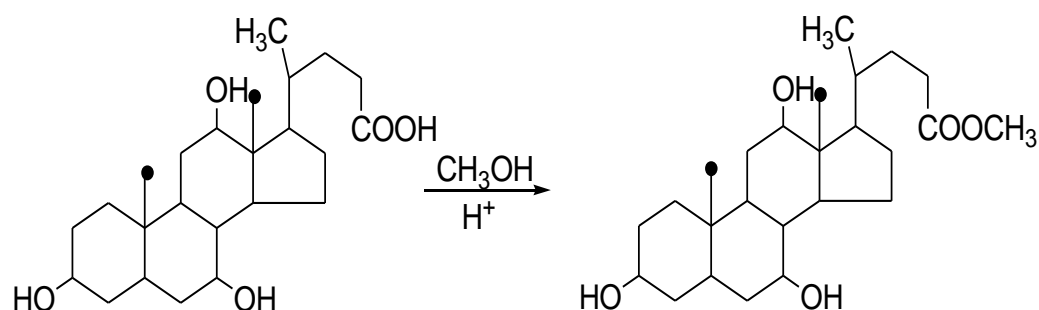
Растворение желчных камней при употреблении Арамхола проходит быстрее, чем на фоне терапии 3 α ,7 β -дигидрохолоановой кислотой [42-47].

Шаранин и Гренев [48-49] проводили реакцию между кетостероидом и циануксусным эфиром по Гевальду, в данном случае реагирует только одна кетогруппа. 2'-аминоандрост-2-ено[2,3-в]тиофен-3'-карбоновой кислоты был

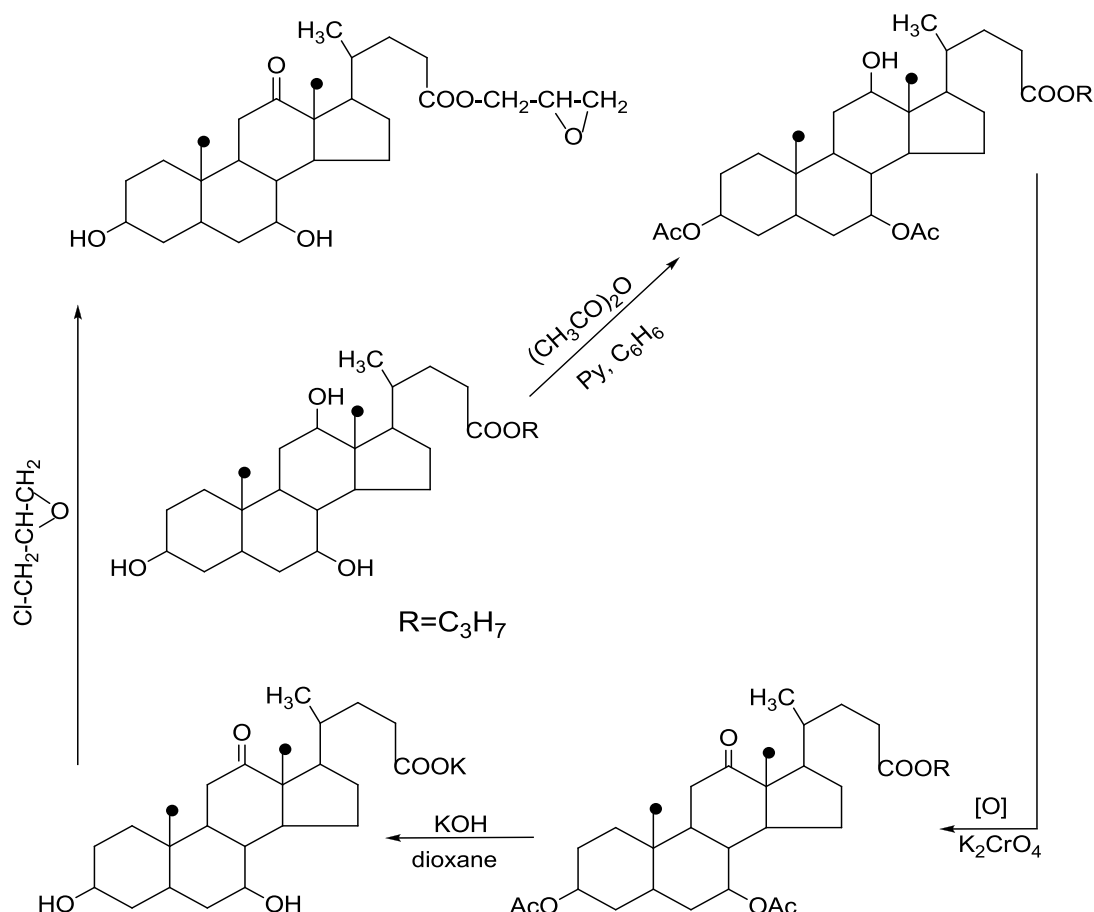
получен при нагревании (50°C ; 1ч.) соотношение реагирующих веществ 1:1 где $Z=\text{CN}$, COOC_2H_5 .



Известно, что сложные эфиры некоторых холановых кислот получают нагреванием кислот с большим избытком спирта и следами минеральных кислот в качестве катализатора [50].

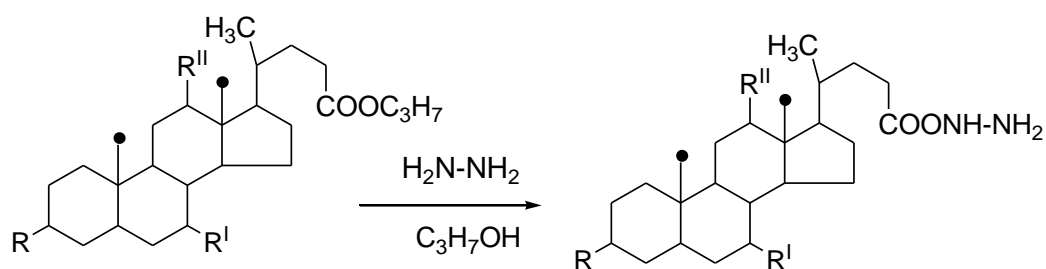


Далее авторы изучали химические свойства синтезированных сложных эфиров в реакциях различного характера [51].



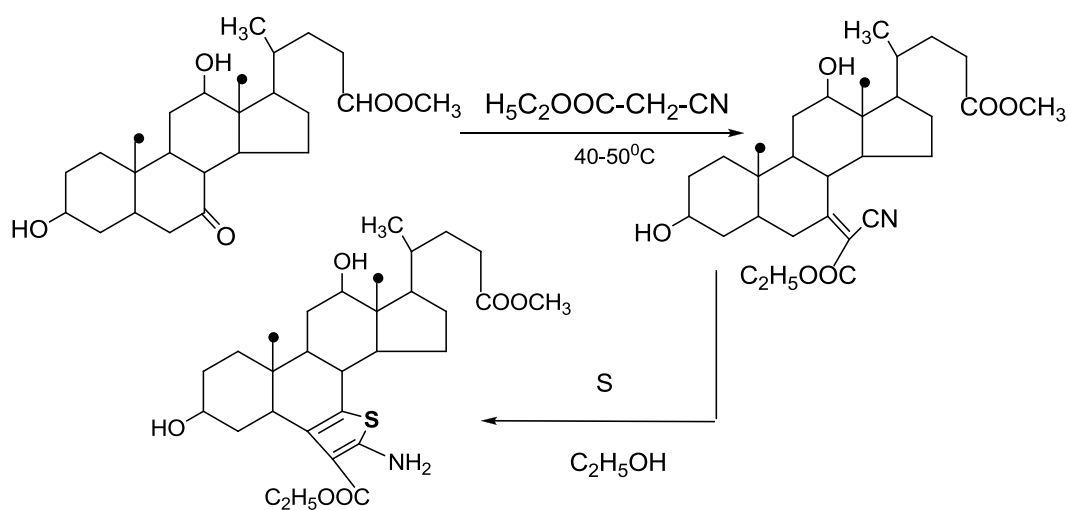
Для получения физиологически активных веществ, некоторые авторы [52,53,54] предприняли попытки провести функционализацию ряда холановых кислот путём введения по карбоксильной и гидроксильной группам остатков различных органических молекул.

Другие исследователи рассматривали поведение ряда сложных эфиров холановых кислот в реакциях гидразидирования [55]. Поиск оптимальных условий реакции гидразидирования показал, что лучше проводить реакцию в среде пропилового спирта при температуре кипения спирта с использованием гидразингидрата в качестве гидразидирующего агента.



где $R=R^I=R^{II}=H, OH, O$.

С целью получения стероидов, имеющих в своей молекуле фрагмент гетероциклических соединений (типа холановых кислот), проявляющих биологическую активность, рядом авторов [56, 57, 58, 59, 60, 61] был проведен целенаправленный синтез подобных соединений. Они осуществили синтез гетероциклических соединений, включающих остатки природных холановых кислот. Подобный процесс проводили в условиях реакции Гевальда.



1.2. Область применения холановых кислот и их некоторых производных

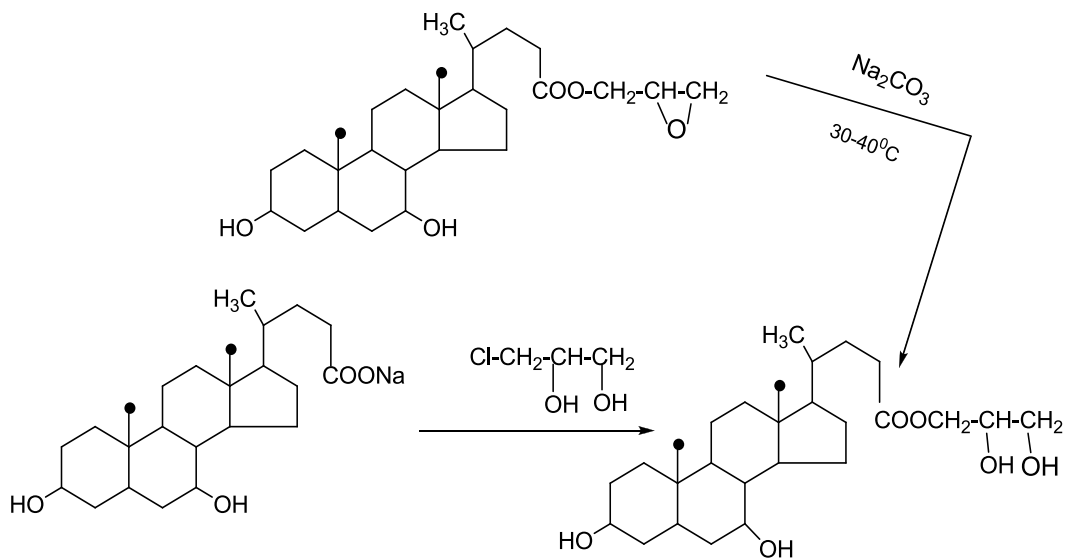
Проблема лечения желчнокаменной болезни в сфере здравоохранения стала одной из приоритетных задач, которые могут быть решены путем создания эффективных холелитолитических препаратов, а также путем

постоянного контроля за изменением содержания холановых кислот в желчи и сыворотке крови и одновременно состава этих стероидов в организме.

Разработка наиболее приемлемых способов получения производных стероидов, типа холановых кислот, а также высших жирных кислот, на основе использования их карбоксильных, кетонных, гидроксильных и эфирных групп открывает новое направление в химии и фармако-биохимической области, которое позволяет направленно создавать новые препараты для генной терапии, а также гепатологии.

Поскольку природные холановые кислоты могут являться средством лечения желчнокаменной болезни, исследования были направлены на поиск путей их применения в медицинской практике, а также выявления взаимосвязи их структуры и биологической активности.

При этом авторы [62] осуществляли получение 1,2-пропандиолового эфира $3\alpha,7\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты. Оказалось, что продукт по строению близок к известным литолитическим препаратам. Последний синтезировали путем взаимодействия натриевой соли $3\alpha,7\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты с α -монохлорглицерином, осуществляемого при температуре $65-70^\circ\text{C}$ в течение 12-13 часов [63-64].

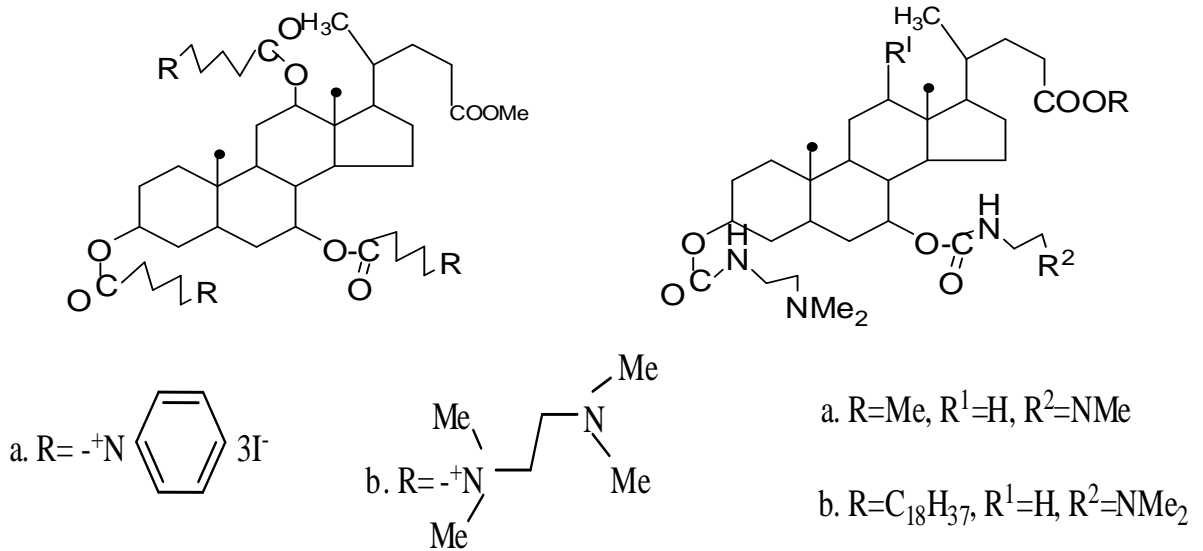


Авторами был разработан синтез составляющих компонентов «Триоин»-а исходя из сложных эфиров пеларгоновой – окатановой, 3 α ,7 α -дигидроксихолановой кислот, с целью изучения его способности растворять холестериновые камни. Смесь этих трех веществ назвали «Триоин» [65-70]. Раствор «Триоин»-а (in vivo) и (in vitro) обладает хорошим литолитическим свойством по отношению к холестериновым и пигментным камням желчного пузыря и желчных протоков.

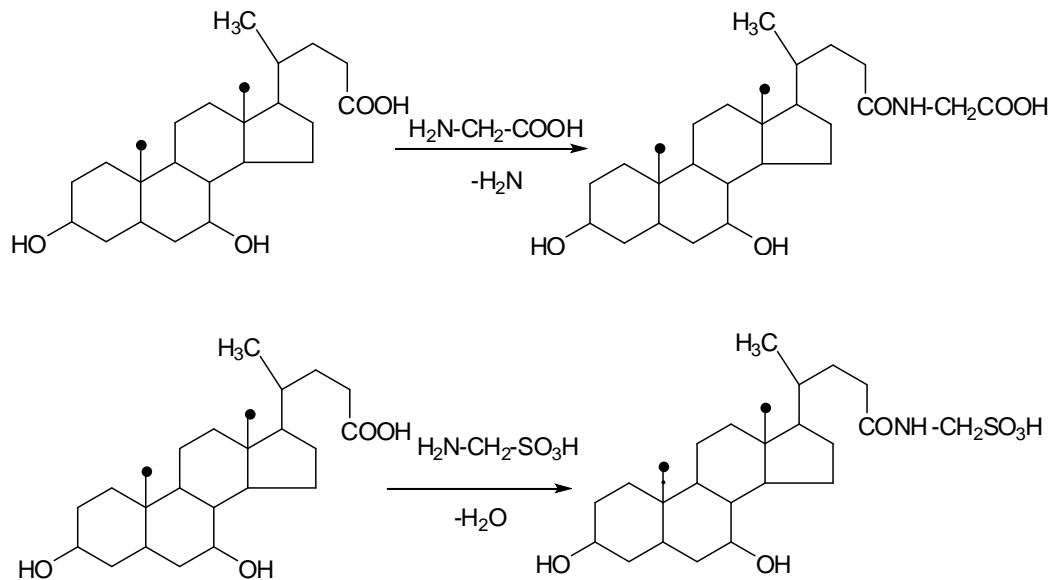
За последнее годы возрос интерес к принципиально новым технологиям, позволяющим осуществлять адресную доставку новых блоков генетической информации в дефектные клетки для последующей экспрессии. В медицинской практике встречаются патологии, которые непосредственно связаны с нарушениями функционирования генов [71-72].

Среди используемых в настоящее время катионных липидов различных типов заметное место занимают соединения, гидрофобная часть которых представлена производными стероидного ряда. В ходе исследований было установлено, что структура стероида оказывает существенное влияние на эффективность трансфекции ДНК [73-74].

Например, катионные амфифилы на основе 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты используются для трансфекции эукариотических клеток, при этом присутствие аминогруппы на стероидном остове способствует проникновению нуклеиновых кислот в клетку [75-76].



Авторы [77] утверждают, что насыщение желчи $3\alpha,7\alpha$ -дигидроксихолановой кислотой приводит к уменьшению литогенности.



Кишечно-печеночная циркуляция солей холановых кислот протекает настолько эффективно, что суточная потеря холановых кислот с фекалиями составляет не более 1000 мг. После того, как синтезируются первичные холановые кислоты из холестерина, они конъюгируются с глицином и таурином и активно секретятся в желчные каналцы [78].

Синтез холестерина во всех клетках происходит из мевалоната, который образуется из ацетилкоэнзима-А, конечного продукта β -окисления жирных кислот под действием фермента ГМГ-КоА-редуктазы [79].

В последние годы в клиническую практику был введен первый представитель нового класса препаратов - секвестрантов холановых кислот - холестерамин. Эти препараты (также колестипол и колесевелам) усиливают, процесс уменьшения всасывания холановых кислот на 40% и на 26% снижают содержание ЛПНП в плазме [80].

При лечении больных с желчнокаменной болезнью $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановой кислотой выяснилось, что это кислота быстрее, чем $3\alpha,7\alpha$ -дигидроксихолановая кислота, несущая желчь, особенно на протяжении 3-х месяцев. Во время терапии наблюдалось улучшение функции желчного пузыря, изменение размеров конкрементов [81-82].

Газохроматографическое определение содержания холановых кислот в желчи у больных с желчнокаменной болезнью на фоне терапии, показало, что при этом увеличивается содержание $3\alpha,7\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты при одновременном снижении концентрации $3\alpha,12\alpha$ -дигидрокси- и $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановой кислот, которые в организме метаболизируются с образованием 3α -гидроксихолановой кислоты, подвергающей разрыву ДНК. Она проявляет комутагенные свойства, усиливает трансформацию клеток и проводит к печеночной недостаточности [83-84].

Известно, что в широких клинических исследованиях используют $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановую кислоту. Она оказалась единственной холановой кислотой, применение которой для лечения холестаза и желчных камней является эффективным и безопасным [85].

Доказано, что использование $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановой кислоты ведет к образованию в желчи слоистой жидкокристаллической фазы, способствующей растворимости холестерина.

При назначении в дозе 10-13 мг/кг/сут в течение 2-лет она растворяет холестериновые камни размером до 15 мм у 60% больных [85].

Лечение наиболее эффективно при камнях диаметром 5мм, которые растворяются более чем у 70% больных.

На пациентов, получивших специальный отбор, этот метод лечения оказывает достаточный эффект, а главные действия легко поддаются коррекции [86].

Использование всего многообразия некоторых стероидов показало, что лишь $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановая кислота уменьшает размеры холестериновых камней, находящихся в желчном пузыре [87-88]. Иногда ее назначают для профилактики повторного возникновения камней, при билиарном циррозе и первичном склерозирующем холангите [89].

Обобщая известные данные по изучению холелитолитических свойств холановых кислот, надо отметить, что они являются особым методом лечения у больных с желчнокаменной болезнью. Поиск холелитолитических, гепатопротективных и гиполипидемических препаратов на основе стероидных соединений (типа холановых кислот) остается одной из важных проблем для специалистов проводящих исследования в этой области.

1.3 Газохроматографическое определение холановых кислот в некоторых биологических объектах

На современном этапе развития науки проблема диагностики и эффективного лечения желчнокаменной болезни и других патологий печени является сложной, многоплановой и актуальной в связи с постоянно прогрессирующим ростом заболеваемости, и привлекает внимание фармакологов, химиков, биохимиков, клиницистов и других специалистов, занимающихся в этой области.

Анализ данных литературы показывает, что имеются незначительные сведения о количественном составе холановых кислот в желчи и других биологических жидкостях у больных желчнокаменной болезнью при различных патологиях печени, а также при стеатозе печени и стеатогепатитах.

В патогенезе неалкогольной жировой болезни печени немаловажную роль играют синтез и энтерогепатическая циркуляция холановых кислот. Результаты наших исследований показывают, что как при стеатозе, так и при стеатогепатите достоверно повышается содержание как первичных, так и вторичных холановых кислот [90-91].

Преобразование холестерина в холановых кислотах осуществляется в гепатоцитах и считается одной из важных и специфических функций печеночных клеток. Следовательно, уровень холановых кислот сыворотки при различных поражениях печени отражает степень нарушения их синтеза печенью, а данные об их количественном составе могут служить ценной информацией о функциональном состоянии гепатоцитов [92].

Значение определения содержания желчных кислот в диагностике жировой болезни печени заключается в том, что сдвиги в содержании желчных кислот в сыворотке крови у больных жировой болезнью печени наступают раньше, чем изменения других показателей функционального потенциала печени, в связи с чем они являются более чувствительными тестами [93, 94, 95].

Количество и соотношение отдельных желчных кислот отражают функциональное состояние гепатоцитов и зависят от степени заболеваемости при жировой болезни и циррозе печени.

С целью доказательства проводимых экспериментов на основе полученных результатов авторы построили график содержания холановых кислот в зависимости от стадии неалкогольной жировой болезни печени.

Таким образом, показано, что в сыворотке крови больных стеатозом и стеатогепатитом по сравнению с контролем значительно возросло содержание желчных кислот за счет активации процесса гидролиза холиеновых кислот [96].

С целью биохимических исследований по изучению способности растворять желчные камни настойки «Рамит», необходимо было установить

концентрацию холановых кислот в желчи методом ГЖХ, т.к. определение содержания желчных кислот в желчи показывает правильную информацию о характере болезни у животных с различными заболеваниями печени и желчевыводящих систем [97,98,99].

Ряд исследователей газохроматографическими методами установили содержание холановых кислот до и после введения определенной концентрации раствора настойки «Рамит» у экспериментальных животных.

До получения настойки «Рамит» количество (мг/мл) $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой-0,35; $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси-0,98; $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидроксихолановой кислот-0,87, а в контрольной группе на хроматограмме содержание $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой-0,44; $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси - 1,02; $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидроксихолановой кислот -0,64 [100-101].

Ряд исследователей проводили сравнение газохроматографических данных по определению холановых кислот в желчи людей и у собак [102, 103, 104].

Известны результаты определения содержания первичных и вторичных холановых кислот в желчи у больных с желчнокаменной болезнью, при этом проводили расчет по их сумме и составляли их соотношение в желчи [105-108]. Был показан отличительный характер содержания холановых кислот в желчи у больных холелитиазом на различных стадиях его развития [109-112].

Другие авторы разработали новый способ определения содержания холестерина в плазме крови практически здоровых лиц и больных газохроматографическим способом [113].

Установлена зависимость содержания холестерина у больных на различных этапах литогенеза.

Известны и другие работы [114], в которых газохроматографическим способом определялось содержание желчных кислот в сыворотке крови. Выявлены достоверные закономерности по зависимости содержания желчных кислот от холестерина при патологии печени и желчного пузыря.

Вышеперечисленными авторами были изучены уровень метаболизации желчных кислот и холестерина в сыворотке крови больных циррозом печени, который отражает функциональное состояние гепатоцитов, усиливающийся при клеточно-печеночной недостаточности. Установлено, что более значительные изменения при циррозе печени претерпевает содержание холевой кислоты по сравнению с другими желчными кислотами [115].

До сих пор недостаточно изученными остаются вопросы газохроматографического исследования желчно-кислотного обмена больных метаболическим синдромом под влиянием различных препаратов.

В задачу ряда авторов входило изучение влияния урсодезоксихолевой кислоты и сиафора на характер изменения содержания желчных кислот при метаболическом синдроме [116].

Газохроматографическое исследование содержания холановых кислот показывает, что при терапии больных метаболическим синдромом урсодезоксихолевой кислотой+сиафор концентрация холановых кислот снижается до уровня контрольного значения. Полученные результаты свидетельствуют о восстановлении желчно-кислотного метаболизма.

В литературных источниках нет достаточной информации о характере изменения содержания желчных кислот больных неалкогольным стеатозом и стеатогепатитом.

Существует только одна работа о систематическом определении содержания холановых кислот в сыворотке крови здоровых лиц и больных со стеатозом печени и стеатогепатитом, а также проведению сравнительной оценки полученных результатов с целью повышения эффективности лечения [117].

ГЛАВА II. ИССЛЕДОВАНИЕ ПОВЕДЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ХОЛАНОВЫХ КИСЛОТ И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ В РЕАКЦИЯХ РАЗЛИЧНОГО ХАРАКТЕРА (ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ)

Для успешного решения данной задачи было необходимо провести синтез и выделение исходных объектов некоторых стероидов типа холановых кислот.

Холановые кислоты относятся к одному из наиболее реакционноспособных классов органических соединений.

Учитывая все это, нами выделены 3α -гидрокси-, $3\alpha,12\alpha$ -дигидрокси-, $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси-, $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидрокси- и $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикхолановые кислоты в качестве исходных материалов с целью дальнейших их превращений [118].

Характеристика эталонных образцов холановых кислот и их соответствующих метиловых эфиров представлены в табл.1 и 2. Чистоту полученных соединений контролировали методами тонкослойной и газовой хроматографии.

В табл.1 и 2 показано, что образцы холановых кислот и их метиловых эфиров были достаточно чистыми и теперь можно говорить об эталонности препаратов, поведение которых рассматривали в реакциях различного характера.

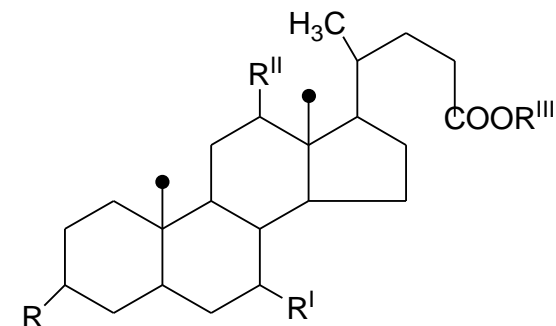


Таблица 1

Характеристика холановых кислот

№ п/п	Холановые кислоты	R	R ^I	R ^{II}	R ^{III}	Выход, %	Т.пл., °С	С, % Найдено Вычислено	Н, % Найдено Вычислено	Брутто-формула
I	3α-гидрокси-	ОН	Н	Н	Н	88	184-185	$\frac{76.53}{76.59}$	$\frac{10.61}{10.63}$	C ₂₄ H ₄₀ O ₃
II	3α,12α-дигидрокси-	ОН	Н	ОН	Н	73	177-178	$\frac{73.39}{73.36}$	$\frac{10.16}{10.18}$	C ₂₄ H ₄₀ O ₄
III	3α,7α-дигидрокси-	ОН	ОН	Н	Н	63	140-141	$\frac{73.31}{73.36}$	$\frac{10,12}{10.18}$	C ₂₄ H ₄₀ O ₄
IV	3α,7α,12α-тригидрокси-	ОН	ОН	ОН	Н	86	198-199	$\frac{70.57}{70.58}$	$\frac{9.86}{9.80}$	C ₂₄ H ₄₀ O ₅
V	3α,7α,12α-трикето-	О	О	О	Н	97	237-238	$\frac{71.06}{71.09}$	$\frac{9.97}{9.95}$	C ₂₄ H ₃₄ O ₅

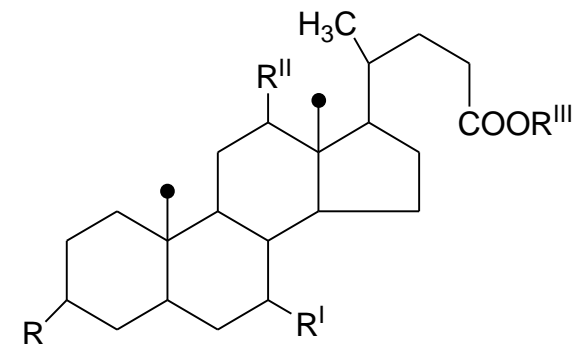


Таблица 2

Характеристика метиловых эфиров холановых кислот

№ п/п	Метиловые эфиры холановых кислот	R	R ^I	R ^{II}	R ^{III}	Вы- ход, %	Т.пл., °С	C, % <u>Найдено</u> Вычислено	H, % <u>Найдено</u> Вычислено	Брутто- формула
VI	метиловый эфир 3α- гидрокси-	ОН	Н	Н	СН ₃	95	129-130	$\frac{76.92}{76.78}$	$\frac{10.68}{10.83}$	C ₂₅ H ₄₂ O ₃
VII	метиловый эфир 3α,12α-дигидрокси-	ОН	Н	ОН	СН ₃	95	75-76	$\frac{73.78}{73.95}$	$\frac{10.25}{10.34}$	C ₂₅ H ₄₂ O ₄
VIII	метиловый эфир 3α,7α- дигидрокси-	ОН	ОН	Н	СН ₃	90	42-43	$\frac{73.86}{73.95}$	$\frac{10.49}{10.34}$	C ₂₅ H ₄₂ O ₄
IX	метиловый эфир 3α,7α,12α- тригидрокси-	ОН	ОН	ОН	СН ₃	92	156-157	$\frac{73.81}{73.89}$	$\frac{10.39}{10.34}$	C ₂₅ H ₄₂ O ₅
X	метиловый эфир 3α,7α,12α-трикето-	О	О	О	СН ₃	96	241-242	$\frac{72.19}{72.29}$	$\frac{8.55}{8.65}$	C ₂₅ H ₃₆ O ₅

2.1. Синтез сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидрокси - и 3 α , 7 α , 12 α -трикетохолановых кислот

Диапазон рассматриваемых областей применения продуктов органического синтеза необычайно широк.

Особенно область фармацевтической промышленности, которая развивается в нескольких важных направлениях. Главная сфера деятельности фармацевтической промышленности поиск новых лекарственных средств для лечения различных заболеваний.

Одним из способов модификации химической структуры некоторых стероидов типа холановых кислот является изучение их поведения в реакциях, различного характера, которые приводят к синтезу противомикробных, противовоспалительных и литолитических препаратов, а также поликатионных амфифилов.

На современном этапе развития медицины известно несколько сот заболеваний, непосредственно связанных с нарушениями функционирования генов [72, 3]. Генная терапия, занимающаяся введением в организм ДНК и РНК или олигонуклеотидов с лечебными целями, представляет собой одно из направлений современной химии и медицины [119, 120].

Известно, что доставка генетического материала в клетку (трансфекция) - необходимый этап генной терапии. Для её реализации используют различные молекулярные конструкции вирусного и невирусного происхождения.

Для решения этой задачи наиболее безопасными и перспективными являются метоболизируемые липиды с минимальной цитотоксичностью, поиск которых целесообразно проводить в ряду модифицированных природных липидов [120].

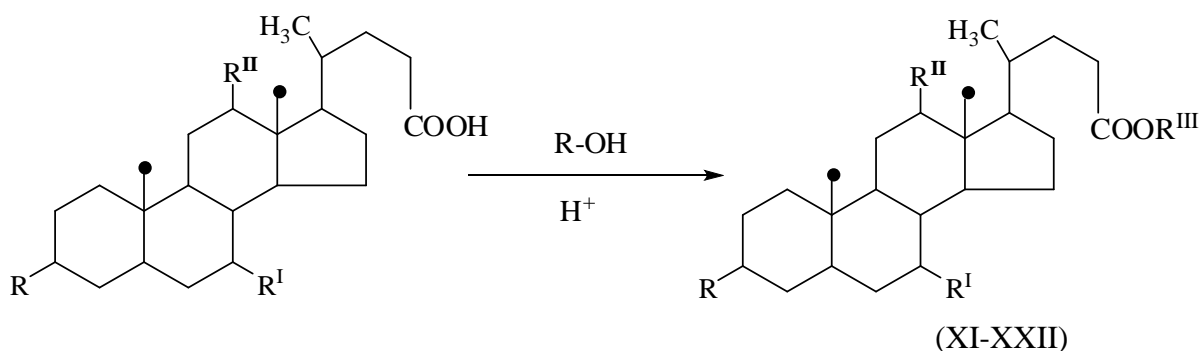
Во-первых, надо отметить, что многие параметры биологической активности препаратов этого ряда изучены недостаточно, во-вторых холановые кислоты участвуют в метаболических процессах организма.

Особый интерес представляет структура 3 α ,12 α -дигидрокси- и 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты, первая из которых содержит гидроксильные группы в экваториальном и аксиальном положениях, легко окисляемые, а другая кислота имеет три кето-группы в положениях 3,7 и 12 стероида, что представляют интерес для синтеза новых производных холановых кислот, которые в последующем могут явиться исходным сырьём для получения литолитических препаратов, а также исходных соединений для синтеза поликатионных амфифилов.

Реакции этерификации холановых кислот мы проводили по [123], а в качестве катализатора использовали концентрированную серную кислоту.

В качестве объекта исследования использованы следующие исходные вещества: 3 α ,7 β -дигидрокси-, 3 α ,12 α -дигидрокси- и 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановые кислоты; метиловый, этиловый, пропиловый, изопропиловый и бутиловые спирты, α -монохлорглицерин и TosCl, которые очищали и обезвоживали по известной в литературе методике [124].

После чего мы синтезировали сложные эфиры в 3 α ,12 α -дигидрокси и 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановых кислот (XI-XXII) с целью обеспечения защиты карбоксильной группы, необходимой для проведения последующих превращений. Синтез осуществили при взаимодействии спиртов с холановыми кислотами, а в качестве катализатора использовали концентрированную серную кислоту [121, 164-165].



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

- XI. $R=R^{II}=\text{OH}, R^I=\text{H}, R^{III}=\text{CH}_3,$
 XII. $R=R^{II}=\text{OH}, R^I=\text{H}, R^{III}=\text{C}_2\text{H}_5,$
 XIII. $R=R^{II}=\text{OH}, R^I=\text{H}, R^{III}=\text{C}_3\text{H}_7,$
 XIV. $R=R^{II}=\text{OH}, R^I=\text{H}, R^{III}=i\text{-C}_3\text{H}_7$
 XV. $R=R^{II}=\text{OH}, R^I=\text{H}, R^{III}=\text{C}_4\text{H}_9,$
 XVI. $R=R^I=R^{II}=\text{O}, R^{III}=\text{CH}_3$

- XVII. $R=R^I=R^{II}=\text{O}, R^{III}=\text{C}_2\text{H}_5$
 XVIII. $R=R^I=R^{II}=\text{O}, R^{III}=\text{C}_3\text{H}_7$
 XIX. $R=R^I=R^{II}=\text{O}, R^{III}=i\text{-C}_3\text{H}_7$
 XX. $R=R^I=R^{II}=\text{O}, R^{III}=\text{C}_4\text{H}_9$
 XXI. $R=R^I=\text{OH}, R^{III}=\text{CH}_2\text{-CHOH-CH}_2\text{OH}$
 XXII. $R=R^I=\text{OAc}, R^{II}=n\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2\text{SO}, R^{III}=\text{CH}_3.$

Основные характеристики синтезированных нами сложных эфиров холановых кислот (XI-XXII) приведены в табл.3.

Данные табл.3 свидетельствуют о том, что выходы сложных эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидрокси- и $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикетохолановых кислот составляют 84-96%. Результаты ИК-спектрального анализа показывают появление в спектрах всех полученных соединений интенсивных полос поглощения в области $1280\text{-}1155\text{cm}^{-1}$, свидетельствующих о наличии эфирных групп в исследуемых соединениях.

Строение соединений (XI-XXI) было подтверждено методами ПМР- и ИК-спектроскопии. Индивидуальность их контролировалась методом газожидкостной хроматографии.

На рис.1 в качестве примера приведены ПМР-спектры пропан-1,2-диолового эфира $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановой кислоты.

Как видно из данных ПМР-спектра соединения (XXI), полосы поглощения в области 0,68-0,70 м.д. и 0,95-1,00 м.д. в виде синглета эквивалентной к 3Н и 6Н протонам, которые отнесены к метильным группам в положениях 21, 18-19. Сигналы в виде мультиплета в области 1,0-2,0 отнесены к циклическим метиленовым протонам. Ациклические метиленовые протоны у С-20-23 проявляются в области 2,15-2,50 м.д. виде

мультиплета. Для соединения (XXI) протоны ОН-групп проявляются в области 3,7 и 4,0 м.д., метиленовые протоны С-25-27 обнаружены в области 3,5-3,7 м.д. Синглет в области 7,3 м.д. отнесен к протону в положении 23 соединения.

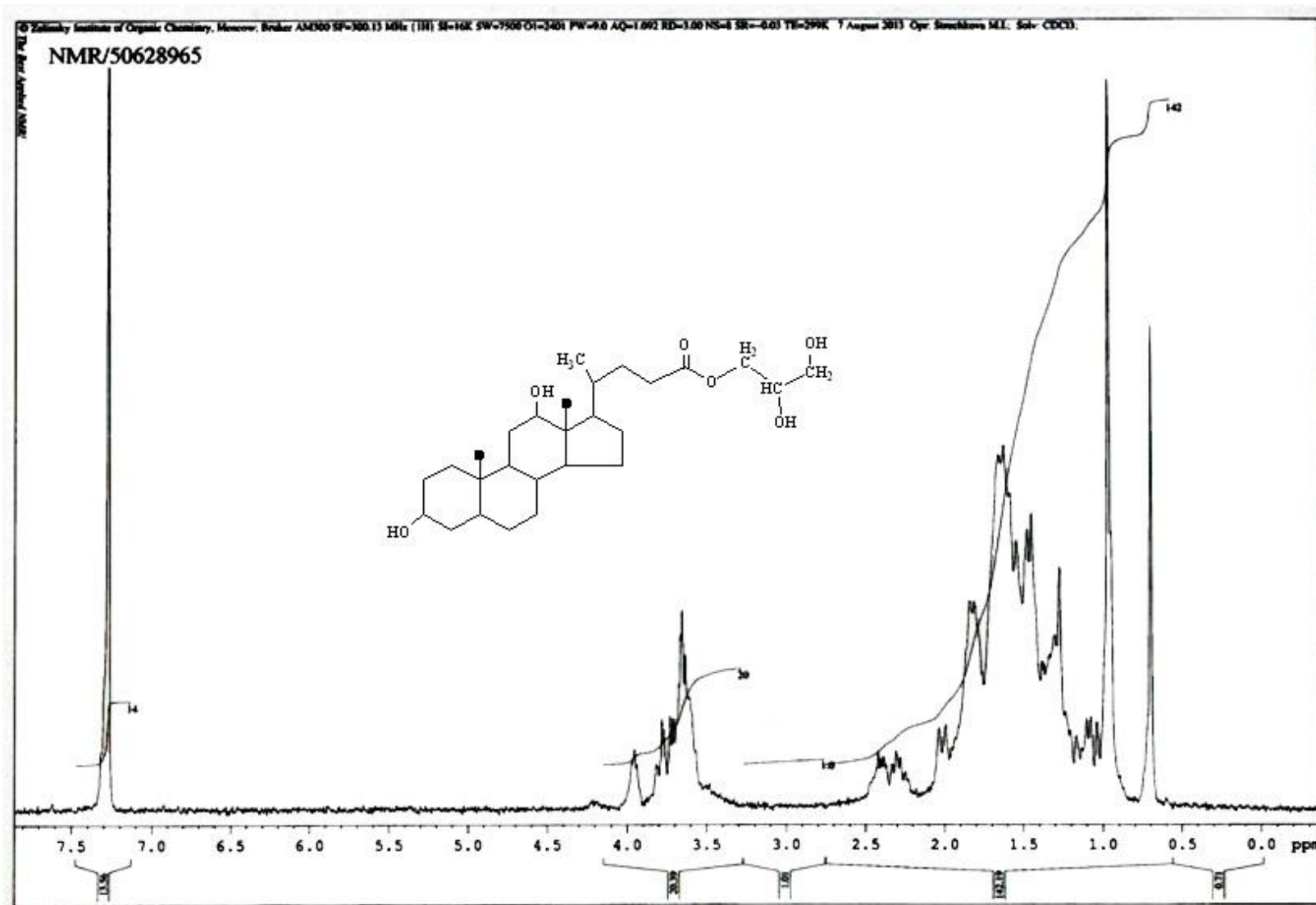


Рис.1. ПМР-спектры пропан-1,2-диолового эфира 3 α ,7 β -дигидроксихолановой кислоты (XXI).

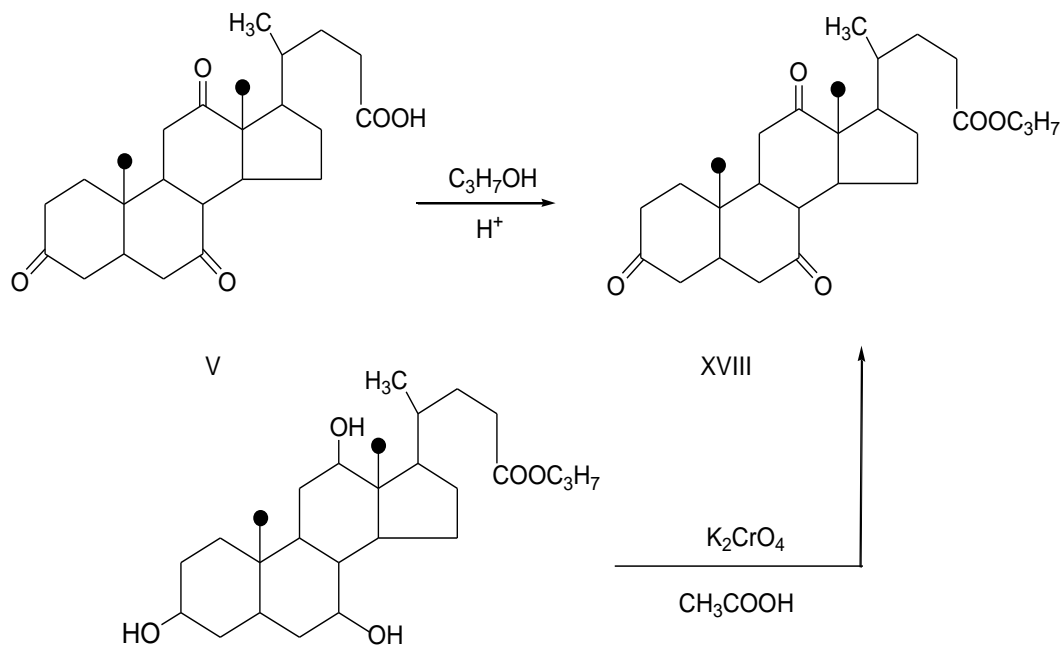
Характеристика сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидрокси- и 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановых кислоты

№ п/п	Сложные эфиры	Вы- ход, %	Т.пл., °С	С, % <u>Найдено</u> Вычислено	Н, % <u>Найдено</u> Вычислено	Брутто- формула
<i>I</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
XI	Метилловый эфир 3 α ,12 α - дигидроксихолановой кислоты	87	75-76	<u>73.85</u> 73.89	<u>10.39</u> 10.34	C ₂₅ H ₄₂ O ₄
XII	Этиловый эфир 3 α ,12 α - дигидроксихолановой кислоты	85	79-80	<u>74.11</u> 74.24	<u>10,44</u> 10.54	C ₂₆ H ₄₄ O ₄
XIII	Пропиловый эфир 3 α ,12 α - дигидроксихолановой кислоты	84	42-43	<u>74.51</u> 74.60	<u>10.59</u> 10.66	C ₂₇ H ₄₆ O ₄
XIV	Изопропиловый эфир 3 α ,12 α - дигидроксихолановой кислоты	86	69-70	<u>74.64</u> 74.60	<u>10.71</u> 10.66	C ₂₇ H ₄₆ O ₄
XV	Бутиловый эфир 3 α ,12 α - дигидроксихолановой кислоты	87	39-40	<u>74.88</u> 74.95	<u>10.68</u> 10.78	C ₂₈ H ₄₈ O ₄

1	2	3	4	5	6	7
XVI	Метилловый эфир 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты	96	239-240	$\frac{72.19}{72.11}$	$\frac{8.55}{8.65}$	C ₂₅ H ₃₆ O ₅
XVII	Этиловый эфир 3 α , 7 α , 12 α -трикетохолановой кислоты	86	231-232	$\frac{74.28}{74.36}$	$\frac{12.30}{12.39}$	C ₂₆ H ₅₂ O ₅
XVIII	Пропиловый эфир 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты	85	220-221	$\frac{74.64}{74.72}$	$\frac{12.49}{12.45}$	C ₂₇ H ₅₄ O ₅
XIX	Изопропиловый эфир 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты.	87	212-213	$\frac{74.61}{74.72}$	$\frac{12.50}{12.45}$	C ₂₇ H ₅₄ O ₅
XX	Бутиловый эфир 3 α , 7 α , 12 α -трикетохолановых кислот.	87	255-256	$\frac{75.10}{75.07}$	$\frac{12.63}{12.51}$	C ₂₈ H ₅₆ O ₅
XXI	Пропан-1,2-диоловый эфир 3 α ,7 β -дигидроксихолановой кислоты	89	210-211	$\frac{69.31}{69.37}$	$\frac{10.09}{10.06}$	C ₂₇ H ₄₇ O ₆
XXII	12 α -тозилоксиэфир-3 α ,7 α -диацетокси 5 β -метилхолановой кислоты	88	223-224	$\frac{69.49}{65.45}$	$\frac{7.81}{7.87}$	C ₃₆ H ₅₂ O ₉ S

Для доказательства строения некоторых сложных эфиров был использован встречный синтез.

В литературе известен пропиловый эфир $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидроксихолановой кислоты, который был получен пропилированием $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидроксихолановой кислоты, строение которого, установлено достаточно убедительно [163].



Для встречного синтеза последнего была осуществлена реакция окисления пропилового эфира $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидроксихолановой кислоты, до пропилового эфира $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикетохолановой кислоты (XVIII).

Полученные двумя различными методами пропиловые эфиры $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикетохолановой кислоты (XVIII), оказались совершенно идентичными по температуре плавления и спектральным данным.

ИК-спектральные исследования сложных эфиров (XI-XXII) показывают наличие основных полосы поглощения характерных групп. Так, в области 1290 и 1250 см^{-1} видны полосы поглощения сильной интенсивности, относящиеся эфирной группе, которые присутствуют во всех соединениях [126-127].

Широкие полосы поглощения в области $3160-3440\text{см}^{-1}$ характеризуют наличие ОН-группы в соединениях (XI-XV). В ИК-спектрах соединений (XI-XXI) найдены характерные полосы поглощения в области $1690-1705\text{ см}^{-1}$, показывающие наличие $>\text{C}=\text{O}$ группы у атомов углерода в положениях С-3, С-7 и С-12.

Результаты ИК-спектральных исследований позволяют сделать вывод, подтверждающий строение полученных нами сложных эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидрокси- и $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикетохолановых кислот.

На рис.2 и 3 приведены в качестве примера хроматограммы смеси сложных эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидрокси- и $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикетохолановых кислот, свидетельствующие о чистоте синтезированных соединений (XI-XXII).

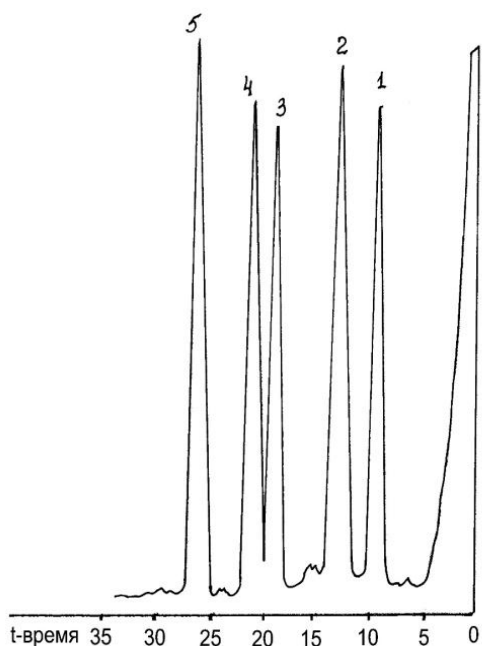


Рис.2. Хроматограмма сложных эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты:
1.этиловый-; 2.метилловый-;
3. изопропиловый-; 4.бутиловый-;
5. пропиловый-.

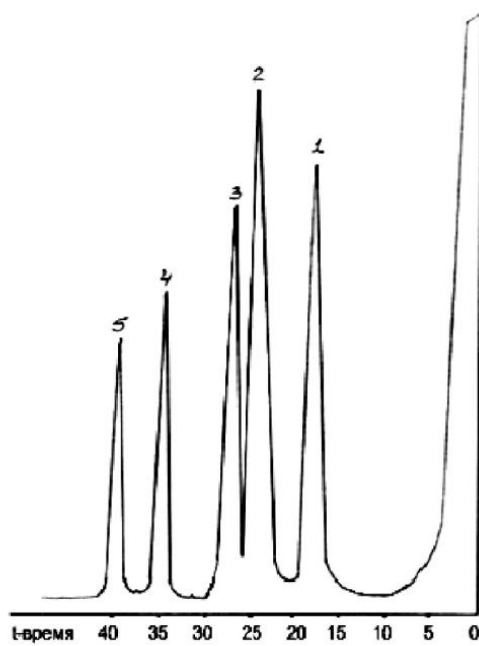


Рис.3. Хроматограмма сложных эфиров $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикетохолановой кислоты: 1-метилловый; 2-этиловый;
3.пропиловый-; 4. изопропиловый-;
5. бутиловый-.

Тонкослойная хроматография проводилась в системе хлороформ:метанол в соотношениях (9:1). В качестве проявителя - пары йода.

Газохроматографический анализ метилового, этилового, пропилового, изопропилового и бутилового эфиров проводили на хроматографе «Хром-5». Колонка длиной 1.26 м диаметр колонки 0.3 см, заполнена фазой: хроматон N-AW нанесенной 3% SE-30.

Результаты ИК-спектров и приведенные хроматограммы подтверждают строение синтезированных нами сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидрокси- и 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановых кислот, (табл.4).

Таким образом, нами было исследовано поведение 3 α ,12 α -дигидрокси- и 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановых кислот в реакциях этерификации и показано, что проведение таких реакций вполне осуществимо, а также посредством их в дальнейшем можно получить многочисленные производные этих стероидов.

При образовании сложных эфиров представлял интерес изучение реакции, в которой молекула стероида имеет различные функциональные группы. Это привело нас к постановке синтеза 12 α -тозилокси эфира -3 α ,7 α -диацетокси-5 β -метилхолановой кислоты (XXII).

На рис.4 в качестве примера приведены ИК-спектры этилового эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты. Так в области 1285 и 1280 см⁻¹ появляются характерные полосы поглощения сильной интенсивности соответствующие эфирному фрагменту, гидроксильным группам при 3145-3420 см⁻¹.

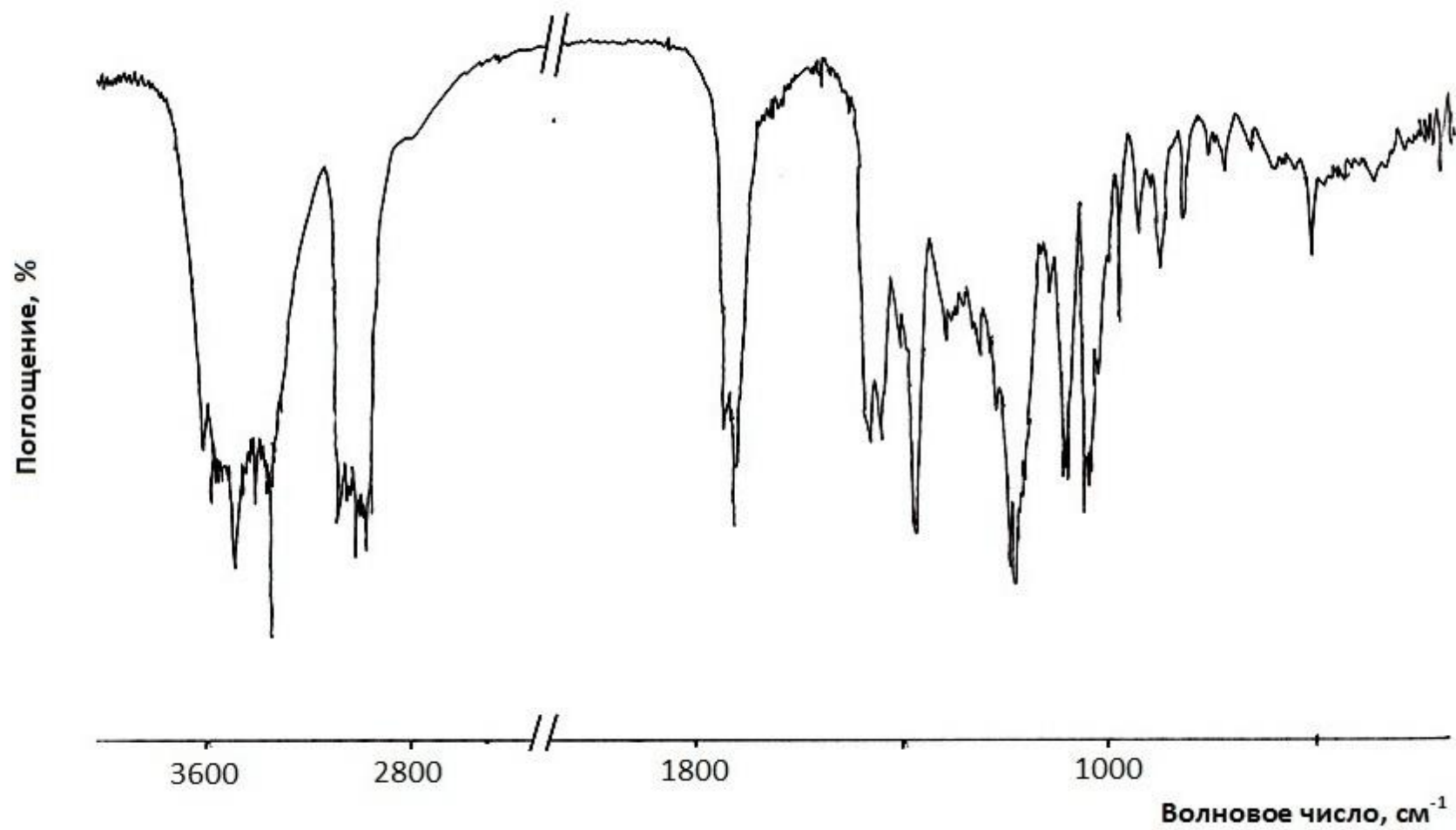


Рис.4. ИК-спектры этилового эфира 3 α 12 α -дигидроксициклоhexановой кислоты (XII).

Таблица 4

ИК-спектры сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидрокси- и 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановых кислот

Отнесение частот ν , см ⁻¹	СОЕДИНЕНИЕ									
	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
COOR	1274 1283	1235 1283	1291 1286	1285 1290	1280 1288	1250 1275	1255 1270	1170 1300	1249 1247	1285 1290
OH	3175 3430	3135 3380	3145 3410	3150 3428	3170 3450	3165 3440	3163 3450	3153 3430	3155 3435	3160 3445
C=O	-----	-----	-----	-----	-----	1680 1705	1685 1690	1680 1685	1683 1690	1675 1696

2.2. Поведение сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты в реакции ацилирования

Большую перспективу имеют исследования по изучению химических свойств сложных эфиров изучаемых в данной работе холановых кислот. Как известно, по синтезу новых производных холановых кислот протекающих по гидроксильной и карбоксильной группам опубликовано крайне ограниченное число работ [128, 129, 130].

Продолжая синтез с целью получения исходных веществ, пригодных для синтеза литолитических, гепатопротективных, антимикробных препаратов нами осуществлены некоторые реакции на основе новых эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты (XI-XV) с использованием гидроксильной группы в положение у С-3.

Однако на наш взгляд самостоятельный теоретический препаративный интерес представляют исследование химических свойств сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты потому, что это приведет к определенным выводам о реакционной способности вышеназванных сложных эфиров и их поведении в реакции ацилирования [122, 131].

Ацилирование метилового эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты и его некоторых производных уксусным ангидридом изучено достаточно подробно, но сведения о взаимодействии других сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты с уксусным ангидридом и другими ацилирующими агентами незначительно [132].

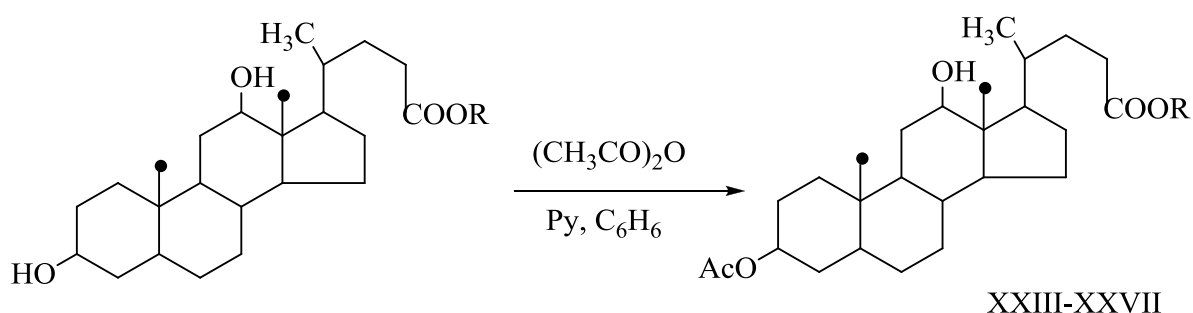
Применение метода ацилирования в данном этапе исследования является важным еще и потому, что защищенная гидроксильная группа в положении у С-3 молекулы стероида даёт возможность провести целенаправленный синтез различных превращений и модификаций.

Исследование реакции ацилирования в сложных эфирах 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты проводилась нами с позиции увеличения

арсенала новых производных холановых кислот, а также путем защиты гидроксильной группы в положении у С-3, проведение различных модификационных синтезов по гидроксилу в положении у С-12 молекулы стероидов.

Эти реакции привлекли наше внимание еще и тем, что продукты, содержащие гидроксильную группу, способны вступать в реакции ацилирования, окисления и восстановления, которые открывают путь к синтезу новых соединений, в том числе с предполагаемой биологической активностью.

С целью поиска оптимальных условий ацилирования сложных эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты было изучено их взаимодействие в эквимольном соотношении с уксусным ангидридом, а также при комнатной температуре в интервале от $23-25^{\circ}\text{C}$.



XXIII. R=CH₃; XXIV. -C₂H₅; XXV. -C₃H₇; XXVI. -i-C₃H₇; XXVII. -C₄H₉.

В найденных условиях было осуществлено ацилирование метилового (XXIII), этилового (XXIV), пропилового (XXV), изопропилового (XXVI) и бутилового (XXVII) эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты [133]. Идентификация полученных сложных эфиров 3α -ацето- 12α -гидроксихолановой кислоты проводилась сравнением их свойств.

Ацилирование в разработанных для сложных эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты, условиях показало, что выход продуктов ацилирования повышается при использовании изопропилового и бутилового

эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты и наблюдалось, что во всех случаях мы имеем дело с вступлением в реакцию одной ацильной группы в молекуле стероида в положении у С-3.

В табл.5 приведены физико-химические характеристики, эфиров 3 α -ацето-12 α -гидроксихолановой кислоты (XXIII-XXVII), свидетельствующие о том, что во всех случаях мы имеем дело с вступлением в реакцию одной ацильной группы в молекуле стероида в положении у С-3.

В ходе исследований нами было экспериментально установлено, что найденные условия ацилирования являются наиболее оптимальными [166].

Как видно из данных табл.5, выходы ацилпроизводных колеблются в пределах 80-95%. Установлено, что выходы ацилпроизводных увеличиваются при использовании бутилового эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты. Строение полученных соединений (XXIII-XXVII) подтверждено методом ИК-спектроскопии, а также элементным анализом. В ИК-спектрах соединений (XXIII-XXVII) наблюдается полоса поглощения в области 1280-1150 см⁻¹, свидетельствующая о присутствии сложноэфирной группы, а также в области 1340-1350с м⁻¹, присутствует характерная полоса поглощения валентного колебания ацетильной группы (рис.5).

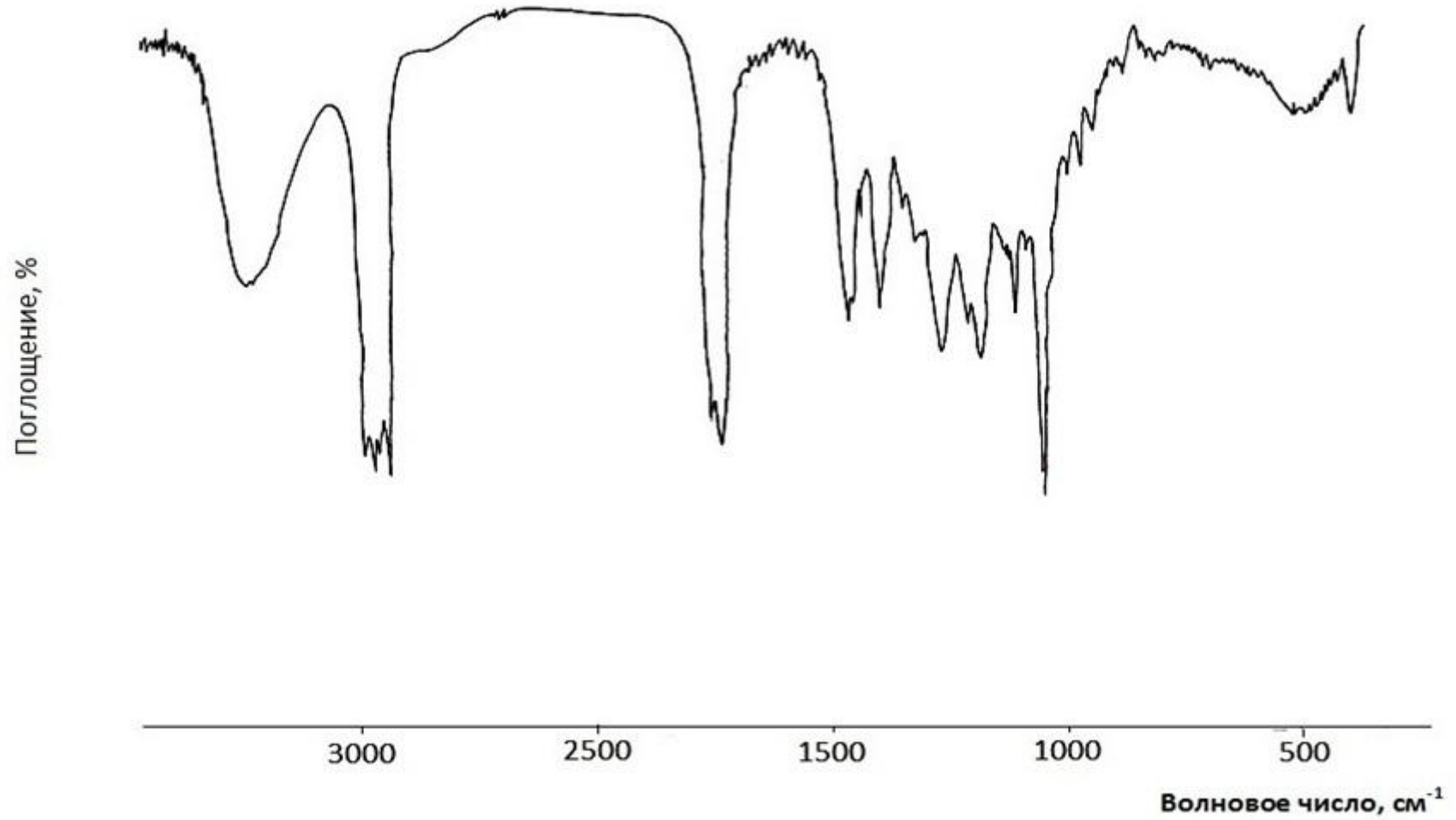


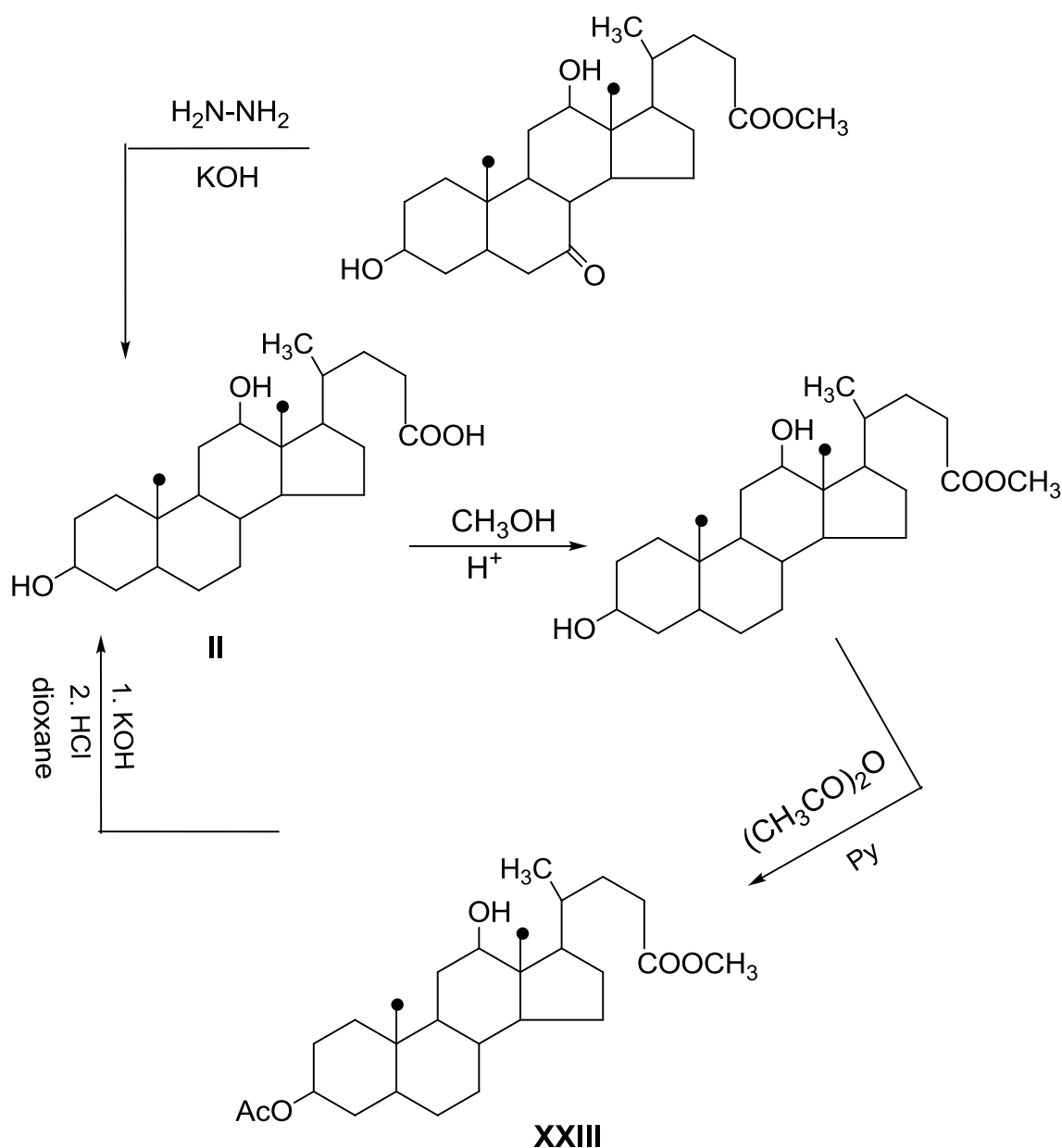
Рис.5. ИК-спектры метилового эфира 3 α -ацето-12 α -гидроксициклоhexановой кислоты (XXIII).

Таблица 5

Характеристика ацилпроизводных сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты

№ п/п	Соединение	Вы- ход, %	Т.пл., °С	С,% <u>Найдено</u> Вычислено	Н,% <u>Найдено</u> Вычислено	Брутто- формула
XXIII	Метилвый эфир 3 α -ацето-12- гидроксихолановой кислоты	80	62-63	$\frac{72.35}{72.32}$	$\frac{9.86}{9.82}$	C ₂₇ H ₄₄ O ₅
XXIV	Этиловый эфир 3 α -ацето-12- гидроксихолановой кислоты	85	65-66	$\frac{72.59}{72.68}$	$\frac{9.22}{10.02}$	C ₂₈ H ₄₆ O ₅
XXV	Пропиловый эфир 3 α -ацето-12- гидроксихолановой кислоты	82	52-53	$\frac{73.10}{73.06}$	$\frac{10.04}{10.14}$	C ₂₉ H ₄₈ O ₅
XXVI	Изопропиловый эфир 3 α -ацето-12- гидрокси холановой кислоты	87	58-59	$\frac{73.10}{73.06}$	$\frac{10.04}{10.14}$	C ₂₉ H ₄₈ O ₅
XXVII	Бутиловый эфир 3 α -ацето-12- гидроксихолановой кислоты	95	38-39	$\frac{73.32}{73.42}$	$\frac{10.17}{10.27}$	C ₃₀ H ₅₀ O ₅

В дальнейшем нами была предпринята попытка провести встречный синтез с целью установления строения исходной 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты (II), чтобы убедиться в чистоте выбранного исходного стероида. Для решения этой задачи нами была изучена реакция гидролиза полученного метилового эфира 3 α -ацето-12 α -гидроксихолановой кислоты раствором 30% едкого калия.



Проведенная реакция гидролиза метилового эфира 3-ацето-12-гидроксихолановой кислоты (XXIII), и образование в результате продукта (II), ещё раз убедительно подтверждает строение соединения (XXIII).

Для доказательства строения соединения II осуществлен его встречный синтез из 3 α ,12 α -дигидрокси-7-кетометилхолата путем восстановления последнего по Кижнеру-Вольфу.

Полученные различными путями 3 α ,12 α -дигидроксихолановые кислоты (II) оказались совершенно идентичными по свойствам, ИК-спектральным характеристикам, а также по отсутствию депрессии смешанной пробы плавления. Проведенные опыты ещё раз подтверждают строение соединений (II) и (XXIII).

Таким образом, нами было исследовано поведение различных эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты в реакции ацилирования и показано, что проведение таких реакций вполне осуществимо, а также посредством их можно получать многочисленные производные холановых кислот, проявляющие себя как потенциальные биологические активные соединения.

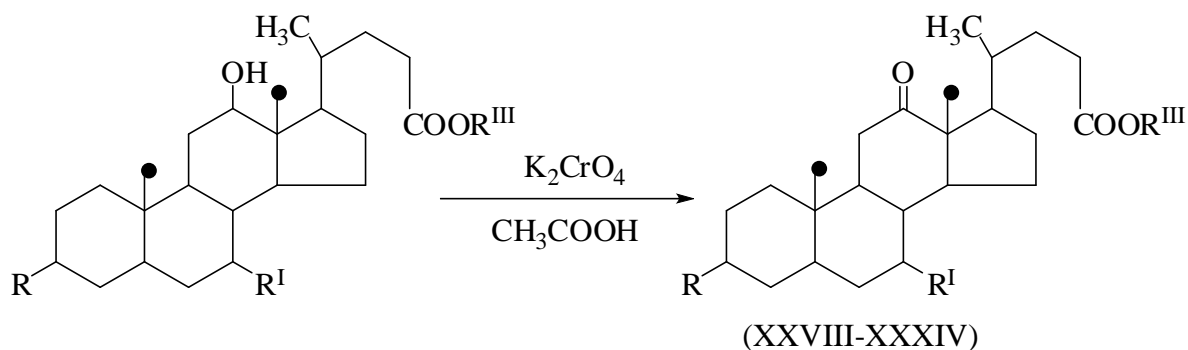
2.3. Окисление ацилпроизводных некоторых сложных эфиров холановых кислот

Наши целенаправленные исследования заключаются в попытке выяснения связи между химическим строением и биологической активностью. Это позволило бы осуществлять направленный синтез лекарственных средств, обладающих повышенной избирательностью, эффективностью, стабильностью и продолжительностью действия.

В дальнейшем наша программа целенаправленного синтеза в области химии холановых кислот была посвящена изучению реакции окисления протекающей по гидроксильной группе, которое было направлено на выяснение реакционной способности гидроксильной группы в положении у

C-12 холановых кислот. С этой целью, нами был разработан метод и условия проведения реакции окисления.

Окисление 3 α ,7 α -диацето-12 α -гидроксиметилового-, 3 α ,7 α -диацето-12-гидроксипропилового-, 3 α -ацето-12 α -гидроксиметилового, 3 α -ацето-12-гидроксиэтилового-, 3 α -ацето-12-гидроксипропилового-, 3 α -ацето-12-гидроксиизопропилового- и 3 α -ацето-12-гидроксипропилового эфиров холановых кислот направленное по гидроксильной группе у атома углерода в положении C-12 нам удалось осуществить в растворе ледяной уксусной кислоты и обработки с раствором хромата калия.



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

XXVIII. R=OAc, R^I=H, R^{II}=O, R^{III}=CH₃,

XXX. R=OAc, R^I=H, R^{II}=O, R^{III}=C₃H₇,

XXXII. R=OAc, R^I=H, R^{II}=O, R^{III}=C₄H₉,

XXXIV. R=R^I=OAc, R^{II}=O, R^{III}=C₃H₇

XXIX. R=OAc, R^I=H, R^{II}=O, R^{III}=C₂H₅

XXXI. R=OAc, R^I=H, R^{II}=O, R^{III}=i-C₃H₇

XXXIII. R= R^I=OAc, R^{II}=O, R^{III}=CH₃

В плане поиска подходящего окислителя для проведения окисления гидроксильной группы в положении у C-12 в молекулах синтезированных ацилпроизводных сложных эфиров (XXVIII-XXXIV) мы остановились на смеси хромата калия и ледяной уксусной кислоты. Эти условия проведения реакции позволяют выяснить поведение аксиального гидроксила в положении у C-12 атома углерода в реакциях окисления.

Опыты показали, что расчетное количество раствора хромата калия в уксусной кислоте при 25⁰C окисляет гидроксильную группу в положении у C-12 в молекулах стероидов в течении 13-14 часов.

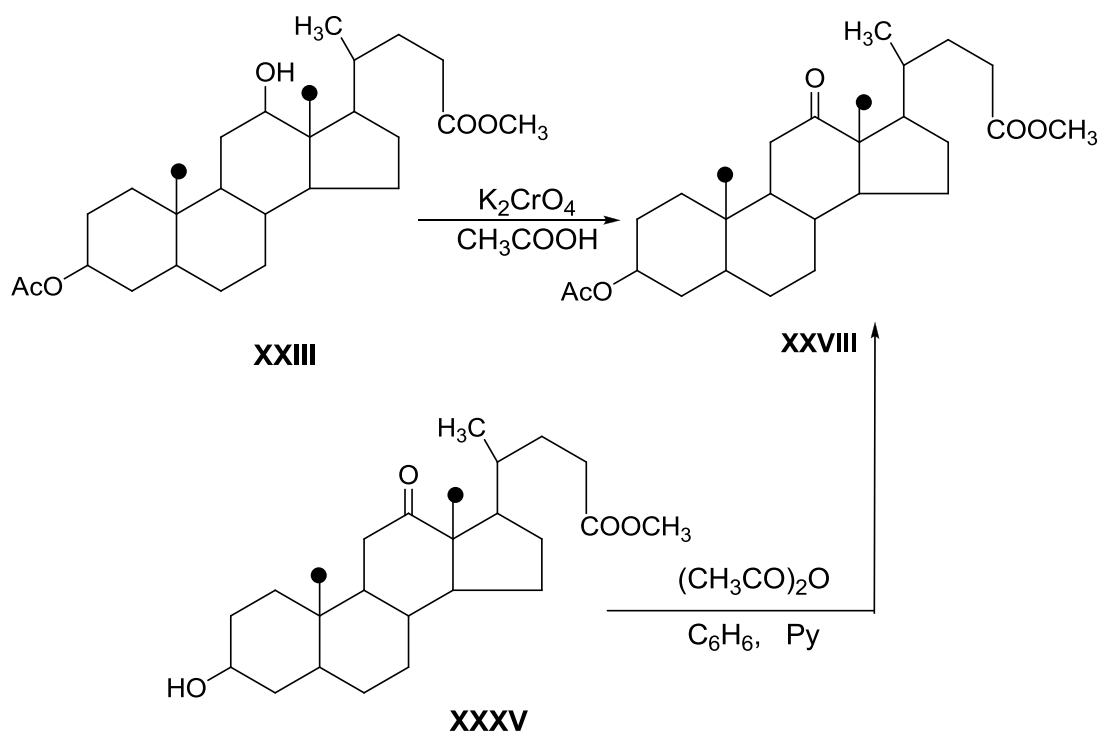
Важнейшие физико-химические характеристики полученных веществ показаны в табл.6.

В ИК-спектрах полученных продуктов наблюдаются интенсивные полосы поглощения в области $1700-1710\text{ см}^{-1}$, свидетельствующие о наличии $>\text{C}=\text{O}$ группы в молекуле изучаемых соединений (XXVIII-XXXIV) (рис.6).

Таким образом, проведение окисления по гидроксильной группе в положении у С-12 в молекуле исследуемых стероидов оказалось возможным.

В дальнейшем нами была предпринята попытка провести встречный синтез с целью установления строения метилового эфира 3α -ацето-12-кетохолановой кислоты (XXVIII). Для решения этой задачи мы провели ацилирование известного метилового эфира 3α -гидрокси-12-кетохолановой кислоты по 3α -гидрокси группе.

Полученные различными путями метиловые эфиры 3α -ацето-12-кетохолановой кислоты - (XXVIII) оказались одинаковыми по физикохимическим свойствам, а также по отсутствию депрессии смешанной пробы плавления.



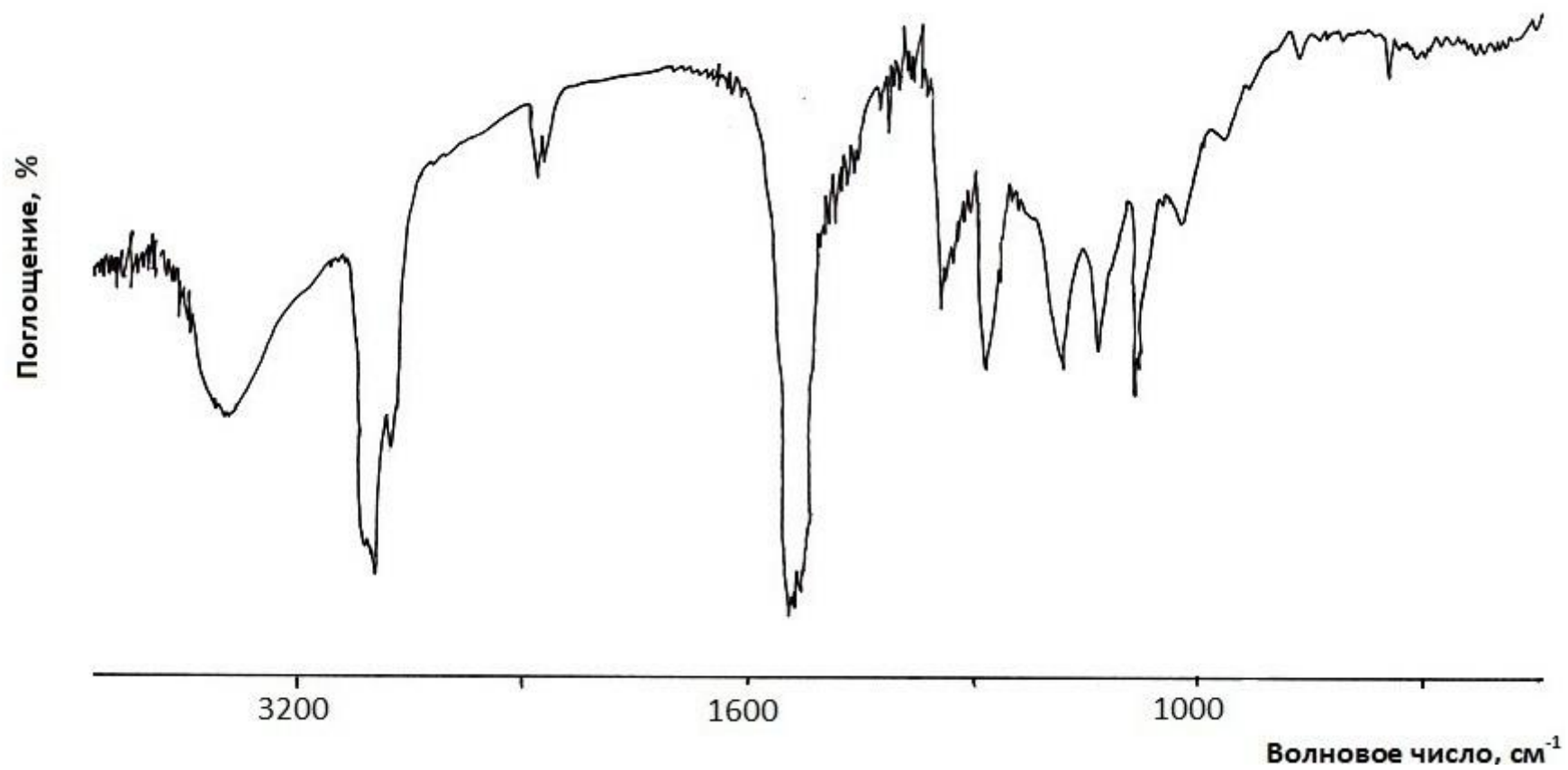


Рис.6. ИК-спектры изопрпилового эфира 3 α -ацето-12-кето- дигидроксицолановой кислоты (XXXI).

Характеристика некоторых кетохолановых кислот

№ п/п	Название соединения	Выход, %	Т.пл., °С	С,% <u>Найдено</u> Вычислено	Н,% <u>Найдено</u> Вычислено	Брутто- формула
XXVIII	Метилловый эфир 3 α -ацето-12-кетохолановой кислоты	88,6	43-44	$\frac{72.37}{72.44}$	$\frac{9.60}{9.68}$	C ₂₇ H ₄₂ O ₅
XXIX	Этиловый эфир 3 α -ацето-12-кетохолановой кислоты	86,7	51-52	$\frac{72.86}{72.84}$	$\frac{9.76}{9.82}$	C ₂₈ H ₄₄ O ₅
XXX	Пропиловый эфир 3 α -ацето-12-кетохолановой кислоты	85,7	41-42	$\frac{73.16}{73.22}$	$\frac{9.76}{9.82}$	C ₂₉ H ₄₆ O ₅
XXXI	Изопропиловый эфир 3 α -ацето-12-кетохолановой кислоты	87,7	53-54	$\frac{73.18}{73.22}$	$\frac{9.79}{9.82}$	C ₂₉ H ₄₆ O ₅
XXXII	Бутиловый эфир 3 α -ацето-12-кетохолановой кислоты	85	34-35	$\frac{73.50}{73.57}$	$\frac{10.01}{10.08}$	C ₃₀ H ₄₈ O ₅
XXXIII	Метилловый эфир 3 α ,7 α -диацето-12-кетохолановой кислоты	98	180-181	$\frac{64.56}{64.66}$	$\frac{8.63}{8.70}$	C ₂₉ H ₄₈ O ₅
XXXIV	Пропиловый эфир 3 α ,7 α -диацето-12-кетохолановой кислоты	93	178-179	$\frac{69.66}{69.76}$	$\frac{9.17}{9.25}$	C ₃₀ H ₅₀ O ₅

2.4. Синтез оксиаминопропиловых эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты

Дальнейшие наши исследования были направлены на поиск веществ, проявляющих биологическую активность, на основе некоторых производных холановых кислот и на разработку препаративных методов синтеза новых аналогов, имеющих фрагменты других природных лекарственных веществ.

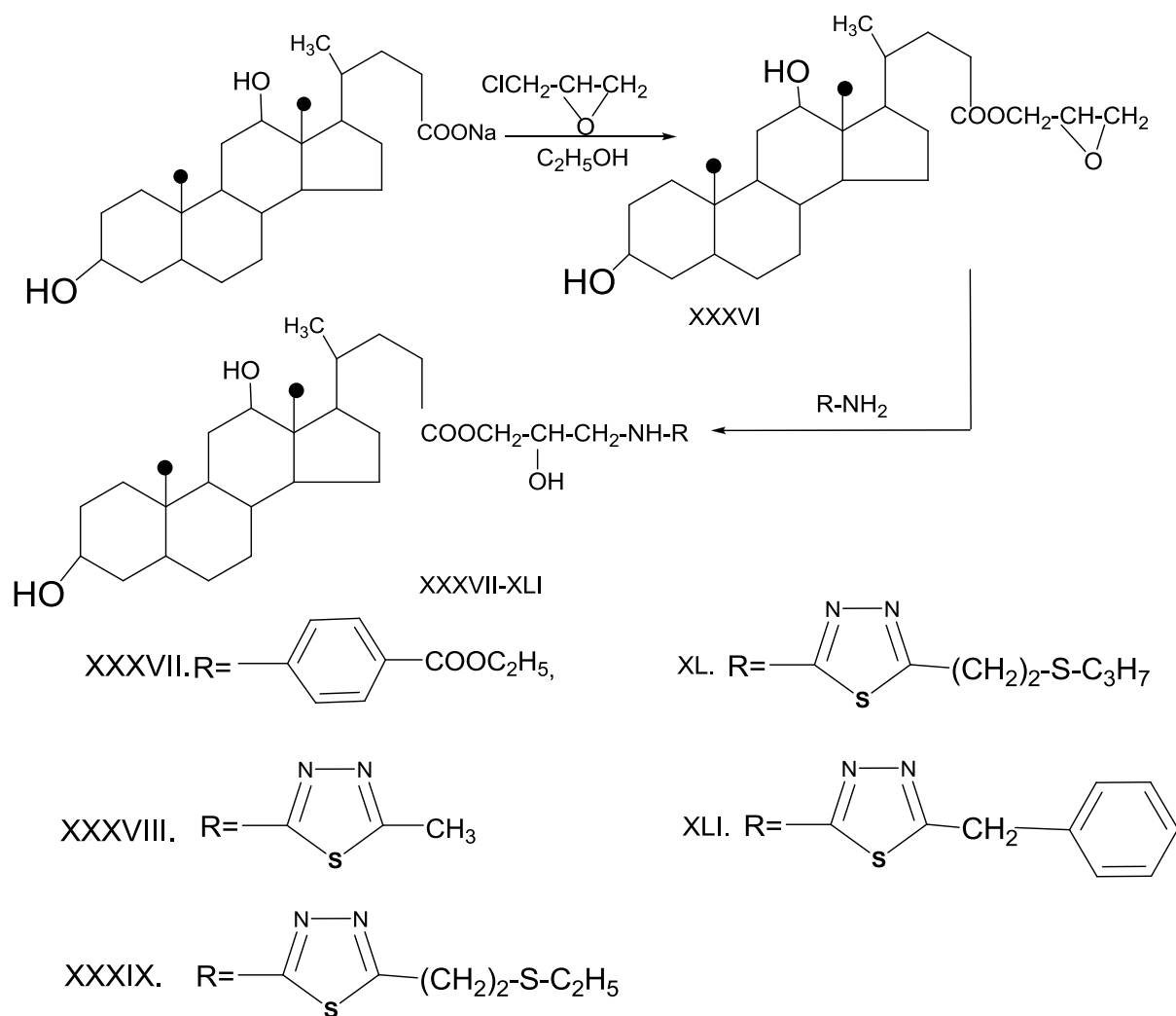
Как известно из литературы [134], моноглицидные эфиры холановых кислот синтезируются путём взаимодействия солей соответствующих кислот с эпихлоргидрином в среде этанол: метанол при 65⁰С.

В план данной части исследований входило изучение химических свойств глицидного эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты в различных превращениях, протекающих с участием глицидного фрагмента в молекуле стероида.

Мы воспроизвели эту реакцию с целью повышения выхода целевого продукта, исходя из натриевой соли 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты и эпихлоргидрина глицидного эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты.

Эксперименты по выявлению наиболее приемлемых условий проведения этой реакции показали, что её следует проводить кипячением при температуре 70⁰С в среде смеси абсолютных этанола и метанола при соотношении 2:1.

Такие условия обеспечивают хороший выход (84%) моноглицидного эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты, и дают продукты с высокой степенью чистоты [136].



Строение соединения (XXXVI) было подтверждено методом ПМР-спектроскопии. ИК-спектры (XXXVI) характеризуются появлением интенсивных полос поглощения в области, отнесенной к валентным колебаниям эпокси- группы (3010 см^{-1}).

В ИК-спектрах соединения (XXXVI) вместо этого найдены широкие сигналы в области $3150\text{-}3440 \text{ см}^{-1}$, которые отнесены к валентным и деформационным колебаниям ОН-групп.

В спектрах ПМР соединения (XXXVI) (^1H , 80 МГц, вн. ст. ГМДС), снятого в дейтрированном хлороформе, наблюдаются основные сигналы протонов, характеризующие строения (XXXVI). Так, сигналы метильных протонов, находящихся в положениях С-25 и С-26, наблюдаются в виде синглета в области 0,60 и 0,82 м.д. соответственно. Сигналы метильных

протонов в положении С-24 проявляются в области 1,21 м.д. в виде дублетов. Мультиплет в области 1,30-2,43 м.д. свидетельствует о присутствии протонов CH_2 циклической части эфиров, а мультиплет с центрами примерно при 3,60 м.д. о сигнале этиленовых протонов вне циклопентанофенантроновых фрагментов (рис.7).

Помимо этого, в спектре наблюдается сигнал в виде уширенного синглета в области 3,90 м.д., который относится к гидроксильным группам в положениях у С-3 и С-12 циклопентанофенантроновых фрагментов.

Приведенные данные ИК- и ПМР-спектров позволяют сделать вывод, подтверждающий строение указанного моноглицидного эфира $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты (XXXVI).

Как уже отмечалось, представляло особый интерес получение N-замещенных производных $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты на основе соответствующего глицидного эфира, поскольку среди них можно было ожидать появления соединений, обладающих биологической активностью.

Продолжая исследования по изучению, химических свойств $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты нами было найдены оптимальные условия по разработке препаративных методов синтеза оксиаминопропиловых эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты, исходя из глицидного эфира последнего (XXXVI).

Для завершения данной работы нами был исследован характер глицидной группы в молекуле глицидного эфира $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты. Взаимодействие последнего с различными аминами показало, что при температуре 70-80⁰С за 4-5 часов в среде водного метанола наблюдается образование оксиаминопропиловых эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты (XXXVII-XLI), с почти количественным выходом.

Строение соединений (XXXVII-XLI), было подтверждено методами ИК-спектроскопии и элементного анализа. Индивидуальность их контролировалась методом тонкослойной хроматографии.

Характеристики полученных оксиаминопропиловых эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты приведены в табл.7.

Данные ИК-спектров и аналитической тонкослойной хроматографии, а также элементного анализа оксиаминопропиловых эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты, показывают, что при проведении реакции их получения каких-либо побочных реакций не происходит. В ИК-спектрах полученных оксиаминопропиловых эфиров (XXXVII-XLI) появляются характерные полосы поглощения валентных колебаний гидроксильных групп при 3450-3460 см⁻¹, а также отсутствуют интенсивные полосы поглощения в областях, относящихся к валентным колебаниям эпокси-групп (2900, 3000-3010 см⁻¹) (рис.8).

Таким образом, нами было исследовано поведение эпокси- групп в молекуле 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты в реакции с разными аминами и показано, что проведение таких реакций вполне осуществимо.

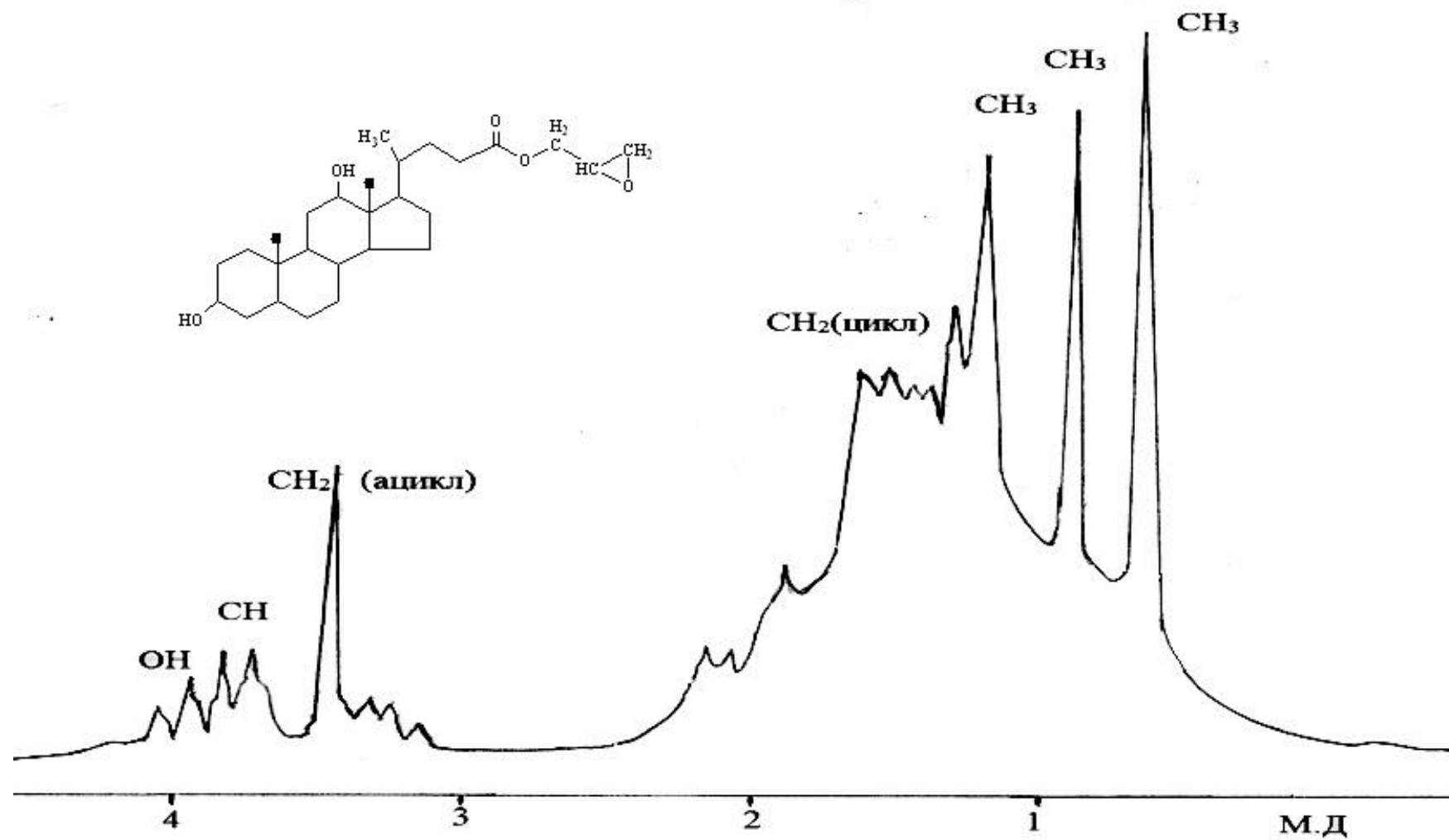


Рис.7. ПМР-спектр моноглицидного эфира 3α,12α-дигидроксициклоhexановой кислоты (XXXVI).

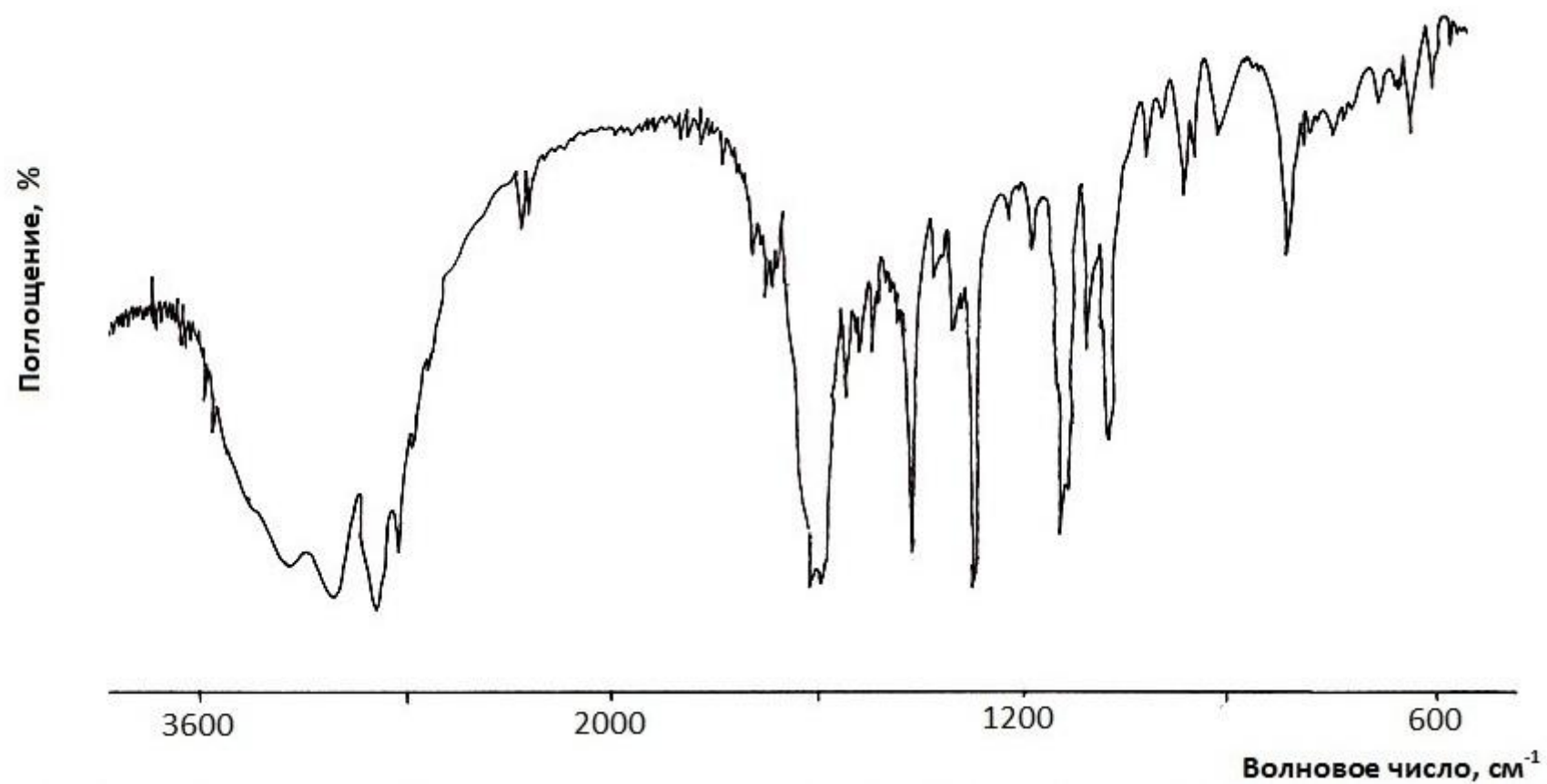


Рис.8. ИК-спектры 2-метил-5-аминотиадиазолоксиаминопропилового эфира
3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты (XXXVIII).

Характеристика оксиаминопропилового эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты

№ п/п	Оксиаминопропилового эфира 3 α ,12 α -дигидро- ксихолановой кислоты	Вы- ход, %	Т.пл.°С	С,% <u>Найдено</u> Вычислено	Н,% <u>Найдено</u> Вычислено	Брутто- формула
XXXVII	этиловый эфир п-амино- фенил-2-	85	75-76	<u>70.44</u> 70.47	<u>8.90</u> 8.97	C ₃₆ H ₅₅ NO ₇
XXXVIII	2-метил 5-аминотиодиа- зол-	87	166-167	<u>68.01</u> 68.09	<u>2.96</u> 3.02	C ₃₀ H ₁₆ N ₃ O ₅ S
XXXIX	2-бис этил-тио-5 аминоти- о diaзол-	86	79-80	<u>62.76</u> 62.82	<u>8.70</u> 8.76	C ₃₄ H ₅₇ N ₃ O ₅ S ₂
XL	2-этил тиопропил-5-ами- нотиодиазол-	89	84-85	<u>65.98</u> 66.05	<u>9.13</u> 9.21	C ₂₄ H ₄₀ N ₃ O ₅ S
XLI	2-бензил-5-аминотио- диазол-	92	144-145	<u>67.69</u> 67.75	<u>8.25</u> 8.30	C ₂₄ H ₃₄ N ₃ O ₅ S

2.5. Исследование некоторых гидразидов холановых кислот в реакциях нуклеофильного замещения

Рациональный химический подход к синтезу новых производных холановых кислот основывается на оценке возможного механизма их биотрансформации или на структурной аналогии с известными фармакологически активными соединениями.

Известно, что введение серосодержащих гетероциклических фрагментов в молекулу стероида повышает его биологическую активность [137-138].

С целью синтеза новых биологически активных веществ на основе некоторых производных холановых кислот, нами были проведены исследования по разработке препаративных методов синтеза новых стероидов, имеющих фрагмент гетероциклических соединений, а также высших карбоновых кислот.

Целью данной части исследований явилось изучение поведения гидразидов холановых кислот в реакциях нуклеофильного замещения с хлорангидами-3-хлорбензо(в)тиофен-2-карбоновой- и некоторых высших жирных кислот.

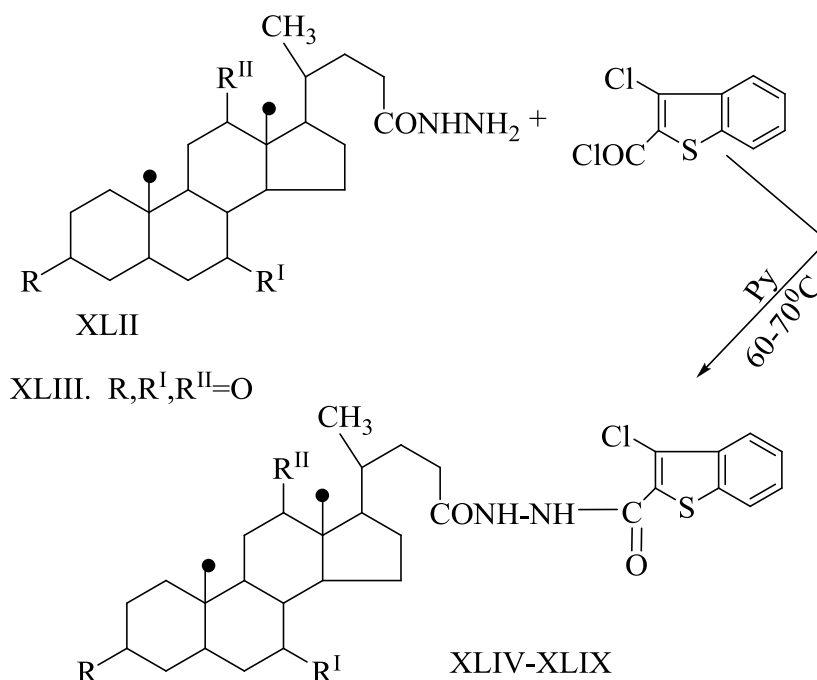
Исследуемые гидразиды нами были синтезированы по методике [55].

В этом плане представлялось интересным исследовать поведение гидразидов $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидрокси- и $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикетохолановых, $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидрокси холановой и $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикетохолановой кислот в реакциях нуклеофильного замещения с хлорангидами 3-хлорбензо-(в)-тиофен-2-карбоновой и стеариновой кислот [135].

Выявив, таким образом, то, что атом водорода в исследуемых гидразидах подвижен и его можно заменить на другие группы или остатки молекул, нами сделана попытка осуществить синтез соответствующих гидразидпроизводных холановых кислот. Кроме всего прочего, подобные N-

производные холановых кислот весьма близки по своей структуре к холелитическим препаратам, например: глицериновому эфиру-3 α ,7 α -дигидрохолоановой кислоты [139] и могли бы проявлять определенную биологическую активность.

Для изучаемых гидразидов выявлено, что наиболее приемлемыми условиями такого взаимодействия являются: температура реакции 70-80°C время 3-4 ч, соотношение реагирующих веществ - 1:1, среда пиридина [140-141]. Реакцию нуклеофильного замещения осуществляли по следующей схеме.



Где: XLIV, XLV, XLVI R, R', R''=OH; XLVII, XLVIII, R, R', R''=O;

XLIX R, R'=OH, R''=O

Исходя из гидразидов 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-, 3 α ,7 α -дигидрокси-12-кето- и 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановых кислот и хлорангирида 3-хлорбензо [b]тиофен-2-карбоновой кислоты, а также хлорангидридов пальмитиновой, стеариновой кислот, нами синтезированы новые гидразидпроизводные холановых кислот (XLIV-XLIX). Перечень соединений и их основные константы приведены в табл.8.

Как видно из данных табл.8, выходы гидразидпроизводных составляют 80-85%. Во всех случаях взаимодействия замещается только один атом водорода в молекуле гидразида. Для подтверждения строения всех синтезированных соединений использованы ИК- спектроскопия, элементный анализ, для определения их индивидуальности и степени чистоты - хроматография на тонком закрепленном слое силикагеля АСК. В качестве элюента использовали систему хлороформ: этанол - 9:1, проявителем служили пары йода.

В ИК-спектрах исходных гидразидов присутствует характерная полоса поглощения валентного колебания ОН-групп при $3450-3460\text{ см}^{-1}$, $>C=O$ - групп $1770-1800\text{ см}^{-1}$ а также NH_2 - группы в области $3380-3550\text{ см}^{-1}$ (рис.9).

В ИК-спектре хлорангирида 3-хлорбензо[b]тиофен-2-карбокси-гидразид-3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты (XLIV) присутствуют интенсивные полосы поглощения в области $3350-3320$ и $1670-1690\text{ см}^{-1}$, характеризующие наличие NH- и C=O-групп в молекулах стероидов (рис.10).

Таким образом, нами было исследовано поведение гидразидов некоторых холановых кислот в реакциях нуклеофильного замещения с разными хлорангиридами. Установлено, что при этом гидроксильные группы в положениях у C-3 и C-12 не затрагиваются. Такие реакции вполне осуществимы, а их посредством можно получить многочисленные производные холановых кислот, обладающие противомикробной активностью [140, 141, 170].

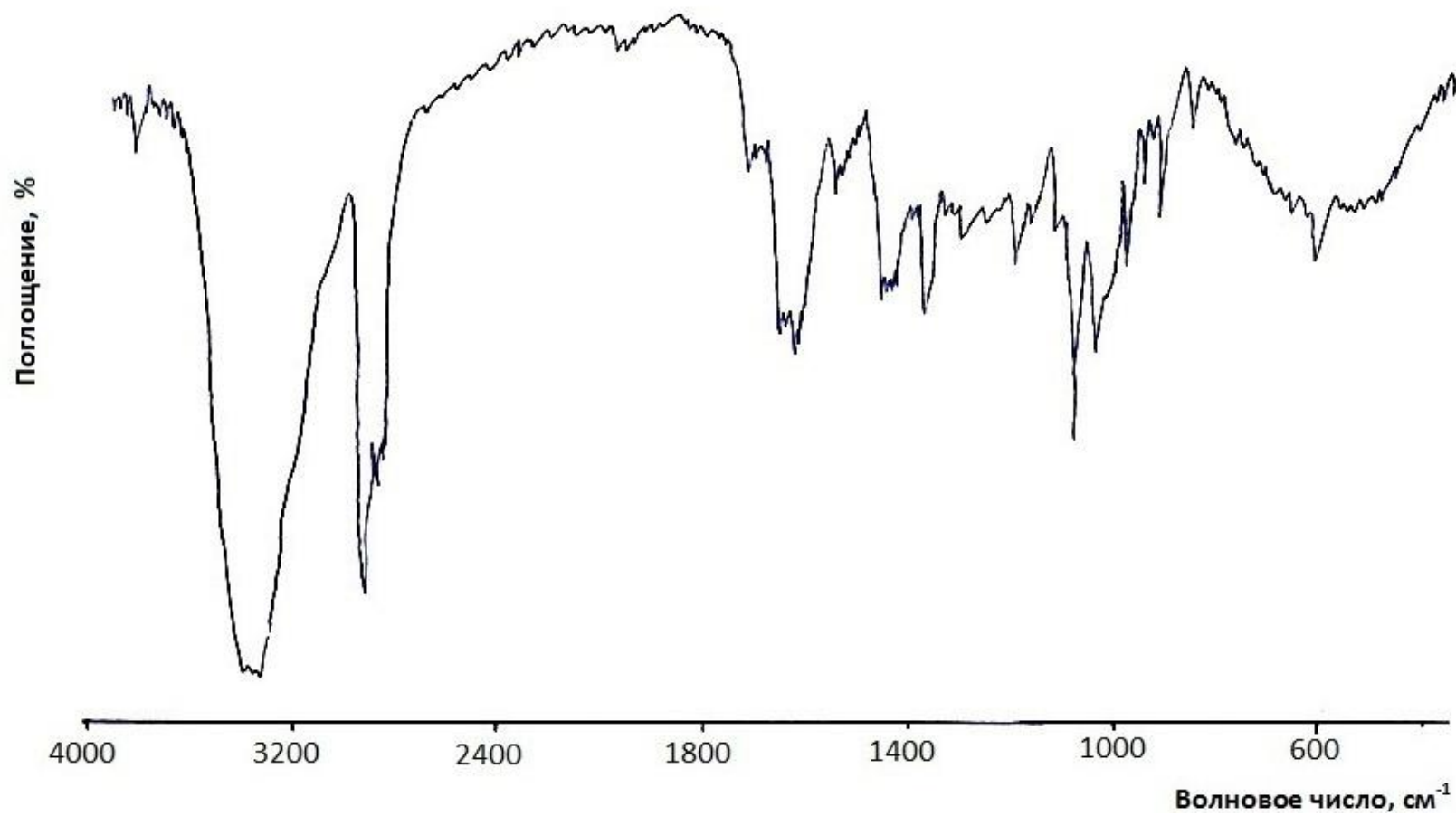


Рис.9. ИК-спектры гидразида-3 α ,7 α ,12 α -тригидроксициклоhexановой кислоты (XLII).

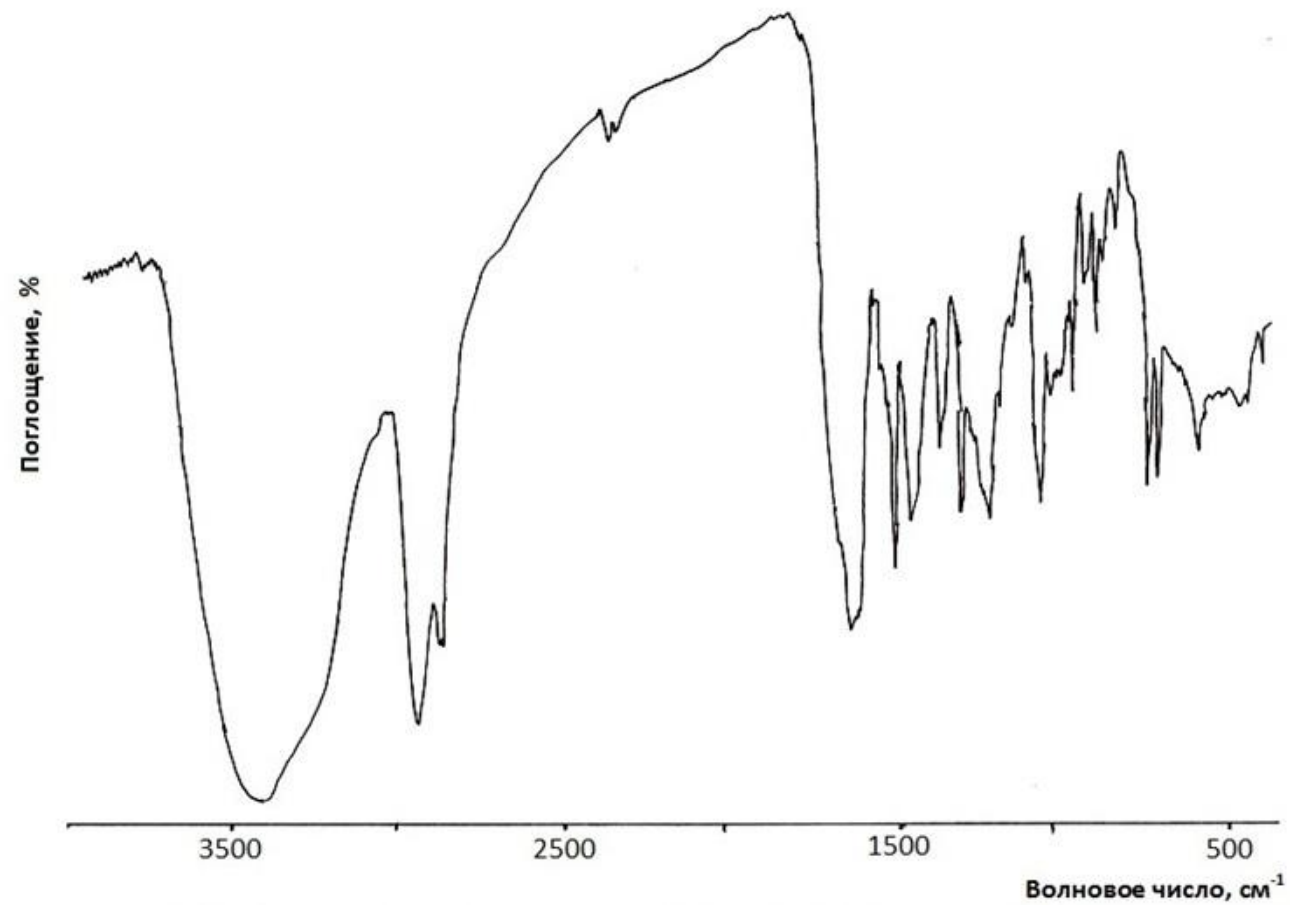


Рис.10. ИК-спектры хлорангирида 3-хлорбензо[b]тиофен-2-карбоксихидразид-3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты (XLIV).

Характеристики гидразидпроизводных холановых кислот

№ п/п	Соединение	Выход, %	Т.пл., °С	С,% <u>Найдено</u> Вычислено	Н,% <u>Найдено</u> Вычислено	Брутто-формула
XLII	Гидразид 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты	87	120-121	$\frac{68.17}{68.19}$	$\frac{10.11}{10.01}$	C ₂₄ H ₄₂ N ₂ O ₄
XLIII	Гидразид 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты	88	199-200	$\frac{69.17}{69.15}$	$\frac{8.70}{8.61}$	C ₂₄ H ₃₆ N ₂ O ₄
XLIV	3-хлорбензо(б)тиофен-2-карбоксигидразид-3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты	87	165-166	$\frac{64.68}{64.65}$	$\frac{6.81}{6.85}$	C ₃₃ H ₄₂ ClN ₂ O ₅ S
XLV	Пальмитокарбоксигидразид-3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты	97	64-65	$\frac{75.91}{75.82}$	$\frac{11.77}{11.69}$	C ₄₀ H ₇₂ N ₂ O ₅
XLVI	Стеаринокарбоксигидразид-3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты	87	61-62	$\frac{73.20}{73.04}$	$\frac{11.38}{11.30}$	C ₄₂ H ₇₆ N ₂ O ₅
XLVII	Пальмитокарбоксигидразид 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты	79	189-190	$\frac{73.44}{73.39}$	$\frac{10.12}{10.09}$	C ₄₀ H ₆₆ N ₂ O ₅
XLVIII	3-хлорбензо(б)тиофен-2-карбоксигидразид 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты	78	219-220	$\frac{64.91}{64.86}$	$\frac{6.45}{6.38}$	C ₃₃ H ₃₉ ClN ₂ O ₅ S
XLIX	3-хлорбензо(б)тиофен-2-карбоксигидразид-3 α ,7 α -дигидрокси-12-кетохолановой кислоты	80,4	176-179	$\frac{46.66}{46.77}$	$\frac{6.49}{6.54}$	C ₃₃ H ₄₄ ClN ₂ O ₅ S

ГЛАВА III. ПОИСК ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ПОЛУЧЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Некоторые из синтезированных новых производных 3 α ,7 β -дигидрокси- и 12 α -тозилоксиэфира 3 α ,7 α -диацетокси-5 β -метил- и 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановых кислот прошли лабораторные испытания как биологически активные вещества при газохроматографическом исследовании содержания холановых кислот для лечения и диагностики жировой болезни печени.

3.1. Изучение токсичности и противомикробной активности некоторых гидразидпроизводных холановых кислот

Одной из ведущих проблем современной медицины является разработка эффективных антибактериальных средств [142-143].

Разработка наиболее удобных методов синтеза новых производных стероидов типа холановых кислот, которые имеют фрагменты гетероциклических соединений, изучены и приведены в наших исследованиях.

Ряд исследователей [144-145] показали, что противомикробные свойства соединения повышаются, если в молекулу ввести фрагмент гетероциклических остатков молекул.

Учитывая все это, нами включено в программу исследований изучение противомикробной активности 3-хлорбензо[b]тиофен-2-карбоксихидразид-3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-(XLIV) и 3-хлорбензо[b]тиофен-2-карбоксихидразид-3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановых кислот (XLVIII).

Определение безвредности соединений (XLIV) и (XLVIII) проводили на лабораторных животных.

Эксперименты проведены на 40 белых мышах обоего пола весом 25-27

г и 25 беспородных белых крысах обоего пола весом 120-140 г.

В результате проведенных исследований установлено, что максимально переносимая доза соединения (XLIV) для белых мышей равна МПД₍₁₀₀₎ - 550 мг/кг, ЛД₅₀ – 650 мг/кг. Смертельная доза ЛД₁₀₀ – 1020 мг/кг. Для соединения (XLVIII) ЛД₁₀₀ – 450 мг/кг, ЛД₅₀ - 600 мг/кг. Смертельная доза ЛД₁₀₀ - 980 мг/кг. Подкожное введение соединения (XLIV) однократно в течение 70 дней морским свинкам в дозе 0,014 г/кг живой массы не вызывает каких-либо отклонений от физиологической нормы. Также соединение (XLVIII) в дозе 0,014 г/кг живой массы не вызывает отклонений от физиологической нормы.

В обоих случаях при патологоанатомическом вскрытии макроскопические изменения в печени, селезенке, почках, мышцах, надпочечниках, и лимфатических узлах не зарегистрированы.

В табл.9 приведены данные о безвредности 3-хлорбензо(b)тиофен-2-карбоксии гидразид 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси-, 3-хлорбензо(b)тиофен-2-карбоксии гидразид 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановых кислот и этония при подкожном введении мышам.

Таблица 9

Показатели токсичности 3-хлорбензо(b)тиофен-2-карбоксии гидразид 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты - XLIV, 3-хлорбензо(b)тиофен-2-карбоксии гидразид 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислот XLVIII и этония * для лабораторных животных

Соединение	Параметры токсичности, мг/кг		
	МПД	ЛД ₅₀	ЛД ₁₀₀
XLIV	550	650	1020
XLVIII	450	600	980
Этоний*	265	510	990

*Этоний - известный противомикробный препарат, взятый в качестве стандарта.

Антимикробную активность соединений (XLIV) и (XLVIII) определяли *in vitro* методом серийных разведений по отношению к полевым культурам стафилококка, нокардии, пастереллы, каринебактерий, выделенных от больных респираторным заболеванием животных.

Бактерицидность соединений (XLIV) и (XLVIII) изучали в сравнении с этонием. Проводили три параллельных опыта (таблица 10).

Минимальная подавляющая концентрация соединения (XLIV) по отношению к стафилококку - 72-107 мкг/мл, нокардии - 120-200 мкг/мл, коринбактериям - 90-110 мкг/мл, пастереллам - 70-90 мкг/мл. Что касается соединения (XLVIII), то по отношению к стафилококку - 80-120 мкг/мл, нокардии - 130-225 мкг/мл; коринбактериям - 115-135 мкг/мл; пастереллам - 90-115 мкг/мл.

Как видно из табл.10, оба соединения обладают выраженным бактерицидным действием по отношению к полевым штаммам стафилококка, нокардии, коринбактериям и пастереллам и не уступают известному препарату этонию [146].

Таким образом, была изучена острая токсичность, а также противомикробная активность некоторых гидразидпроизводных холановых кислот на примере 3-хлорбензо[b]тиофен-2-карбокси гидразид-3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси- (XLIV) и 3-хлорбензо[b]тиофен-2-карбокси гидразид-3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты (XLVIII).

Автор приносит благодарность Таджикскому научно-исследовательскому ветеринарному институту, доктору ветеринарных наук М. Амирбекову за изучение токсичности и противомикробной активности некоторых синтезированных нами соединений.

Бактерицидность соединений (XLIII, X и XLVI)

№ п/п	Название соединения	Единица измере- ния	Виды бактерий			
			Стафилококк	Нокардии	Корин- бактерии	Пастереллы
XLIV	3-хлорбензо(в)тиофен-2-карбокси- гидразид 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси – холановой кислоты	мкг/мл	72-107	120-200	90-110	70-90
X*	Этоний	мкг/мл	30,2-66.5	66.5-133	66.5-133	192.5-441.7
XLVIII	3-хлорбензо(в)тиофен-2-карбокси- гидразид 3 α ,7 α ,12 α -трикето- холановой кислоты	мкг/мл	80-120	130-125	115-135	90-115

3.2. Исследование гепатопротективных и холелитолитических свойств пропан-1,2-дионового эфира 3 α ,7 β -дигидроксихолановой кислоты

Поиск наиболее эффективных, с повышенной избирательностью и продолжительностью действия безвредных препаратов остается одним из приоритетных направлений в развитии органической, фармацевтической химии.

Свойства пропан-1,2-дионового эфира -3 α ,7 β -дигидроксихолановой кислоты ингибировать синтез общих липидов, уменьшать концентрацию холестерина, триглицеридов, суммарно повышать количество холановых кислот, а также содержание фосфолипидов в составе желчи и в сыворотке крови, послужили причиной для изучения его гепатопротекторных и холелитолитических свойств при экспериментальном холелитазе.

Эксперименты были проведены на 20-ти хомяках обоего пола массой тела 55-70 г, и 25 белых крысах обоего пола массой 140-205 г. Поставлено 25 серий опытов, проведено более 50 анализов биологических проб.

Предметом исследования явился образец пропан-1,2-дионовый эфир 3 α ,7 β -дигидроксихолановой кислоты.

Количественное содержание холестерина, холановых и высших жирных кислот в сыворотке крове определяли методом газожидкостной хроматографии.

В сыворотке крови определяли содержание холестерина, изучали активность ферментов АсАТ, АлАТ и ЩФ.

При гиперинсулинемии в жировой ткани нарастает липолиз с высвобождением большого количества свободных жирных кислот, в печени идёт снижение скорости окисления, которое приводит к отложению триглицеридов в гепатоцитах, что способствует развитию её жировой болезни. При взаимодействии с токсичными кислотами пропан-1,2-дионовый

эфир $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановой кислоты приводит к образованию особых частиц (смешанных мицелл), прекращающих вредное воздействие данных кислот на клеточные мембраны. За счет способности образования двойного слоя молекул, растворимых в жирах и в воде, сохраняется сродство пропан-1,2-дионового эфира $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановой кислоты к мембранам клеток, поэтому встраивание в них мицелл происходит без разрушения клеток. Кроме того, пропан-1,2-дионовый эфир $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановой кислоты в процессе встраивания в клеточные мембраны препятствует их повреждению уже существующими токсичными мицеллами. При этом происходит уменьшение очага воспаления и предотвращение гибели клеток печени.

В эксперименте на инбредных мышах, получающих обогащенную жирами литогенную диету, назначение пропан-1,2-дионового эфира $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановой кислоты в дозе 25 мг/кг/сут (примерно равного дозам известной урсодезоксихолевой кислоты 14 мг/кг/сут) в течение 2-х месяцев привело к нормализации высших жирных и желчных кислот, а также было видно растворение желчных камней у всех экспериментальных животных.

По определению содержания желчных и высших жирных кислот в сыворотке крови методом ГЖХ и нормализации других биохимических показателей печени, судили о превосходстве пропан-1,2-дионового эфира $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановой кислоты по сравнению УДХК по гепатопротективным и холелитолитическим свойствам.

Было отмечено большее растворение желчных камней при применении пропан-1,2-дионового эфира $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановой кислоты, чем на фоне терапии УДХК. Газохроматографическим методом доказано, что под действием пропан-1,2-дионового эфира $3\alpha,7\beta$ -дигидроксихолановой кислоты в желчи и в сыворотке крови увеличивается количество холановых кислот $3\alpha,7\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты. Препарат также стимулирует процесс

усиления синтеза ненасыщенных жирных кислот и подавление синтеза насыщенных жирных кислот, также увеличивает содержание фосфолипидов.

3.3. Использование газохроматографических результатов по определению содержания холановых и жирных кислот в диагностике жировой болезни печени

Анализ литературы показывает, что имеются незначительные сведения о количественном составе холановых кислот в желчи и плазме крови больных желчнокаменной болезнью на различных этапах литогенеза, а также при других патологиях печени и соотношении важнейших из них при наличии желчных камней и содержании их в желчных камнях.

Исходя из этого, разработка достоверных и доступных методов определения содержания холестерина, холановых и жирных кислот в биологических жидкостях у больных с различными патологиям печени, а также изучение изменения этих компонентов под влиянием некоторых препаратов в организме, является актуальным.

Целью наших исследований в данном направлении является поиск дополнительного метода и подхода, который по сравнению с другими существующими, методами были бы более точными и информативными при определении содержания холановых кислот (на примере $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидрокси-, $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси-, $3\alpha,12\alpha$ -дигидрокси-, $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикето- и 3α -гидроксихолановых кислот), будучи в тоже время нетрудоемкими и информативными [147, 151].

В качестве внутреннего стандарта использовали метиловый эфир $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси-12-кетохолановой кислоты.

Разработка оптимальных условий определения холановых кислот и использование результатов для диагностики жировой болезни печени в соответствии с настоящими исследованиями, являются новыми и не

описанными в литературе.

Анализ литературных данных [148] показывает, что свободные жирные кислоты, в большом количестве высвобождающиеся из жировой ткани брюшной полости, поступают по воротной вене в печень, а затем в системный кровоток. Жирные кислоты, поступающие в системный кровоток, нарушают функцию инсулиновых рецепторов и усугубляют инсулинорезистентность. Избыточное поступление жирных кислот в печень приводит к усилению синтеза в ней триглицеридов и липопротеидов очень низкой плотности, увеличивая их содержание в крови. Эти процессы способствуют развитию жировой болезни печени.

Использование ряда биохимических параметров сыворотки крови не полностью показывают степень участия жирных и желчных кислот в развитии этого процесса.

Известен другой подход для установления диагноза жировой болезни печени [149-150]. Принцип данного подхода к постановке диагноза жировой болезни печени заключается в том, что повышение общего количества холановых кислот выразится в заметном изменении работоспособности печени по очищению портальной крови от циркулирующих холатов или на фоне инсулинорезистентности печени активно увеличивается содержание холановых кислот.

Сущность данной работы заключается в том, что основной причиной развития ожирения считают повышение содержания в печени холестерина, жирных и холановых кислот.

Недостаток данного подхода для постановки более точного диагноза жировой болезни печени заключается в следующем:

Во-первых, не определено содержание каждой по отдельности холановой кислоты в сыворотке крови у больных с жировой болезнью печени.

Во-вторых, не учтено образование холиеновых кислот и избыточное содержание холестерина, из которого синтезируется большое количество первичных холановых кислот в печени.

Целью наших исследований в данном направлении является поиск дополнительных методов и подходов, которые по сравнению с другими существующими методами, были бы более точными и информативными при определении содержания холановых кислот, (на примере $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидрокси-, $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси-, $3\alpha,12\alpha$ -дигидрокси-, $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикетон- и 3α -гидроксихолановых кислот) будучи в тоже время нетрудоемкими и информативными [151].

Для определения содержания холановых кислот в сыворотке крови использовали газовой хроматограф «Хром-5» также в режиме программированных температур [152].

В жировой ткани активируются ферментативные системы, обеспечивающие расщепление триглицеридов. В результате в плазму крови высвобождаются в повышенном количестве свободные жирные кислоты, которые способствуют синтезу большого количества холестерина и в дальнейшем его метаболитов холановых кислот. Избыточные количества некоторых жирных и холановых кислот, оказывают токсическое действие на мембраны клеток. При связывании свободных жирных кислот с альбумином, из него высвобождается билирубин, который в свою очередь, усугубляет токсическое влияние холановых кислот на клетки.

Преобразование холестерина в холановые кислоты осуществляется в гепатоцитах и считается одной из важных и специфических функций печеночных клеток. Следовательно, уровень холановых кислот в сыворотке при различных поражениях печени отражает степень нарушения их синтеза печенью, а данные об их количественном составе могут служить ценной информацией о функциональном состоянии гепатоцитов.

Предлагаемый новый подход с учетом точного содержания желчных кислот как дополнительного теста с целью постановки диагноза у больных жировой болезнью печени, является новым, менее трудоемким и требует сравнительно малых средств.

Принцип данного исследования заключается в определении содержания холановых кислот в сыворотке крови у больных с жировой болезнью печени методом газожидкостной хроматографии, и эти результаты вполне возможно использовать как дополнительный тест с целью постановки точного диагноза.

В качестве примера приведена хроматограмма метиловых эфиров холановых кислот сыворотке крови у здоровых лиц (рис.11).

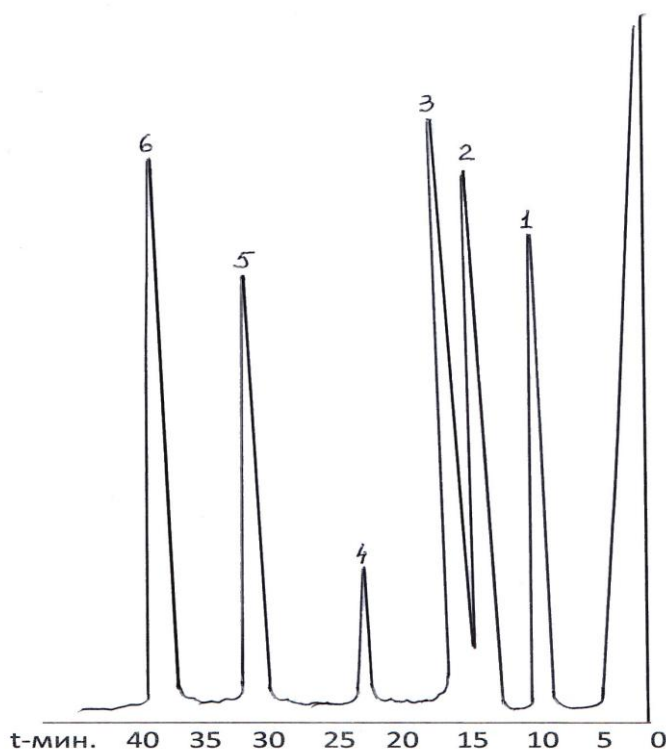


Рис.11. Контрольная хроматограмма смеси метиловых эфиров холановых кислот: 1 - 3 α -гидрокси-; 2 - 3 α ,12 α -дигидрокси-; 3 - 3 α ,7 α -дигидрокси-; 4 - 3 α ,7 α ,12 α -трикето-; 5 - 3 α ,7 α -дигидрокси-12-кето-; 6 - 3 α ,7 α ,12 α – тригидроксихолановой кислот.

Преимущество данного подхода к диагностике жировой болезни печени заключается в том, что сдвиги в содержании холяновых кислот в сыворотке крови у больных жировой болезнью печени наступают раньше, чем изменения других показателей функционального потенциала печени, в связи, с чем они являются более чувствительными тестами.

Количество и соотношение отдельных холяновых кислот отражают функциональное состояние гепатоцитов и зависят от степени заболеваемости при жировой болезни печени.

Холяновые кислоты являются конечным продуктом метаболизма холестерина и одними из самых важных путей его выведения из организма. Почти до 80% общего количества холистерола окисляется в холяновые кислоты. Биохимический синтез холяновых кислот осуществляется в гладком эндоплазмическом ретикулуме гепатоцитов преимущественно из вновь синтезированного холестерина. В связи с этим количественное определение холяновых кислот в сыворотке крови больных с жировой болезнью печени приобретает особое значение для диагностики и оценки эффективности лечения.

Полученные результаты являются достоверными фактами в качестве дополнительного теста при постановке точного диагноза у больных с жировой болезнью печени.

Даны оценки содержания холяновых кислот в сыворотке крови у больных с жировой болезнью печени: установлено, что при жировой болезни печени в случае стеатоза содержания холяновых кислот составляет (мг/мл): $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидрокси- $0,42\pm 0,08$; $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси- $0,092\pm 0,01$; $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -трикетто- $0,013\pm 0,002$; $3\alpha,12\alpha$ -дигидрокси- $0,037\pm 0,007$ и 3α -гидроксихоляновой- $0,016\pm 0,003$ (см.табл.11).

Однако в случае стеатогепатита также было отмечено заметное повышение концентрации (в мг/мл): $3\alpha,7\alpha$ -дигидрокси- на $0,110\pm 0,022$; $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидрокси- на $1,17$; $3\alpha,12\alpha$ -дигидрокси- на $0,041\pm 0,003$;

3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты - на $0,15\pm 0,004$. Полученные данные свидетельствуют о том, что у больных со стеатозом и стеатогепатитом значительно возросло суммарное содержание холановых кислот.

Таблица 11

Содержание холановых кислот в сыворотке крови здоровых людей и больных со стеатозом печени и стеатогепатитом ($M\pm m$), мг/мл

Холановые кислоты	Практически здоровые (n=24)	Б О Л Ь Н Ы Е	
		стеатоз (n=63)	стеатогепатит (n=21)
3 α -гидрокси-	$0,0010\pm 0,0002$	$0,0160\pm 0,003$	$0,038\pm 0,008$
3 α ,12 α -дигидрокси-	$0,0033\pm 0,0003$	$0,037\pm 0,007$	$0,0041\pm 0,003$
3 α ,7 α -дигидрокси-	$0,0066\pm 0,0005$	$0,092\pm 0,010$	$0,110\pm 0,022$
3 α , 7 α , 12 α -трикето-		$0,013\pm 0,002$	$0,015\pm 0,004$
3 α , 7 α , 12 α -тригидрокси-	$0,0068\pm 0,0005$	$0,420\pm 0,080$	$1,170\pm 0,090$
Σ холановых кислот	$0,017\pm 0,003$	$0,570\pm 0,120$	$1,370\pm 0,200$

n - количество здоровых и больных людей.

На основе полученных результатов построили график содержания холановых кислот в зависимости от стадии неалкогольной жировой болезни печени (рис.12).

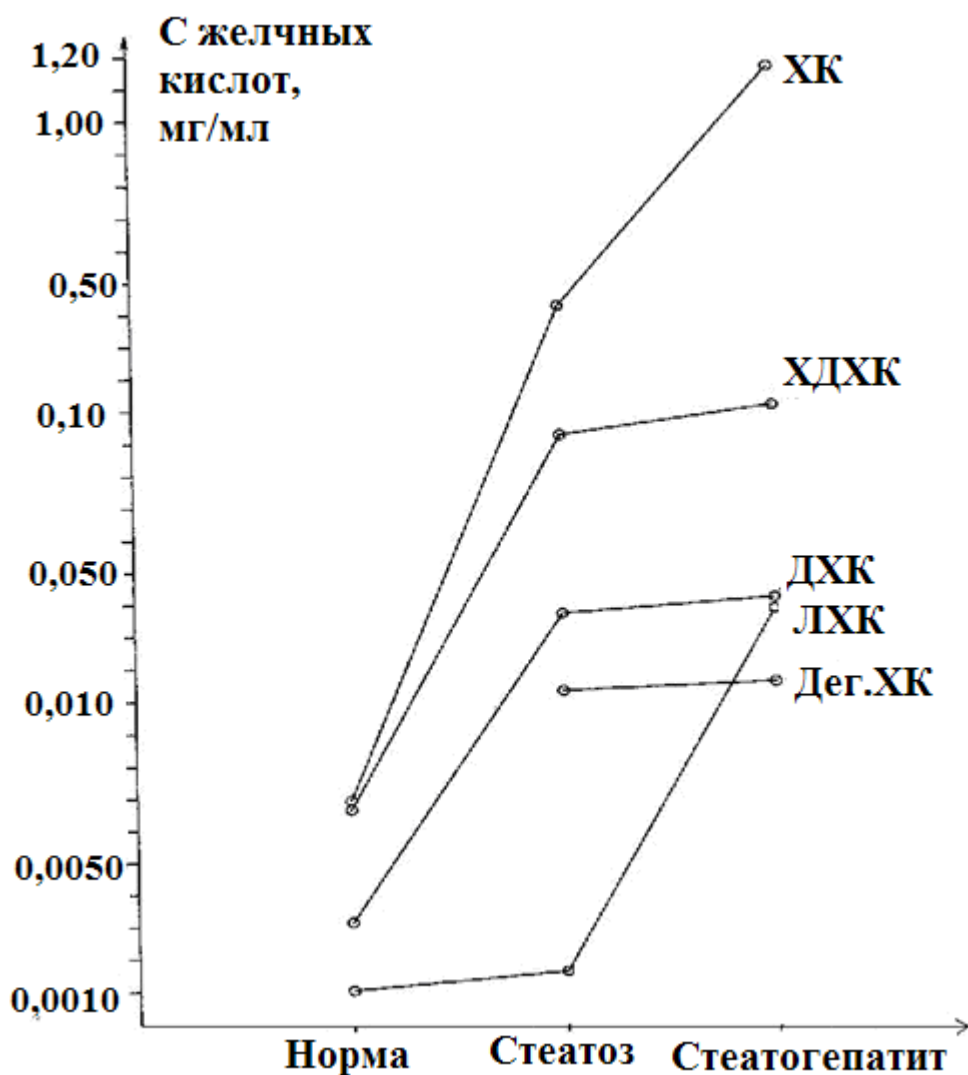


Рис.12. Содержание холановых кислот в зависимости от стадии неалкогольной жировой болезни.

Известно [153], что холановые кислоты соединяются с высшими жирными кислотами, образуя растворимые в воде комплексы (холиеновые кислоты), которые поступают в стенку кишки и в эпителиальных клетках кишечных ворсинок вновь распадаются на холановые и жирные кислоты.

Холановые и жирные кислоты входят в состав растворимых молекулярных комплексов в различных соотношениях, то есть на каждую молекулу жирной кислоты приходится не менее 2-х и не более 4-х молекул холановой кислоты.

В связи с этим, дальнейшие наши исследования направлены на газохроматографическое определение содержания высших жирных кислот в сыворотке крови (табл.12).

Таблица 12

Содержание жирных кислот в сыворотке крови здоровых лиц и больных НАЖБП и НАСГ (в % от общего содержания, $M \pm m$)

Жирные кислоты	Кодовое обозначение	Практически здоровые (n=22)	Больные	
			стеатоз (n=63)	стеатогепатит (n=25)
Пальмитиновая	C _{16:0}	19,50±0,70	23,65±0,78	23,98±0,86
Стеариновая	C _{18:0}	9,50±0,55	15,06±0,82	12,59±0,73
Олеиновая	C _{18:1}	24,05±0,94	33,31±1,3	33,46±1,31
Линолевая	C _{18:2}	22,80±0,31	10,07±0,13	6,99±0,09
Линоленовая	C _{18:3}	6,62±0,09	6,97±0,08	7,96±0,11
Арахидоновая	C _{20:4}	8,80±0,27	11,78±0,37	15,06±0,50
Сумма:				
Насыщенных		29±1,41	38,71±1,75	36,57±1,78
Мононасыщенных		24,05±1,04	33,31±1,3	33,46±1,31
Полиненасыщенных		38,22±1,69	28,82±1,22	30,01±1,32

Установлено, что у больных с жировой болезнью печени резко увеличивается приток свободных жирных кислот в печень и недостаточное их окисление. А это приводит к избыточному количеству в виде триглицеридов в гепатоцитах, в состав которых входит в основном пальмитиновая - 23,65±0,78%, стеариновая - 15,06±0,82%, олеиновая - 33,31±1,3%, линолевая - 10,07±0,13%, линоленовая - 6,97±0,08 и арахидоновая - 11,78±0,37% кислоты [157].

Разработанный новый подход к диагностике жировой болезни печени на основе результатов газохроматографических исследований содержания высших жирных кислот в сыворотке крови, относится к области клинико-

биохимической лабораторной диагностики и может быть использован в качестве прогностического теста при эффективном лечении различных заболеваний печени.

Степень повышения активности АсАТ и АлАТ не является основным показателем тяжести процесса и не имеет отчетливой корреляции с выраженностью стеатоза и фиброза печени [154].

При жировой болезни печени, отмечается повышение активности ГГТ, а также ЩФ в два раза.

Известен также совсем другой подход к диагностике неалкогольной жировой болезни печени [155], который основывается на изучение биопсия печени. Морфология стеатоза, печени обычно указывает на нарушение регуляции синтеза и секреции триглицеридов, конкретные механизмы которых на сегодняшний день изучены не до конца.

Однако морфология жировой болезни печени не позволяет конкретно определить степень участия насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в развития этого процесса.

Есть сведения о другом подходе для установления диагноза жировой болезни печени [156]. Это исследование количества липидов в сыворотке крови. Сущность данного исследования заключается в том, что основной причинной развития ожирения является повышенное содержание в печени свободных жирных кислот [157]. На рис.13 приведена хроматограмма метиловых эфиров высших жирных кислот.

Таким образом, принцип направления нашей работы заключается в определении содержания высших жирных кислот в сыворотке крови у больных с неалкогольной жировой болезнью печени методом газожидкостной хроматографии. Эти результаты можно использовать в качестве дополнительного теста с целью постановки точного диагноза, у больных с жировой болезнью печени.

Полученные результаты являются достоверными фактами в качестве дополнительного теста для постановки точного диагноза у больных неалкогольной жировой болезнью печени.

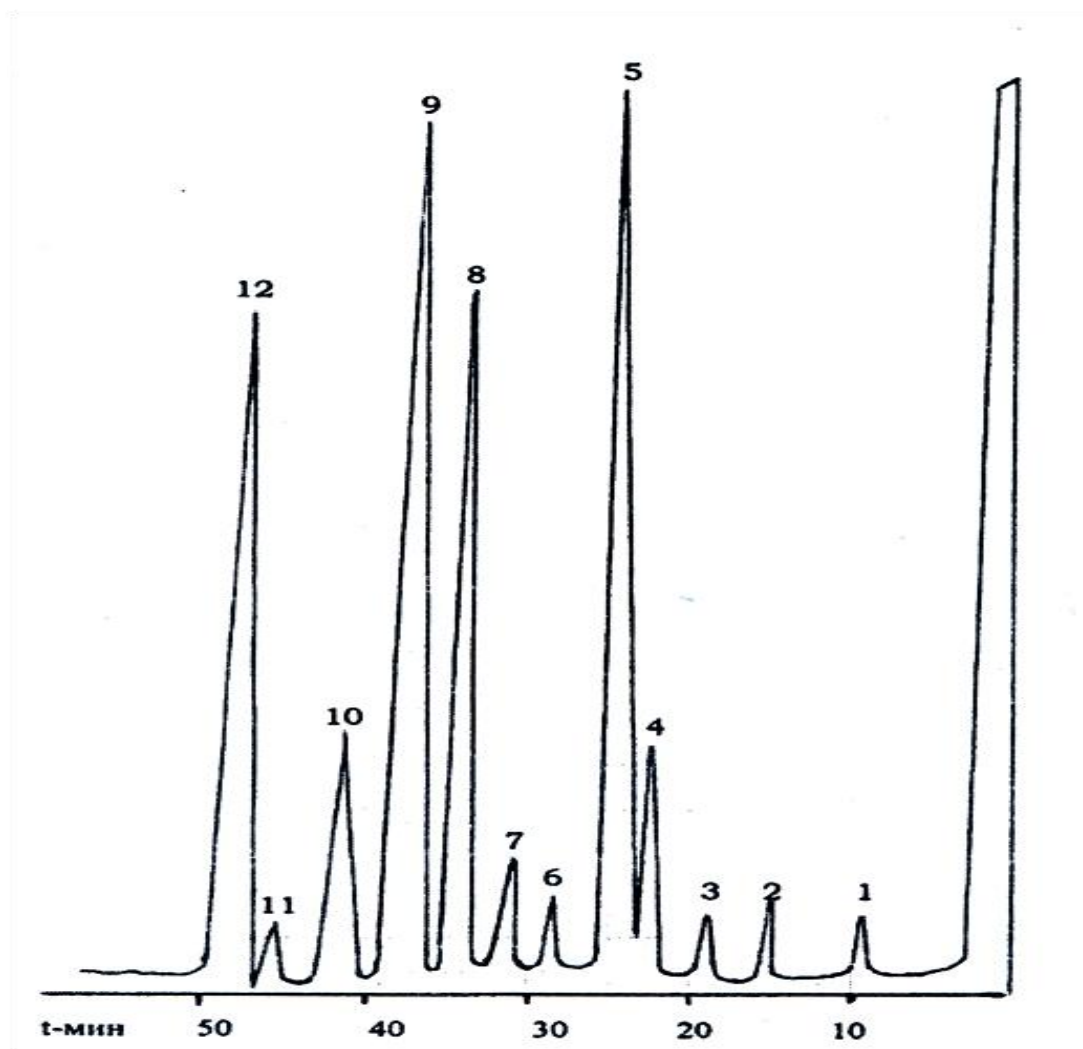


Рис.13. Хроматограмма метиловых эфиров высших жирных кислот в сыворотке крови у здоровых людей: 1 - $C_{10:0}$, 2 - $C_{14:0}$, 3 - $C_{15:0}$, 4 - $C_{16:1}$, 5 - $C_{16:0}$, 6 - $C_{17:1}$, 7 - $C_{17:0}$, 8 - $C_{18:0}$, 9 - $C_{18:1}$, 10 - $C_{18:2}$, 11 - $C_{18:3}$, 12 - $C_{20:4}$.

Это дает право утверждать, что метод определения концентрации высших жирных кислот в крови у больных с неалкогольной жировой болезнью печени является точным и более эффективным по сравнению с существующими, за счет своей точности, кратковременности и работы с очень незначительными количествами реактивов.

ГЛАВА IV. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

4.1. Техника эксперимента, растворы и реактивы

ИК-спектры снимались на спектрометре BEG-40 в области призм: BaCl_2 ($2000\text{-}700\text{ см}^{-1}$) и KBr ($700\text{-}4000\text{ см}^{-1}$). Для кристаллических образцов ИК-спектры снимались в виде таблеток по методике прессования с KBr . Концентрация - $1,5/220$ мг KBr . Для жидких образцов ИК-спектры снимались в виде тонких слоев, получаемых путем зажатия капли жидкости между пластинками из KBr . Толщина слоя $0,015$ мм (15 м).

ПМР-спектры снимались на пробе спектрометра TESLA BC 487 C (частота 80 мгц), растворитель CDCl_3 с использованием эталона ГМДС при 26°C и на приборе спектрометра Bruker AM300, условия: $\text{SF}=300,13$ МГц{1H}, $\text{T}=299\text{K}$, растворитель CDCl_3 .

Для определения чистоты и индивидуальности синтезированных соединений применялась тонкослойная хроматография.

Условия хроматографирования при анализе сложных эфиров холановых кислот, а также для самых холановых кислот и т. д.

Для разделения сложных эфиров холановых кислот, использовали систему, состоящую из смеси хлороформ : этанол $9:1$. Анализы проводились на пластинках «Силуфол», а в качестве проявителя использовались пары йода.

Для разделения холановых кислот использовали систему, состоящую из смеси бутанол: уксусная кислота : дистиллированная вода ($10: 1:1$).

Для разделения оксиаминопропиловых эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты использовали систему, состоящую из смеси хлороформ : этанол в соотношении ($6,5:1$).

Для сложных эфиров использовали элюент хлороформ : метанол в соотношении ($8:2$).

ТСХ-анализ проводили на нанесенных тонких пластинках Silufol, на закрепленном гипсе. Температуру плавления измеряли на микронагревательном столике Voetius.

Газохроматографический анализ метиловых, этиловых, пропиловых, изопрпиловых и бутиловых эфиров 3 α ,12 α -дигидрокси- и 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановых кислот и других продуктов синтеза проводили на хроматографе «Хром-5» (Чехия). Хроматографическая колонка длиной 1,26 м, диаметром 0,3 см, заполненной фазой хроматон N-AW, зернения 0,160-200 мм, с 3% SE-30. Т.к. 250⁰С., испарителя 280⁰С, детектор 265⁰С, скорость газаносителя азота – 40 мл/мин., скорость водорода 30 мл/мин., время анализа 30 мин. Пробы анализировали при условии программирования при скорости поднятия температуры 0,5⁰С/мин. Полученные хроматограммы оценивали методом внутренней стандартизации [158].

Разделение метиловых эфиров основных жирных кислот осуществляли на газовом хроматографе марки «Хром-5» с пламенно-ионизационным детектором. Стекланную колонку длиной 1,26 м и диаметром 0,3 см заполняли хроматоном N-AW, DMDS (0,160-0,200 мм), пропитанным 3% SE-30, температура испарителя - 280⁰С, температура колонки - 260⁰С, программированная температура - 146-255⁰С с градуированием 3⁰С/мин. Для идентификации метиловых эфиров жирных кислот использовали химически чистые препараты пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линоленовой и арахидоновой кислот. Количественную оценку хроматограммы проводили путем измерения площадей пиков [158].

Использовали следующие реагенты для синтеза исходных веществ: соляная кислота, серная кислота марки «хч», NaOH, KOH, CH₃COOH, AlCl₃, N₂, H₂, CO₂, CaCl₂, Na₂SO₄, MgSO₄, K₂CrO₄, C₅H₅N, C₆H₆, SOCl₂, POCl₃.

Все органические растворители, которые были применены в работе (бутиловый, октиловый, изопрпиловый, изобутиловый, пропиловый, этиловый, метиловый спирты, хлороформ, бензол, пиридин, гексан, толуол,

диэтиловый эфир, диоксан, петролейный эфир и др.), очищены и обезвожены по известной в литературе методике [159].

Содержание углерода и водорода определяли сжиганием навески вещества в токе кислорода [160], а содержание общей серы методом, предложенным Волынским «метод двойного сжжения» [161-162].

4.2. Выделение 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты-(IV) по [163]

К 2 л свежей бычьей желчи прибавляют 200 г едкого натрия, смесь кипятят в кварцевом сосуде в течение 18 ч для омыления спаренных кислот.

При подкислении охлажденного щелочного раствора выпадает зеленая вязкая масса, которая медленно твердеет, становится хрупкой и кристаллизуется.

Измельченную массу отделяют и промывают водой, затем растирают пальцами в чашке с чистой водой. После чего массу держат в эксикаторе над серной кислотой в течение 6-8 дней до тех пор, пока она не станет рассыпаться в мелкий порошок. Затем порошок смешивают с абсолютным этиловым спиртом в количестве равным по объему.

Через 2 дня смесь фильтруют при помощи водоструйного насоса.

Твердый порошок кипятят с 400 мл метанола, и оставляют на некоторое время до появления осадка.

После чего отделяют осадок, а фильтрат оставляют для выделения 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты.

Осадок отделяют и повторно перекристаллизовывают из метилового спирта. Затем кристаллическое вещество отделяют, высушивают.

Выход 49 г (86%). Т.пл. 198-199⁰С.

Найдено, %: С - 70,57; Н - 9,86.

Вычислено для C₂₄H₄₀O₅, в %: С - 70,58; Н - 9,80.

4.3. Выделение 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты (II) [163]

Выделенный метанольный маточный раствор из предыдущего опыта выпаривают до половинного объема, выпавший осадок отфильтровывают и многократно перекристаллизовывают из метанола.

Полученный белый кристаллический порошок высушивают над хлоридом кальция.

Выход 14 г. (73%) Т.пл. 177-178⁰С.

Найдено, %: С - 73,39; Н - 10,16.

Вычислено для C₂₄H₄₀O₄, в %: С - 73,36; Н - 10,18.

4.4. Синтез 3 α -гидроксихолановой кислоты (I) по [163]

Смешивают 10 г 3 α -гидрокси-12-кетохолановой кислоты с 3,5 г гидразингидрата (85%), прибавляют 5,6 г растворенного едкого калия в 27 мл этиленгликоля.

Смесь кипятят в течении 2-х часов с обратным холодильником. Затем соединяют колбу с нисходящим холодильником и медленно отгоняют смесь гидразингидрата и воды, пока температура реакционной смеси не поднимается до 195⁰С. Температуру поддерживают до прекращения выделения азота.

После охлаждения реакционную смесь разбавляют равными объёмами воды и подкисляют концентрированной соляной кислотой до рН=3. После чего несколько раз экстрагируют бензолом или этилацетатом. Растворитель промывают и сушат сульфатом натрия. После отгонки растворителя осадок перекристаллизовывают из этилового спирта.

Выход 9,0 г (88%). Т.пл. 184-185⁰С.

Найдено, %: С - 76,53; Н - 10,61.

Вычислено для C₂₄H₄₀O₃, в %: С - 76,59; Н - 10,63.

4.5. Синтез 3 α ,7 α -дигидроксихолановой кислоты (III) по [163]

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, помещают 20 г 3 α ,7 α -диацето-12-кетометилхолата с 7 г гидразингидрата, прибавляют 11,2 г растворенного едкого калия в 55 мл этиленгликоля. Смесь кипятят в течение 2,5 часов с обратным холодильником. Затем соединяют колбу с нисходящим холодильником и медленно отгоняют смесь гидразина и воды, пока температура реакционной смеси не поднимется до 195⁰С. Температуру поддерживают до прекращения выделения азота. После охлаждения реакционную смесь разбавляют равным объёмом воды и подкисляют концентрированной соляной кислотой до рН=3. Затем несколько раз экстрагируют этилацетатом. Экстракт промывают водой и сушат сульфатом натрия. После удаления растворителя осадок многократно перекристаллизовывают из этилового спирта.

Выход 11 г (63%). Т.пл. 140-141⁰С.

Найдено, %: С - 73,31; Н - 10,12.

Вычислено для C₂₄H₄₀O₄, в %: С - 73,36; Н - 10,18.

4.6. Синтез 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты (V) по [163]

5 г (0,012 моль) 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты растворяют в 200 мл уксусной кислоты, обрабатывают 28,5 г (0,14 моля) хромата калия (K₂CrO₄) в 90 мл дистиллированной воды и оставляют при 25⁰С на 24 часа. После чего реакционную массу разбавляют до помутнения водой, образовавшийся осадок отфильтруют и промывают водой до нейтральной реакции (рН=7). Полученный осадок перекристаллизовывают из этилового спирта.

Выход 4 г (96%). Т.пл. 237-238⁰С.

Найдено, %: С - 71,06, Н - 9,97.

Вычислено для $C_{24}H_{34}O_5$, в %: С - 71,09; Н - 9,95.

4.7. Синтез метилового эфира 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты (IX) по [50]

В круглодонную колбу помещают 100 г (0,25 моля) 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты и растворяют в 300 мл метанола. Затем добавляют 4 мл концентрированной соляной кислоты, и смесь кипятят с обратным холодильником и хлоркальциевой трубкой в течение 20 минут. Реакционную колбу оставляют на ночь, затем фильтруют и сушат при 100⁰С в термостате. Продукт перекристаллизовывают из метанола.

Выход 97 г (92%). Т.пл. 156-157⁰С.

Найдено, %: С - 73,81; Н - 10,39.

Вычислено для $C_{25}H_{42}O_5$, в %: С - 73,89; Н - 10,34.

Аналогичным образом были синтезированы метиловые эфиры других холановых кислот (VI, VII, VIII, IX, X).

4.8. Синтез метилового эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты (XI)

В круглодонную колбу емкостью 50 мл добавляют 0,5 г (0,00127 моль) 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты и 35 мл абсолютного метанола и 1 каплю концентрированной серной кислоты. Смесь кипятят в течение 2,5-3 часов. После охлаждения трижды экстрагируют по 50 мл эфиром. Эфирные экстракты объединяют, промывают водой до рН=7 и сушат над Na_2SO_4 . После фильтрования упаривают растворитель.

Выход 0,45 г (87%). Т.пл. 75-76⁰С.

Найдено, в %: С - 73,85; Н - 10,39.

Вычислено для $C_{25}H_{42}O_4$; в %: С - 73,89; Н - 10,34.

Аналогичным образом были получены другие сложные эфиры 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты (XI, XII, XIII, XIV, XV).

4.9. Синтез метилового эфира 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты (XVI)

В круглодонную колбу емкостью 50 мл добавляют 0,3 г (0,0007 моль) 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты и 15 мл абсолютного метанола и 1 каплю концентрированной серной кислоты. Смесь кипятят в течении 2,5-3 часов. После охлаждения трижды экстрагируют по 30 мл эфиром. Эфирные экстракты объединяют, промывают водой до pH=7 и сушат над Na₂SO₄. После фильтрования упаривают растворитель.

Выход 0,24 г (96%). Т.пл.241-242⁰С.

Найдено, в %: С - 72,19; Н - 8,55.

Вычислено для C₂₅H₃₆O₅, в %: С - 72,11; Н - 8,65.

Аналогичным образом были получены другие сложные эфиры 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты (XVII, XVIII, XIX, XX).

4.10. Синтез 3-ацето 12-гидрокси метилового эфира холановой кислоты (XXIII)

В круглодонную колбу емкостью 50 мл добавляют 0,2 г (0,00049 моль) метилового эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты, 0,53 мл бензола, 0,22 мл пиридина, 0,22 мл (0,0021 моль) уксусного ангидрида. Реакционную смесь оставляют при температуре 25⁰С в течение 12-14 часов.

После чего смесь разбавляют водой и отделяют бензольный слой, промывают водой и сушат над Na₂SO₄.

Выход 0,10 г (80%), Т.пл.62-63⁰С.

Найдено, в %: С - 72,35; Н - 9,86.

Вычислено для C₂₇H₄₄O₅, в %: С - 72,32; Н - 9,82.

Аналогичным образом были получены другие ацилпроизводные 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты (XXIV, XXV, XXVI, XXVII).

4.10.1. Получение гидразида 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты (XLII) по [55]

В круглодонную колбу помещают 5 г (0,011 моль) пропилового эфира 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты и 25 мл пропилового спирта. Затем добавляют 2,2 мл гидразингидрата и смесь кипятят в течение 6 часов. После этого удаляют избыток растворителя, а остаток перекристаллизовывают из метанола.

Выход 4,4 г (85%). Т.пл. 120-121⁰С.

Найдено, %: С - 68,27; Н - 9,91

Вычислено для C₂₄H₄₂N₂O₄, в %: С - 68,24; Н - 9,95

Аналогичным образом было получено соединение (XLIII).

4.10.2. Получение этилового эфира пара-амино-фенил-2-оксипропилового эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты (XXXVII)

В круглодонную колбу на 250 мл, снабженную обратным холодильником, помещают 0,5 г (0,0011 моль) моноглицидного эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты, 2,40 мл или 1,87 г (0,075 моль) метилового спирта, 0,020 мл (0,0011 моль) воды и 0,186 г (0,0011 моль) пара-амино-этилового эфира бензойной кислоты. Смесь нагревают на водяной бане и кипятят 2,5 часа. По окончании кипячения смесь охлаждают до комнатной температуры.

Выход 0,6 г (85%). Т.пл. 110-111⁰С.

Найдено, в %: С - 70,44; Н - 8,90.

Вычислено для C₃₆H₅₅NO₇, в %: С - 70,47; Н - 8,97.

Аналогичным образом были получены другие гидразидпроизводные холановых кислот, соединения (XXXVII, XXXVIII, XXXIX, XL и XLI).

4.10.3. Получение 3-хлорбензо(b)тиофен-2-карбоксихидразида 3 α ,7 α ,12 α -тригидроксихолановой кислоты (XLIV)

В трехгорлую колбу, снабженную механической мешалкой, обратным холодильником, помещали 0,6 г (0,00156 моль) гидразид 3 α ,7 α ,12 α -тригидрокси холановой кислоты и 0,36 г (0,00156 моль) хлорангидрида 3-хлорбензо (b) тиофен-2-карбоновой кислоты и добавляли 2,5 мл раствора сухого пиридина.

Реакционную смесь при температуре 80-85°C перемешивали в течение 3-3,5 часов.

По окончании реакции содержимое колбы вливали в стакан с 100 г льда. Выпавший осадок отфильтровали, промывали водой до pH=7 и сушили на воздухе.

Выход 0,5 г (87%). Т.пл. 165-166°C.

Найдено, в %: С - 64,68; Н - 6,81.

Вычислено для C₃₃H₄₂ClN₂O₅S, в %: С - 64,65; Н - 6,85.

Аналогичным образом были получены другие гидразидпроизводные холановых кислот, соединения (XLIV, XLV, XLVI, XLVII и XLVIII).

4.10.4. Синтез пропан-1,2-диолового эфира 3 α ,7 β -дигидроксихолановой кислоты (XXI)

В круглодонную колбу с присоединенным к обратным холодильником помещают 15 г (0,036 моль) натриевой соли 3 α ,7 β -дигидроксихолановой кислоты в 50 мл метанола и добавляют 3,98 г (0,036 моль) α -хлоргидрина глицерина в 10 мл метанола. Реакционную смесь кипятят в течение 6 часов. После чего содержимое колбы отфильтровывают с целью избавления от осадка хлорида натрия. Затем после удаления растворителя, остаток

полученного пропан-1,2-диолового эфира 3 α ,7 β -дигидроксихолановой кислоты перекристализовывают из метанола.

Выход 15 г (89%). Т.пл. 210-211°C.

Найдено, в %: С - 69,31; Н - 10,09.

Вычислено для C₂₇H₄₇O₆, %: С - 69,37; Н - 10,06.

4.10.5. Синтез 3-хлорбензо[b]тиофен-2-карбоксихидразид-3 α ,7 α -дигидрокси-12-кетохолановой кислоты (XLIX)

В трехгорлую колбу, снабженную механической мешалкой и соединенную с обратным холодильником, помещали 11,34 г (0,027 моль) гидразид-3 α ,7 α -дигидрокси-12-кетохолановой кислоты и добавляли 35 мл сухого пиридина. Реакционную смесь при температуре 80-85°C перемешивали в течение 3-3,5 часов. По окончании реакции, содержимое колбы вливали в стакан с 100 г льда и выпавший осадок отфильтровали, промывали водой до pH=7 и сушили на воздухе и затем перекристализовывали из спирта.

Выход 13,33 г (80,4%). Т.пл. 176-179°C.

Найдено, в %: С - 46,66; Н - 6,49.

Вычислено для C₃₃H₄₄ClN₂O₅S, в %: С - 46,77; Н - 6,54.

4.10.6. Синтез 12 α -тозилоксиэфира 3 α ,7 α -диацетокси-5 β -метилхолановой кислоты (XXII)

В трехгорлую колбу, снабженную механической мешалкой, обратным холодильником и капельной воронкой, помещают 5 г (0,01 моль) метилового эфира 3 α ,7 α -диацетокси-12-гидроксихолановой кислоты и при перемешивании растворяют в 15 мл сухого пиридина.

После чего при постоянном перемешивании по каплям в течение 5 минут добавляют раствор 1,9 г (0,01 моль) п-толуолсульфохлорида в 15 мл сухого пиридина. Реакционную смесь при температуре 70-75°C

перемешивали в течение 6-часов. По окончании реакции содержимое колбы вливается в стакан с 150 г льда и выпавший осадок отфильтровывается, промывается водой и сушится на воздухе, затем перекристаллизовывается из этилового спирта.

Выход 5 г (88%). Т.пл. 223-224°C.

Найдено, в %: С - 65,49; Н - 7,81.

Вычислено для $C_{36}H_{52}O_9S$, в %: С - 65,45; Н - 7,87.

Некоторые встречные синтезы

4.10.7. Получение пропилового эфира 3 α ,7 α ,12 α - трикетохолановой кислоты по [163]

В колбу помещают 12 г (0,026 моля) пропилового эфира холевой кислоты и добавляют 138 мл уксусной кислоты. После чего растворяют 11,39 г хромата калия (K_2CrO_4) в 26,4 мл воды и раствор добавляют в реакционную колбу. Содержимое колбы после перемешивания оставляют на 15 часов при температуре 25°C. После чего содержимое колбы разбавляют водой до помутнения. Выпавший осадок отфильтровывают и многократно промывают водой до pH=7. Полученный пропиловый эфир 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты перекристаллизовывают из этилового спирта.

Выход 10 г (84%). Т.пл. 220-221°C.

Найдено, в %: С - 72,92; Н - 9,08.

Вычислено для $C_{27}H_{40}O_5$, в %: С - 72,97; Н - 9,00.

4.10.8. Синтез 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты из 3 α -ацето, 12 α -гидроксиметилхолата по [44]

В трехгорлую круглодонную колбу, снабженную механической мешалкой, обратным холодильником и капельной воронкой, помещали 20 г (0,037 моль) 3 α -ацето, 12 α -гидроксиметилхолата и растворяли в 90 мл

диоксана.

При перемешивании и при комнатной температуре по каплям приливали раствор 7-8 г КОН в 40 мл воды. Затем содержимое колбы перемешивали еще 0,5 часов до полного протекания реакции.

Полученные кристаллы 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты отфильтровывали, промывали 15-20 мл ацетоном и перекристаллизовали из этилового спирта.

Выход 13 г (74,4%). Т.пл. 177-178°C.

Найдено, в %: С - 73,31; Н - 10,11.

Вычислено для C₂₄H₄₀O₄, в %: С - 73,36; Н - 10,18.

4.10.9. Синтез 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты из 3 α ,12 α -дигидрокси-7-кетометилхолата по [56]

В круглодонную колбу, снабженную обратным холодильником, помещают 20 г 3 α ,12 α -дигидрокси-7-кетометилхолата с 7 г гидразингидрата, прибавляют 11,2 г растворенного едкого калия в 55 мл этиленгликоля. Смесь кипятят в течение 2,5 часов с обратным холодильником. Затем соединяют колбу с нисходящим холодильником и медленно отгоняют смесь гидразина и воды, пока температура реакционной смеси не поднимается до 195°C. Температуру поддерживают до прекращения выделения азота. После охлаждения реакционную смесь разбавляют равным объёмом воды и подкисляют концентрированной соляной кислотой до pH=3. Затем несколько раз экстрагируют этилацетатом. Экстракт промывают водой и сушат сульфатом натрия. После удаления растворителя осадок многократно перекристаллизовывают из этилового спирта.

Выход 13,9 г (75%). Т.пл. 177-178°C.

Найдено, в %: С - 73,39; Н - 10,14

Вычислено для C₂₄H₄₀O₄, в %: С - 73,36; Н - 10,18.

4.10.10. Синтез 3 α -ацето-12 α -кетометилхолата (XXVIII) исходя из 3 α -гидрокси-12 α -кетометилхолата по [122]

В колбу емкостью 250 мл добавляют 2 г (0,004 моль) 3 α -гидрокси-12 α -кетометилхолата, 9-10 мл бензола, 2,5 мл пиридина и 2,5 мл уксусного ангидрида. Реакционную колбу, взбалтывают и оставляют при температуре 25⁰С в течение 15 часов. Затем после отделения бензольной фракции, промывают водой, затем слабым раствором соляной кислоты для полного удаления пиридина.

После удаления бензола полученный продукт подвергают перекристаллизации.

Выход 1.98 г (87%). Т.пл. 43-44⁰С.

Найдено, в %: С - 72,69; Н - 9,46.

Вычислено для С₂₇Н₄₂О₅, в %: С - 72,64; Н - 9,41.

ВЫВОДЫ

1. Впервые изучены последовательные реакции получения производных холановых кислот путём этерификации, ацилирования, окисления, взаимодействия гидразидов, глицидных эфиров с рядом нуклеофильных реагентов, которые привели к синтезу новых биологически активных веществ и результатам, имеющим комплексное применение.
2. Найдены оптимальные условия синтеза сложных эфиров 3 α ,7 β -дигидрокси-, 3 α ,12 α -дигидрокси-, 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановых кислот, которые дают возможность использования их в качестве полупродуктов для синтеза антимикробных, противовоспалительных, холелитолитических, гипохолестеринемических и гепатопротективных средств.
3. Изучены реакции ацилирования различных эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты, в результате чего синтезирован ряд ацилпроизводных соответствующего строения.

Установлено, что гидроксил в положении 12 α - в молекуле стероида не затрагивается. Это позволяет расширить информацию о реакционной способности вышеназванных сложных эфиров и их поведении в реакциях ацилирования.
4. Разработаны оптимальные условия реакции окисления ряд сложных эфиров 3-ацето-12-гидроксихолановой кислоты и синтезирован ряд кетопроизводных соответствующего строения, являющихся исходными полупродуктами для литолитических препаратов.
5. Впервые исследованы химические свойства глицидного эфира 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты и выявлены оптимальные условия взаимодействия глицидного фрагмента стероида с первичными аминами, приводящие к получению оксиаминопропиловых эфиров 3 α ,12 α -

дигидроксихолановой кислоты, как потенциальных биологически активных веществ.

6. Исследовано поведение некоторых гидразидов холановых кислот в реакциях с различными хлорангидами кислот и показано, что их посредством можно получить многочисленные производные холановых кислот, проявляющие противомикробную активность.
7. Впервые проведены сравнительные газохроматографические исследования содержания холановых и высших карбоновых кислот в сыворотке крови у больных с жировой болезнью печени. Установлено, что эти данные дают широкую информацию о состоянии жирового обмена и составе отложившихся триглицеридов, которые можно использовать при диагностике и эффективном лечении 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, Myriam Witvrouw, Tracyl Hartman, Jim. A. Turpin, Robert W. Buckheit, Jr. And Mark Cushman // Tetrahedron 57 (2001). -С.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. N. Tu. Bile acid conjugates of a nonsteroidal glucocorticoid receptor modulator / N. Tu [et al] // Bioorg. Med. Chem. Lett., 2004. –V.14. – P.4179-4183.
12. Kannan, A. 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. Paschke, R. 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 Вали Султан. Синтез и превращения полифункциональных производных 1,3,4-тиадиазоло [3,2-а]пиримидина: автореф. дисс. ...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; Под ред. акад. / Х.Х. Мансурова. Вып.9. – Душанбе: Дониш, 1985. -С.6-9.
20. Ding, B. 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. Rajagoplan // 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 // Изв. АН ТаджССР, отделение 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 иммуотрапных вещества класса гетеростероидов / А.А. Архем, Б.Б. Кузьмицкий, Ф.А. Лахвич, В.А. Хритач, Ю.Л. Журавков // 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, A. Befeler, J. Keach, K. Lindor // 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. Rajaqaplans // J. Amer. Chem. Soc., 1949. -V.72. -P.5531-5533.
36. Palmer, K.R. Inraductal mono-octanoin 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: тез. докл. -Ташкент, 1990. -Т.1. -Ч.II. -С.2
39. Кадыров, А.Х. $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ - тригидроксихолановой кислоты и синтеза на его основе / А.Х. Кадыров, З.Д. Назарова, И.Г. Решетова // Докл. АН Республики Таджикистан, 1991. -Т.34. -№9. -С.564-466.
40. Miller, A. D. - *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998. -V.37. -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. Gilat, T. 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. Gilat, T. 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. // *Hepatology*, 2003. -V.38. -№2. –P.436-442.
44. Goldiner, I. ABCA1 dependent but Apo A1 independent cholesterol and phosphatidylcholineefflux mediated by FABAC / I. Goldiner, A. Leikin-Frenkel, T.Gilat, F.M. Konikoff, A.K. Groen // 25th ELC (European Lipoprotein Club) Annual Meeting, September 9-12, 2002.
45. Целебные свойства продуктов жизнедеятельности. <http://mewo.ru>
46. Максимов, В.А. Современный взгляд на процессы желчеобразования и желчевыделения / В.А. Максимов [www.SOLVAY-PHARMA. RU](http://www.SOLVAY-PHARMA.RU).
47. Лейшнер У. Практическое руководство по заболеваниям желчевыводящих путей / Лейшнер У. - М., 2001. -264 с.
48. Шаранин, Ю.А. 2`-Аминоандрост-2-[2,3в] тиофен / Ю.А. Шаранин, В.К. Проманенков // ХПС, 1980. -№11. -С.1564-1565.
49. Шведов, В.И. Реакции енаминов / В.И. Шведов, А.Н. Гринев // Журн. 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 // Материалы Республиканской научно-практической конференции «Актуальные вопросы семейной медицины», посвященной 75-летию член-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 // Докл. АН Республики Таджикистан, 2006. -Т.49. - №10-12. –С.933-938.
52. Назарова, З.Д. Синтез и свойства аминотиофенсодержащих желчных кислот / З.Д. Назарова, М.М. Муродова, А.Х. Кадыров, К.Х. Хайдаров // Материалы Республ. конф. «Достижения в области химии и химической технологии» -Душанбе, 2002. -С.77-79.
53. Кадыров, А.Х. Некоторые реакции $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -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 // Докл. АН Республики Таджикистан, 2005.- Т.XLVIII. - №2. -С.18-20.
56. Назарова, З.Д. $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -тригидроксихолановая кислота и синтезы на её основе: Автореф. дисс. ... 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: Дисс. ... 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 // Докл. АН Республики Таджикистан, 1998. - Т.XLI. -№11-12. -С.63-66.
59. Назарова, З.Д. Синтез и свойства аминотиофенсодержащих желчных кислот / З.Д. Назарова, М.М. Муродова, А.Х. Кадыров, К.Х.Хайдаров // Материалы Республ. конф. «Достижения в области химии и химической технологии». -Душанбе, 2002. -С.77-79.
60. Назарова, З.Д. Синтез и свойства аминотиофенсодержащих желчных кислот / З.Д. Назарова, М.М. Муродова, А.Х. Кадыров, К.Х. Хайдаров // Материалы Республ. конф. «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 // Докл. АН Республики Таджикистан, 2005. - Т.XLVIII. -№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 конф. профессорско-преподавательского состав и студентов, посвященная году образования и технических знаний. – Душанбе, 2010. -С.193-194.
63. Пат. № ТЈ 358. «Триоин» в качестве препарата, растворяющего холестериновые и пигментные камни желчного пузыря и желчных протоков / Кадыров А.Х., Бахроми М.Т., Мироджов К.Х., Хайдаров К.Х., Кадиров А.А., Суриев М.Р. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Таджикистан от 30.07.2010 г.

64. Пат. РТ № ТЈ 237. Глицериновый эфир 3 α . 7 α -дигидроксихолановой кислоты, способ его получения и его применение в качестве лекарственного препарата / Кадыров А.Х., Хайдаров К.Х., Назаров В.А., Назарова З.Д. 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 конф. «Современная медицина и новые технологии», посвящ. году образования и технической культуры. – Душанбе, 2010. –С.210-213.
66. Бахроми, М.Т. «Триоин» - растворитель холестерина желчных камней при желчнокаменной болезни / М.Т. Бахроми, А.Х. Кадыров, К.Х. Хайдаров // Здоровоохранение 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 // Здоровоохранение 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 Авиациенны, 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-теоретич. конф. профессорско-преподавательского состава и студентов, посвящ. 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, J.G. Molone, M.H. Nantz, R.W. Molone – 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 , Т. Bioorg. Med / Т. Yoshimura., S.Hasegawa, N. Hirashima, M. Nakanishi, T. Ohmada // Chem. Lett., 2001. -V.11. -P.2897-2901.
74. Ren, Т. Bioorg. Med / Т. Ren, G. Zhang, D. Liu, F. Liu // 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, N.A. Kogan, L.Wierchs, C.B. Longley, K.Brucker, H.R. Axelrad, S.Midha, S. Babu, D.Kahne // 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. Paumqarner // Schaffer verlaq. –Stuttqazt, New-York, 1875. -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. Conqes in bile chemistry and dissolonqed of cholesterol calculi 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 // Материалы симпозиума «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 Pesearch 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, Norman A. // 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 $[7\beta\text{-}^3\text{H}] 7\alpha\text{-Hydroxychole sterol}$ and $[G\text{-}^3\text{H}] 26\text{-Hydroxychole sterol}$ / M Goldman, Z.V. Reno et al // Hepatology v.2, №1, 1982, -p. 59-66.
96. Street , I.M. The guantitative stimation of bile acids and their conjuqates in human biological fluids / I.M. Street, D.I. Trafford, H.L. Makin // J. Lipid Res., 1983. -V.24. -P.491-511.
97. Iwata, T. Ensymatic determination and thin-iauer chromatography of bile acids in blood / T. Iwata, K. Vamasaki // J. Biochem. Tokyo, 1964. -V.56. -P.424-431.

98. Turley, S.D. Re-evaluation of the 3 α - hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile / S.D. Turley, J.M. Dictschy // J. Lipid Res., 1978. –V.19. –P.924-928.
99. Кадырова, А.А. Результаты изучения холелитолитического действия бальзама «Сино» / А.А. Кадырова, К.Х. Хайдаров // Материалы Международной конференции «Актуальные проблемы человека и животных». - Душанбе, 2003. -С.91-94.
100. Холов, Ё.К. Исследование холелитического действия настойки «Рамит» / Ё.К. Холов, А.Х. Кадыров, К.Х. Хайдаров // Докл. АН Республики Таджикистан, 2009. -№ 4. -С.68-71.
101. Okuyama, S. A New analytical method of individual bile acids using high performances liquid chromatography and immobilized 3-hydroxysteroid dihydrogenase in column for / S. Okuyama, W.Kokubun, S.Hiqashidate et. al // Chem. Lett., 1979. -P.1443-1446.
102. Мансуров, Х.Х. Современные представления о механизме образования желчных камней: В кн.: Желчнокаменная болезнь / Х.Х. Мансуров. - Душанбе, 1981. -С.25-29.
103. Мансуров, Х.Х. О генезе алитогенности желчи у собак: В кн. : Желчнокаменная болезнь / Х.Х. Мансуров, А.К. Кахаров. - Душанбе, 1981. -С.29-31.
104. 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.
105. Кадыров, А.Х. Определение желчных кислот в желчи методом газожидкостной хроматографии / А.Х. Кадыров, Г.Б. Тамурадова, М.А. Гафарова // Лабораторное дело, №6. -С.343-345.
106. Сайфуддинов, А.К. Газохроматографическая оценка желчных кислот в желчи здоровых людей и у больных желчнокаменной болезни / А.К.

- Сайфуддинов, А.Х. Кадыров, Ф.Х. Мансурова, К.Х. Хайдаров // Материалы Республ. конф. «Актуальные проблемы производства лекарственных препаратов на основе местного сырья» -Душанбе, 2003. -С.152-157.
107. Кадыров, А.Х. Определение конъюгированных желчных кислот методом газожидкостной хроматографии / А.Х. Кадыров // Материалы Всесоюзного симпозиума «Желчнокаменная болезнь». – Душанбе: Дониш, 1981. -С.73-74
108. 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.
109. Кадыров, А.Х. Определение желчных кислот сыворотки крови методом газожидкостной хроматографии / А.Х. Кадыров, З.М. Орзиев // Лабораторное дело, 1986. -С. 26-28.
110. Кадыров, А.Х. Определение содержания сывороточное желчных кислот у больных гепатита, циррозом печени / А.Х. Кадыров, А.К. Сайфудинов, Ф.Х. Мансурова // Труды III Республ. науч. конф. общества биохимиков РТ «Вклад биохимиков Таджикистана в развитие биологической науки». -Душанбе, 2003. -С.93-95.
111. Сайфудинов, А.К. Сравнительная оценка содержания желчных кислот сыворотки крови у больных с хроническим холециститом / А.К. Сайфудинов, А.Х. Кадыров, Ф.Х. Мансурова, К.Х. Хайдаров // Материалы Международной науч.-практич. конф. «Актуальные проблемы физиологии человека и животных» - Душанбе, 2003. -С.55-59.
112. Bergstrom, S. Formation and tism of bile acids In: Code CF, Heidel W., eds. Handbook of physiology, Sect, 6 vol v. Washington DC / S.

- Bergstrom, H. Danielsson // American physiological Society, 1988. - P.2391-2407.
113. Пат. РТ № ТҶ 283. Способ определения холестерина в сыворотке крови методом газожидкостной хроматографии / Кадыров А.Х., Мироджов Г.К., Кодиров А.А., Суриев М.Р., Раджабов Г.О. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Таджикистан от 2009 г.
114. 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 // Материалы Республиканской конф. «Образование и техническая культура в развитии биологических наук». –Душанбе, 2010. –С.45-74.
115. 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 // Здоровоохранение Таджикистана, 2009. -№3. –С.27-30.
116. 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 // Здоровоохранение Таджикистана, 2009. -№3. –С.154-156.
117. 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 // Материалы годичной науч.-практич. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали Ибн Сино, посвящ. 20-летию

- независимости Республики Таджикистан –Душанбе, 2011. –С.417-419.
118. Кадыров, А.Х. Синтез эталонных образцов холановых кислот / А.Х. Кадыров, М.Р. Суриев, М.Б. Тошев, К.Х. Хайдаров // Докл. АН Республики Таджикистан, 2008. –Т.51. -№10. –С.746-749.
119. Маслов, М.А. «Пинцетообразные» структуры на основе изостевиола / М.А. Маслов, Е.В. Сычева, Н.Г. Морозова, Г.А. Серебренникова // Известия РАН, сер. химия, 2000. -№3. –С.385-400.
120. Fujiwara, T. Gene transfection activities of amphiphilic steroid-polyamine conjugates / T. Fujiwara, S. Hasegawa, N. Hirashima, M. Nakanish, T. Ohmada // Biochim. Biophys. Acta, 2000. -V.1468. –P. 396-402.
121. Султонмамадова, М.П. Синтез сложных эфиров 3α , 7α , 12α -трикетохолановой кислоты / М.П. Султонмамадова, А.Х. Кадыров, К.Х. Хайдаров // Докл. АН Республики Таджикистан, 2011. -Т.54. -№8. –С.649-652.
122. 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.
123. Физер, Л. Органическая химия / Л. Физер, М. Физер. – М.: Химия, 1969. -Т.1. –С.70.
124. Вайсбергер, А. Органические растворители / А. Вайсбергер, Э. Проскауэр, Д. Риддук, Д. Тунис. – М.: Наука, 1975. -С.518.
125. Вяхирев, Д.А. Руководство по газовой хроматографии / Д.А. Вяхирев, А.Ф. Шушунова. – М.: Высшая школа, 1987. -С.224-239.
126. Назарова, З.Д. Исследование структурных особенностей биологически активных моноглицидных эфиров желчных кислот / З.Д. Назарова, А.Х. Кадыров, Т.Х. Абдуллаев, К.Х. Хайдаров // Докл. АН Республики Таджикистан, 1998. -Т.XLI. -№11-12. -С.17-21.

127. Наканиси, И. Инфракрасные спектры и строение органических соединений / И.Наканиси. – М.: Мир, 1965. –С.36-39.
128. 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.
129. 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.
130. 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.
131. Муродова, М.М. Модификационный синтез некоторых производных холановых кислот / М.М. Муродова, А.Х. Кадыров, З.Д. Назарова, К.Х. Хайдаров // Докл. АН Республики Таджикистан, 2006. –Т.49. - №10-12. –С.933-938.
132. Kannon, E. Synthesis and anti-HIV activity of a bile acid analog of cosalane / E, Kannon, Declercg, C. Pannecougue, M . Witvrouw, T.L Hartman, J.A. Turpin, R.W. Buckheit, M. Cusman. // Tetrahedron 57 (2001). -P.9385-9391.
133. Султонмамадова, М.П. Исследование реакции ацилирования сложных эфиров $3\alpha,12\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты / М.П. Султонмамадова, А.Х. Кадыров // Материалы Республиканской конференции «Комплексообразование в растворах». Душанбе, 2012. - С.35-36.
134. 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.

135. Султонмамадова, М.П. Синтез на основе метиловых эфиров холановых кислот / М.П. Султонмамадова, А.Х.Кадыров // Материалы Республиканской конф. «Химия: исследования, преподавание и технология», посвящ. «Году образования и технических знаний». –Душанбе, 2010. –С.28-30
136. Султонмамадова, М.П. Синтез диэтиламино-оксипропиловых эфиров холановых кислот / М.П. Султонмамадова, А.Х.Кадыров // Материалы Республ. конф. «Химия: исследования, преподавание и технология», посвящ. «Году образования и технических знаний» – Душанбе, 2010. –С.33-34.
137. Муродова, М.М. Гидразиды некоторых производных холановых кислот / З.Д. Назарова, А.Х. Кадыров, К.Х. Хайдаров // Докл. АН Республики Таджикистан, 2005. -Т.48. -№2. -С.18-20.
138. Назарова, З.Д. Синтез и свойства аминотиофенсодержащих желчных кислот / З.Д. Назарова, М.М. Муродова и др. // Материалы Республ. конф. «Достижения в области химии и химической технологии». - Душанбе, 2002. -С.198.
139. Кадыров, А.Х. Глицериновый эфир $3\alpha,7\alpha$ -дигидроксихолановой кислоты для растворения холестериновых желчных камней / З.Д. Назарова, К.Х. Хайдаров // Докл. АН Республики Таджикистан, 1997. -Т.40. -№1-2. -С.72-75.
140. 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.
141. Султонмамадова, М.П. Изучение реакции гидразидов холановых кислот / М.П. Султонмамадова, А.Х.Кадыров // Материалы Республ.

- конф. «Химия: исследования, преподавание и технология», посвящ. «Году образования и технических знаний». – Душанбе, 2010. – С.16-17.
142. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. М.Л. Беленький. – М.: Медицинская литература, 1963. -С.105-106.
143. Шахов, А.Г. Методические рекомендации по диагностике, профилактике и лечению респираторных болезней телят / А.Г. Шахов, С.М. Сулеймонов. -Тамбов, 1985. -С.35-36.
144. Салимов, Т.М. Антимикробная активность 1,3,4-тиадиазоло[3,2- α] пиримидина / Т.М. Салимов, З.Г. Сангов, З.Д. Ашурова, М.А. Куканиев, С.С. Саторов, К.Х. Хайдаров // Здоровоохранение Таджикистана, 2009. -№3. -С.173-176.
145. Теддер, Дж. Промышленная органическая химия / Дж. Теддер, А. Нехватал, А. Джубб //Пер. с англ. -М.: Мир, 1997. -С.404-416.
146. Burger, F. Medical Chemistry, 3r ed. Wiley-Interscience. / F. Burger. - New-York, 1970.
147. Максимов, В.А. Билиарная недостаточность / В.А. Максимов, А.Л. Чернишев, К.М. Тарасов, В.А. Неронов. -М.: Изд. Товарищество «Адамант», 2008. –С.21-28.
148. Lonardo, A. Hepatic-steatosisandinsulinresistencel: doesetiologymakeadifferences / A. Lonardo, S. Lambardini, F. Scaglioni, L. Caruli., M. Ricchi, D. Ganazzi, L.E. Adinolfi, G. Ruggiero, N. Coruli, P. Loria // J. Hepatol., 2006. -№44(1). –P.190-196
149. 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, M.Nilsson, A.Barthel, D.Schmoll, R.Walther // Am. J. Gastroenterol., 2006. -V.101(1). –P.70-75.
150. Вахрушева, Я.М. Жировой гепатоз / Я.М. Вахрушева, Е.В. Сычкова // Тер. архив, 2007. -Т.78. -№11. -С.83-86.

151. Пат. РТ № ТЈ 525. Способ диагностики жировой болезни печени / Кадыров А.Х., Мироджов Г.К., Худжамуродов М.Н., Н.К. Самандаров Н.К., Кодиров А.А., Абдурахимова М.К., Султонмамадова М.П. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Таджикистан от 4.09.2011 г.
152. 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. –М., 2008. -Т.ХVIII. -№5. -С.117.
153. Кадыров, А.Х. Исследование содержания желчных кислот в сыворотке крови здоровых лиц и больных со стеатозом печени и стеатогепатитом: / А.Х. Кадыров, Г.О. Раджабов, А.А. Кодиров, М.Н.Худжамуродов, Г.Х. Давлатова // В кн.: Вопросы питания и регуляция гомеостаза. Выпуск 10. – Душанбе, 2010. –С.138-143.
154. Ивашкин, В.Т. Диагностика и лечение неалкогольной жировой болезни печени / В.Т. Ивашкин, О.М. Дропкина, Ю.О. Шульпекова, // Методические рекомендации. - М.: ООО «Издательский дом» М-Вести, 2009. -С.20.
155. Donnelly, K.L. Sources of fatty acids stored liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease / K.L. Donnelly, C.J. Smith at al. // J. Clin. Invest., 2005. –V.115. –P.1343-1351.
156. Подымова, С.Д. Жировой гепатоз. Неалкогольной стеатогепатит (эволюция представлений о клинико-морфологических особенностях, прогнозе, лечении) / С.Д. Подымова // Тер. архив, 2006. -№4. -С.32-38.
157. Пат. РТ № ТЈ 524. Способ диагностики жировой болезни печени /Кадыров А.Х, Мироджов Г.К, Худжамуродов М.Н., Самандаров

- Н.Ю., Кодиров А.А., Абдурахимова М.К., Султонмамадова М.П. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Таджикистан от 2011 г.
158. Вяхирев, Д.А. Руководство по газовой хроматографии / Д.А.Вяхирев, А.Ф. Шушунова. –М.: Высшая школа, 1987. -С.224-239.
159. Вайсбергер, А. Органические растворители / А. Вайсбергер, Э. Проскоуэр, Д.Риддук, Д Тунис. – М.: Наука, 1975. -С.518.
160. 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.
161. Караулова, К.Н. Синтез 2-метил-1-тиаиндана и перегруппировка аллиларилсульфидов / К.Н. Караулова, Д.Ш. Майпонова, Г.Д. Гальперн // ЖОХ, 1960. -Т.30. -С.3292-3297.
162. Климова, В.А. Основное микрометоды анализа органических соединений / В.А. Климова. -М.: Химия, 1967. -С.69-76.
163. 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.
164. Султонмамадова, М.П. Синтез сложных эфиров 3 α ,12 α -дигидроксихолановой кислоты / М.П. Султонмамадова, А.Х. Кадыров // Материалы Республиканской конференции «Комплексообразование в растворах». –Душанбе, 2012. -С.42-43
165. Султонмамадова, М.П. Синтез сложных эфиров 3 α ,7 α ,12 α -трикетохолановой кислоты / М.П. Султонмамадова, А.Х. Кадыров // Материалы Республиканской конференции «Перспективы синтеза в области химии и технологии гетеросоединений», посвящ. 20-летию

- кафедры высокомолекулярных соединений и химической технологии.
–Душанбе, 2013. –С.72-75
166. Султонмамадова, М.П. Синтез и свойства 3 α ,7 α -диацетохолановой кислоты / М.П. Султонмамадова, З.Д. Назарова, А.Х. Кадыров // Международная конференция «Химия производных глицерина; синтез свойства и аспекты их применения», посвящ. Международному году химии и памяти член-корр. АН РТ, докт.хим.наук., профессора Б.Х.Кимсанова. –Душанбе, 2011. -С.79-82
167. Султонмамадова, М.П. Изучение противомикробной активности некоторых гидразидпроизводных холановой кислоты / М.П. Султонмамадова, З.Д. Назарова, А.Х. Кадыров // Международная конференция «Химия производных глицерина; синтез свойства и аспекты их применения», посвящ. Международному году химии и памяти член-корр. АН РТ, докт.хим.наук., профессора Б.Х.Кимсанова. –Душанбе, 2011. -С.75-78.
168. Хайдаров, К.Х. Изучение противомикробной активности некоторых гидразидпроизводных холановых кислот / К.Х. Хайдаров, А.Х. Кадыров, З.Д. Назарова, М.П. Султонмамадова // Журнал научных публикаций аспирантов и докторантов, 2012. -№9. –С.70-72.
169. Пат. РТ № ТЈ 579. Пропан-1,2-диоловый эфир 3 α ,7 β -дигидроксихолановой кислоты в качестве холелитолитического и гипохолестеринемического средства / Кадыров А.Х., Мироджов Г.К., Назарова З.Дж., Султонмамадова М.П., Самандаров Н.Ю., Абдурахимова М.К., Кодиров Ш.А. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Таджикистан от 2013 г.
170. Пат. РТ № ТЈ 583. 3-хлорбензо[b]тиофен-2-карбоновой кислоты, обладающий антибактериальной активностью / Кадыров А.Х., Мироджов Г.К., Назарова З.Дж., Махкамова Б.Х., Султонмамадова

М.П., Самандаров Н.Ю., Абдурахимова М.К. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Таджикистан от 2013 г.

171. Пат. РТ № ТЈ 662. 12 α -тозилоксиэфир-3 α ,7 α -диацетокси-5 β -метилхолановой кислоты в качестве противомикробного средства / Кадыров А.Х., Назарова З.Дж., Самандаров Н.Ю., Султонмамадова М.П., Кодиров Ш.А. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Республики Таджикистан от 2014 г.