

И. В. Окуневич, Л. К. Хныченко, Н. С. Сапронов

## ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФОБИСАНИОНА НА МОДЕЛЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДИСЛИПОПРОТЕИНЕМИИ И АТЕРОСКЛЕРОЗА

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины" (НИИЭМ) Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: Ludmila. Konst83@mail.ru

В хронических опытах на крысах, морских свинках и кроликах установлено выраженное гипополидемическое и антиатеросклеротическое действие синтетического производного ароматического сульфокислот сульфобисаниона СБ-VII. Обнаруженные липидснижающие свойства СБ-VII сопоставимы с таковыми известного эталонного гипополидемического средства гемфиброзила.

**Ключевые слова:** сульфобисанион; гемфиброзил; сигетин; дислипопротеинемия; атеросклероз.

Одним из перспективных подходов к созданию новых лекарственных средств коррекции атерогенной дислипопротеинемии (ДЛП), ведущего фактора риска развития атеросклероза (АС), является подражание структуре естественных биологически активных веществ [1]. В НИИЭМ на основании этой концепции синтезированы производные ароматических сульфокислот, среди которых дикалиевая соль мезо-3,4-ди(*para*-сульфофенил)гексана (препарат сигетин) и ряд симметричных сульфобисанионов: СБ-I – СБ-VII. Сигетин нашел применение в акушерско-гинекологической практике для лечения плацентарной недостаточности и проявлений неврозов менопаузы у женщин [2]. При терапии климактерических расстройств, сопровождающихся нарушениями липидного обмена, некоторые исследователи отмечают, что пероральный прием сигетина улучшает состояние гормональной системы, приводит к снижению в крови уровня холестерина (ХС) и триглицеридов (ТГ) [3, 4]. Экспериментальными исследованиями в условиях холестеринowego АС (кролики) и атерогенной ДЛП (крысы) установлено гипополидемическое, антиатеросклеротическое действие и антиоксидантная активность сульфобисанионов СБ-IV и СБ-VI [5, 6].

Цель настоящей работы — исследование потенциальной гипополидемической активности и противоатеросклеротического действия сульфобисаниона СБ-VII.

### Экспериментальная химическая часть

Синтез и структурные формулы соединений — сульфобисанионов СБ-I – СБ-VII подробно представлены в наших работах [6, 7].

Динатриевую соль 4,4'-ди(сульфофенил)сульфона (СБ-VII) получали кипячением 0,1 г-моль соответствующего дисульфодихлорангидрида в водном растворе едкого натра (0,22 моль) до полного растворения ангидрида, добавляли уголь, фильтровали и к горячему фильтрату приливали равный объем этилового спирта. Из раствора по мере охлаждения выкристаллизовывался осадок динатриевой соли СБ-VII, кото-

рую очищали переосаждением спиртом из горячей воды. Растворимость в воде полученного соединения 20 % [7]. Молекулярная формула —  $C_{12}H_8O_8S_3Na_2 \cdot 2H_2O$ .

### Экспериментальная биологическая часть

Исследования выполнены в соответствии с Правилами проведения работ с экспериментальными животными, которых содержали в стандартных условиях вивария. Опыты проведены на нелинейных животных-самцах: 80 белых мышах (15 – 20 г), 132 крысах (230 – 250 г), 40 морских свинках (350 – 450 г) и 60 кроликах (3,0 – 3,5 кг). Использование нескольких видов животных обусловлено различной чувствительностью к моделированию ДЛП и специфичностью липидного спектра крови. У кроликов ХС распределен равномерно в антиатерогенных липопротеинах (ЛП) высокой плотности (ЛПВП) и атерогенных ЛП низкой плотности (ЛПНП). У морских свинок почти весь ХС находится в ЛПНП, а у крыс — в ЛПВП. Поскольку крысы более устойчивы к развитию ДЛП, то в гиперхолестеринемическую диету (ГХС диету) необходимо добавлять различные повреждающие агенты: холевую кислоту, метилтиоурацил, холекальциферол (витамин D<sub>3</sub>), пережаренные жиры [6, 8].

Экспериментальные ДЛП и АС создавали в соответствии с методическими указаниями однократным внутривентральным введением детергента тритона WR-1339 (225 мг/кг), либо содержанием крыс и морских свинок на специальной ГХС диете (21 день). Холестериновый АС у кроликов инициировали пероральным введением пищевого ХС в течение 10 недель [8].

Скармливание животным пищи с избыточным содержанием холестерина приводит к перекисной модификации ЛПНП, появлению у них более выраженных атерогенных свойств [9 – 11]. Такой процесс сопровождается образованием в крови специфических флуорофоров — продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), концентрацию которых оценивали по интенсивности флуоресценции [12].

**Влияние нового сульфобисаниона СБ-VII на изменение липидных показателей в крови и печени на модели алиментарной дислипидемии (ДЛП) у морских свинок**

Группа животных*	Липиды сыворотки крови, ммоль/л			Холестериновый коэффициент атерогенности (КА)	Липиды печени, мг/г сырой ткани	
	Общий ХС	ТГ	ХС ЛПВП		Общий ХС	ТГ
Интактные	1,10 ± 0,13	0,54 ± 0,07	0,30 ± 0,06	2,7	3,40 ± 0,30	4,20 ± 0,60
ГХС диета	4,46 ± 0,23 <sup>#</sup>	2,83 ± 0,13 <sup>#</sup>	0,07 ± 0,04 <sup>#</sup>	54,8	19,80 ± 0,92 <sup>#</sup>	21,50 ± 0,84 <sup>#</sup>
Гемфиброзил + ГХС диета	2,92 ± 0,26 <sup>#^</sup>	1,57 ± 0,14 <sup>#^</sup>	0,29 ± 0,05 <sup>^</sup>	11,4	10,62 ± 0,71 <sup>#^</sup>	12,54 ± 0,63 <sup>#^</sup>
СБ-VII+ ГХС диета	2,83 ± 0,51 <sup>#^</sup>	1,52 ± 0,16 <sup>#^</sup>	0,28 ± 0,03 <sup>^</sup>	9,1	11,7 ± 0,84 <sup>#^</sup>	14,23 ± 0,71 <sup>#^</sup>

<sup>#</sup> — различия достоверны по сравнению с группой 1 при  $p < 0,05$ ; <sup>^</sup> — различия достоверны по сравнению с группой 2 при  $p < 0,05$ .

\* В каждой группе по 8 животных.

В предварительных экспериментах определяли острую токсичность сульфобисаниона СБ-VII: при пероральном введении мышам ЛД<sub>50</sub> составляла 5000 мг/кг, что свидетельствует о низкой токсичности данного синтезированного соединения. В наших опытах применяли оптимально эффективную дозу СБ-VII — 100 мг/кг. Для сравнения использовали эталонные гиполипидемические средства согласно [8]: клофибрат, гемфиброзил, пробукол, имеющие различные механизмы липидснижающего действия. Так, клофибрат более эффективно уменьшает концентрацию триглицеридов в сыворотке крови, гемфиброзил снижает уровень атерогенных липопротеинов низкой плотности и увеличивает уровень антиатерогенных липопротеинов высокой плотности, а пробукол, помимо снижения синтеза холестерина, уменьшает всасывание холестерина, поступающего с пищей, и проявляет антиоксидантные свойства [2, 8]. Гемфиброзил (50 мг/кг, субстанция, США), клофибрат (250 мг/кг, субстанция, Венгрия), пробукол (100 мг/кг, субстанция, Россия) и структурный аналог сульфобисаниона СБ-4 — сигетин (100 мг/кг, субстанция, Россия) вводили экспериментальным животным перорально через зонд.

Биологический материал — кровь, печень и аорту — исследовали у предварительно голодавших (18 ч) экспериментальных животных после их декапитации. Концентрацию общего ХС, ТГ, ХС антиатерогенных ЛПВП в сыворотке крови крыс, морских свинок и кроликов измеряли на автоматизированной системе “Тех-

никон” АА-II (США). Для оценки степени тяжести ДЛП и риска развития АС рассчитывали холестеринный коэффициент атерогенности (КА) согласно формуле А. Н. Климова: общий ХС — ХС ЛПВП/ХС ЛПВП [9]. Содержание общего ХС и ТГ в печени и ХС в аорте животных определяли в экстрактах, полученных из соответствующих тканей, используя цветные реакции, как подробно описано в работах [5, 6]. Индекс атеросклеротического поражения аорт у кроликов оценивали планиметрически [13].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 6.0. Средние значения показателей сравнивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA test) при  $p < 0,05$ .

### Результаты и их обсуждение

Гиполипидемическую активность соединения СБ-VII первично оценивали на модели ДЛП, вызванной детергентом тритоном WR-1339 у крыс. Эта модель характеризуется значительным нарушением профиля крови и быстрым развитием стойкой гиперлипидемии. Через 10 ч после введения детергента уровень ХС и ТГ в крови увеличивался по сравнению с интактными животными в 4,5 и 12 раз соответственно. При терапии животных сульфобисанионом СБ-VII содержание общего ХС снижалось на 35 %, ТГ — на 40 %, а

**Влияние сульфобисаниона СБ-VII на изменение показателей липидного обмена крови и печени, интенсивность флуоресценции в сыворотке крови на модели алиментарной дислипидемии у крыс**

Группа животных*	Липиды сыворотки крови, ммоль/л			Интенсивность флуоресценции в крови, отн. ед.	Липиды печени, мг/г сырой ткани	
	Общий ХС	ТГ	ХС ЛПВП		Общий ХС	ТГ
Интактные	1,32 ± 0,10	0,58 ± 0,04	0,64 ± 0,12	2,7 ± 0,3	2,60 ± 0,10	4,20 ± 0,21
ГХС диета	4,91 ± 0,15 <sup>#</sup>	2,04 ± 0,10 <sup>#</sup>	0,12 ± 0,07 <sup>#</sup>	11,8 ± 0,9 <sup>#</sup>	17,51 ± 0,90 <sup>#</sup>	24,73 ± 1,20 <sup>#</sup>
Гемфиброзил + ГХС диета	3,02 ± 0,05 <sup>#^</sup>	1,23 ± 0,04 <sup>#^</sup>	0,56 ± 0,03 <sup>^+</sup>	8,2 ± 0,7 <sup>#^</sup>	6,42 ± 0,63 <sup>#^</sup>	8,94 ± 0,50 <sup>#^</sup>
Пробукол + ГХС диета	2,37 ± 0,17 <sup>#^</sup>	1,51 ± 0,06 <sup>#^</sup>	0,29 ± 0,07 <sup>#^</sup>	5,7 ± 0,4 <sup>#^</sup>	13,27 ± 0,74 <sup>#^</sup>	19,42 ± 0,74 <sup>#^</sup>
СБ-VII + ГХС диета	2,54 ± 0,08 <sup>#^</sup>	1,21 ± 0,04 <sup>#^</sup>	0,52 ± 0,04 <sup>^+</sup>	5,4 ± 0,7 <sup>#^</sup>	9,34 ± 0,60 <sup>#^+</sup>	14,25 ± 0,93 <sup>#^+</sup>

<sup>#</sup> — различия достоверны по сравнению с группой 1 при  $p < 0,05$ ; <sup>^</sup> — различия достоверны по сравнению с группой 2 при  $p < 0,05$ ; + — различия достоверны по сравнению с группой 4 при  $p < 0,05$ .

\* В каждой группе по 12 животных.

что указывает на липидснижающие свойства этого вещества.

Результаты, полученные на скрининговой модели ДЛП, явились основанием для более детального изучения активности соединения СБ-VII на специфических моделях ДЛП.

При моделировании алиментарной атерогенной ДЛП (табл. 1) установлено, что в сыворотке крови и печени морских свинок резко возрастал уровень общего ХС, ТГ и в 20 раз увеличивалась расчётная величина холестерина КА, отражающая степень развития ДЛП (группа 2). Содержание общего ХС и ТГ в сыворотке крови животных, которым через зонд вводили СБ-VII (группа 4), снижалось на 36 и 46 % соответственно. Холестериновый КА уменьшался в 6 раз. Кроме того, концентрация ХС антиатерогенных ЛПВП, сниженная в результате введения ГХС диеты, возрастала в 3,5 раза. Важно отметить, что у исследуемого сульфосоединения обнаружено выраженное гипополипидемическое действие на липиды печени, сопоставимое по степени эффективности с препаратом сравнения гемфибрилом (группа 3). Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что при введении СБ-VII снижается степень хронической алиментарной ДЛП и нормализуется липидный состав в крови гиперлипидемических морских свинок.

В табл. 2 представлены результаты влияния сульфобисаниона СБ-VII на развитие алиментарной атерогенной ДЛП у крыс. Из табл. видно, что ДЛП сопровождается значительным повышением содержания общего ХС и ТГ сыворотки крови и печени, снижением концентрации ХС антиатерогенных ЛПВП (в 5 раз), нарастанием интенсивности флуоресценции продуктов окисления ЛП (в 4 раза). Эти изменения отражают нарушение спектра липидов и позволяют судить об усилении процессов ПОЛ (группа 2).

В сыворотке крови животных, которым вводили соединение СБ-VII, на 40 и 40,7 % снижались уровни общего ХС и ТГ соответственно, на 54,5 % уменьшалась интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ. Концентрация ХС ЛПВП, проявляющих противоатероген-

ное действие, увеличивалась на 81,2 %. Одновременно в ткани печени уменьшалось содержание общего ХС на 46,7% и ТГ — на 32,4 %, по сравнению с нелечеными животными (группы 5 и 2). У крыс, которые получали эталонный препарат пробукол, уровень ХС антиатерогенных ЛПВП сыворотки крови оказался в 1,8 раза ниже, а содержание общего ХС и ТГ печени — в 1,4 – 1,3 раза выше, чем у животных, получавших сульфобисанион СБ-VII (группы 4 и 5, табл. 2).

Результаты, полученные на модели алиментарной атерогенной ДЛП у крыс, свидетельствуют о том, что гипополипидемическое действие соединения СБ-VII по силе эффекта превосходит таковое у пробукола и сопоставимо с липидснижающим свойством гемфибризола.

Известно, что экспериментальная ДЛП у кроликов характеризуется мощным подъемом липидов в крови и печени [8, 9]. В наших опытах (табл. 3) также показано, что при содержании кроликов на атерогенной диете в течение 10 недель в сыворотке крови увеличивался уровень общего ХС в 29 раз, ТГ — в 25 раз, и снижалась концентрация ХС антиатерогенных ЛПВП в 5 раз. В ткани печени повышалось содержание общего ХС и ТГ в 11 и 6 раз соответственно по сравнению с интактными животными, а в аорте образовывались атероматозные поражения в виде атеросклеротических бляшек (группа 2). Величина холестерина КА, отражающая прогрессирование ДЛП, увеличивалась более чем в 200 раз. Изменения показателей липидного состава крови, печени и специфических особенностей аорты полностью характеризовали значительную экспериментальную атерогенную ДЛП и холестерин АС.

При терапии кроликов с ДЛП и АС препаратом сравнения сигетином в сыворотке крови и печени снижалось содержание общего ХС, но уровень ТГ и концентрация ХС антиатерогенных ЛПВП не изменялись. Величина индекса поражения аорт оставалась такой же высокой, как и у животных, не получавших лечения (группы 4 и 2).

Таблица 3

**Влияние сульфобисаниона СБ-VII на изменение липидных показателей крови, печени и аорты на модели алиментарной дислипидемии в условиях экспериментального холестерина атеросклероза у кроликов**

Группа животных*	Липиды сыворотки крови, ммоль/л			Холестериновый коэффициент атерогенности (КА)	Печень		Аорта	
	Общий ХС	ТГ	ХС ЛПВП		Общий ХС, мг/г сырой ткани	ТГ, мг/г сырой ткани	Общий ХС, мг/г сырой ткани	Индекс атеросклеротического поражения аорт, %
Интактные	1,3 ± 0,4	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,03	2,3	3,70 ± 0,4	5,1 ± 1,2	2,6 ± 0,2	0
ГХС диета	38,1 ± 2,8 <sup>#</sup>	15,2 ± 1,6 <sup>#</sup>	0,08 ± 0,02 <sup>#</sup>	475,3	43,6 ± 4,5 <sup>#</sup>	30,2 ± 1,0 <sup>#</sup>	39,6 ± 6,0 <sup>#</sup>	40,0 ± 5,2 <sup>#</sup>
Гемфибризол + ГХС диета	19,1 ± 2,5 <sup>#^</sup>	4,8 ± 0,6 <sup>#^*</sup>	0,30 ± 0,05 <sup>^</sup>	62,7	28,1 ± 7,6 <sup>#^</sup>	23,7 ± 1,4 <sup>#^</sup>	19,6 ± 5,3 <sup>#^*</sup>	24,7 ± 3,2 <sup>#^</sup>
Сигетин + ГХС диета	20,6 ± 3,7 <sup>#^</sup>	13,9 ± 0,8 <sup>#</sup>	0,10 ± 0,04 <sup>#</sup>	205,0	26,8 ± 5,4 <sup>#^</sup>	29,3 ± 2,4 <sup>#</sup>	30,8 ± 2,9 <sup>#</sup>	36,3 ± 7,7 <sup>#</sup>
СБ-VII + ГХС диета	16,2 ± 3,2 <sup>#^</sup>	4,3 ± 0,5 <sup>#^*</sup>	0,22 ± 0,02 <sup>#^</sup>	80,0	20,1 ± 2,8 <sup>#^</sup>	16,7 ± 2,1 <sup>#^*</sup>	15,0 ± 0,2 <sup>#^*</sup>	7,7 ± 2,1 <sup>#^*</sup>

<sup>#</sup> — различия достоверны по сравнению с группой 1 при  $p < 0,05$ ; <sup>^</sup> — различия достоверны по сравнению с группой 2 при  $p < 0,05$ ; \* — различия достоверны по сравнению с группой 4 при  $p < 0,05$ .

\* В каждой группе по 12 животных.

Иная картина наблюдалась в группе кроликов, которым на фоне длительного кормления высокожировым рационом с избыточным содержанием пищевого ХС вводили сульфобисанион СБ-VII (группа 5, табл. 3). В сыворотке крови этих животных снижался уровень общего ХС в 2,4 раза, ТГ — в 3,5 раза. Отмечено увеличение более чем в 2 раза концентрации ХС антиатерогенных ЛПВП и уменьшение в 6 раз величины холестерина КА по сравнению с группой животных, не получавших лечения (группа 2). Помимо улучшения липидного профиля крови при введении СБ-VII в ткани печени снижалось содержание общего ХС и ТГ на 52 и 45 % соответственно. Индекс атеросклеротического поражения аорты уменьшался в 5 раз. Следует отметить, что у 9 животных (75 %) в аорте отсутствовали не только атероматозные поражения, но и в 2,6 раза снижалась инфильтрация аорты ХС (группа 5). Выявленные нами липидснижающие и противоатеросклеротические свойства соединения СБ-VII сопоставимы с таковыми у гиполипидемического препарата сравнения гемфиброзила (группа 3, табл. 3).

Таким образом, в условиях дислипидотеинемии на различных видах животных (крысы, морские свинки, кролики) установлено, что пероральное введение оригинального производного ароматических сульфокислот — сульфобисаниона СБ-VII — оказывает гиполипидемическое действие, проявляющееся в угнетении степени развития ДЛП, снижении инфильтрации печени липидами, уменьшении риска развития атеросклеротических повреждений в аорте.

Представленные результаты исследования явились основанием для получения патента РФ на соединение

СБ-VII (динатриевая соль 4,4'-ди(сульфофенил)сульфона) “Средство, обладающее гиполипидемической и антиатеросклеротической активностью” [14].

## ЛИТЕРАТУРА

1. С. В. Аничков, *Вестн. АМН СССР*, № 9, 3 – 7 (1976).
2. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Т. 2, Торсинг, Харьков (1998).
3. В. Д. Забелина, *Consilium Provisorum*, № 7, 29 – 31 (2003).
4. Т. П. Цветкова, Л. В. Смирнова, *Акушерство и гинекол.*, № 5, 98 – 101 (2010).
5. В. Е. Рыженков, Н. В. Хромов-Борисов, И. В. Мосина, М. Л. Инденбом, *Фармакол. токсикол.*, № 6, 632 – 635 (1979).
6. И. В. Окуневич, Н. С. Сапронов, В. Е. Рыженков и др., *Хим.-фарм. журн.*, **33**(11), 14 – 16 (1999).
7. Н. С. Сапронов, М. Л. Инденбом, Н. В. Хромов-Борисов, *Хим.-фарм. журн.*, **18**(9), 1064 – 1068 (1984).
8. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред.), Медицина, Москва (2005), сс. 452 – 461.
9. А. Н. Климов, Н. Г. Никульчева, *Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения*, Питер, Санкт-Петербург (1999).
10. Л. В. Кравченко, И. В. Аксенов, Н. В. Трусов и др., *Вопр. питания*, **81**(1), 24 – 29 (2012).
11. M. A. Cole, A. J. Murray, L. E. Cochlin, et al., *Basic Res. Cardiol.*, **106**, 447 – 457 (2011).
12. В. Л. Богданов, Е. Н. Викторова, Т. З. Веселова и др., *Он-тич. ж.*, № 11, 89 – 90 (1995).
13. И. В. Окуневич, В. Е. Рыженков, *Пат. физиол. экспер. терапия*, № 2, 24 – 27 (2002).
14. Патент РФ 2372897 (2009); *Бюл. изобрет.*, № 32 (2009).

Поступила 15.06.12

## PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF SULFUR BISANION ON THE MODELS OF EXPERIMENTAL DISLIPIDOPROTEINEMIA AND ATHEROSCLEROSIS

I. V. Okunevich, L. K. Khnychenko\*, and N. S. Sapronov

Institute for Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, 197376 Russia;

\* e-mail: Ludmila.Konst83@mail.ru

High degree of dislipoproteinemia is associated with increased risk of atherosclerotic complications. Chronic experiments on rats, guinea pigs, and rabbits showed a pronounced hypolipidemic and antiatherosclerotic activity of sulfur bisanion SB-VII, the synthetic derivative of aromatic sulfonic acids. The lipid lowering properties of SB-VII are comparable with those of the well-known standard hypolipidemic drug gemfibrozil.

**Keywords:** sulfur bisanion, gemfibrozil; sigethin; dislipoproteinemia; atherosclerosis