

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-414>

УДК 615.2



## ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ БИОТРАНСФОРМАЦИИ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВИОЛУРОВЫХ КИСЛОТ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO*

К.А. Краснов<sup>✉</sup>, К.А. Феклистова, А.А. Краснова, С.С. Гафт, В.Т. Папп, М.В. Мелихова, Н.А. Белякова

Научно-клинический центр токсикологии им. С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

**Введение.** 5-Оксиминобарбитуровая (виолуровая) кислота и ее производные проявляют выраженные антигипоксические, гепатопротекторные, цитопротекторные, актопротекторные и другие свойства, что делает эту группу веществ перспективным полем для фармацевтических изысканий. Данные о метаболизме виолуровых кислот (ВК) представляют большую практическую и теоретическую значимость, позволяя отслеживать фармакокинетику и распределение вещества в организме, причем метаболиты служат маркерами биохимических процессов, протекающих при участии эндогенных субстратов.

**Цель.** Установление структуры продуктов метаболизма виолуровых кислот и их количественная оценка в эксперименте *in vivo*.

**Материалы и методы.** Исследуемые вещества (ВК) и продукты их метаболизма (пурпуровые кислоты) были синтезированы на базе Научно-клинического центра токсикологии им. С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства, их структура и чистота подтверждены методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и спектрофотометрии (СФ). Метаболизм и антигипоксическую активность изучали на модели гемической гипоксии, вызванной смертельной дозой нитрита натрия, на беспородных белых крысах-самцах. Растворы виолуровых кислот для исследований *in vitro* и введения животным готовили в дистиллированной воде с добавкой трис(оксиметил)аминометана (ТРИС), а пурпураты, используемые в форме солей, растворяли в дистиллированной воде. Дозировки исследуемых веществ для крыс составляли 50–75 мг/кг при внутрибрюшинном и 50–100 мг/кг при внутривенном введении. Эталонное вещество (амтизол сукцинат) вводили животным в дозе 100 мг/кг. В качестве контроля использовали раствор хлорида натрия 0,9%, который вводили в объеме 1 мл на животное. Количественный анализ веществ и их метаболитов в биосредах осуществлен методом ВЭЖХ с СФ-детектированием.

**Результаты.** Установлено, что исследуемые вещества (виолуровая, 2-тиовиолуровая, 1-бутилвиолуровая и 1-(4-бромфенил)виолуровая кислоты) в организме животных метаболизируются с образованием соответствующих производных пурпуровой кислоты (пурпуратов), структура которых была доказана встречным синтезом. ВК и продукты их метаболизма выводятся преимущественно с мочой. Показано, что 1-бутилвиолуровая кислота и ее метаболит *N,N'*-дибутилпурпуровая кислота на модели острого отравления  $\text{NaNO}_2$  обладают выраженной антигипоксической активностью, предотвращая гибель 100% животных, тогда как эталонный антигипоксикант Амтизол лишь продлевает время жизни (на 23%).

**Выводы.** Образование пурпуратов является характерным направлением метаболической трансформации скаффолда виолуровых кислот. Данные метаболиты обладают выраженной активностью и, по всей видимости, могут участвовать в формировании общего биологического эффекта виолуровых кислот.

**Ключевые слова:** виолуровая кислота; производные; метаболизм; пурпуровые кислоты; крысы; антигипоксиканты; ВЭЖХ; амтизол

**Для цитирования:** Краснов К.А., Феклистова К.А., Краснова А.А., Гафт С.С., Папп В.Т., Мелихова М.В., Белякова Н.А. Изучение процессов биотрансформации и фармакологической активности виолуровых кислот и их метаболитов в экспериментах *in vivo*. *Экстремальная биомедицина*. 2026;28(2):277–286. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-414>

**Финансирование:** исследование выполнено в рамках государственного задания ФМБА России № 388-00070-25-01 на проведение прикладных научных исследований.

**Соответствие принципам этики:** исследование выполнено с соблюдением правил биоэтики, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Проведение исследований одобрено на заседании биоэтического комитета ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» Федерального медико-биологического агентства (№ 1/08-25 от 13.08.2025).

**Потенциальный конфликт интересов:** авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Краснов Константин Андреевич [krasnov\\_tox@mail.ru](mailto:krasnov_tox@mail.ru)

**Статья поступила:** 13.10.2025 **После доработки:** 18.11.2025 **Принята к публикации:** 24.11.2025 **Online first:** 30.12.2025

## INVESTIGATION OF BIOTRANSFORMATION PROCESSES AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF VIOLURIC ACIDS AND THEIR METABOLITES IN *IN VIVO* EXPERIMENTS

Konstantin A. Krasnov<sup>✉</sup>, Kristina A. Feklistova, Alexandra A. Krasnova, Semen S. Gaft, Vladimir T. Papp, Marina V. Melikhova, Natalia A. Belyakova

Golikov Research Center of Toxicology, St. Petersburg, Russia

**Introduction.** 5-Hydroxyiminobarbituric (violuric) acid and its derivatives exhibit pronounced anti-hypoxic, hepatoprotective, cytoprotective, actoprotective, and other properties, making this group of compounds a promising field for pharmaceutical research. Data on the metabolism of violuric acids (VAs) are of significant practical and theoretical importance for the tracking of pharmacokinetics and substance distribution within the organism, in which process metabolites serve as markers of biochemical processes involving endogenous substrates.

**Objective.** To determine the structure of violuric acid metabolites and perform their quantitative assessment in an *in vivo* experiment.

© К.А. Краснов, К.А. Феклистова, А.А. Краснова, С.С. Гафт, В.Т. Папп, М.В. Мелихова, Н.А. Белякова, 2025

**Materials and methods.** The studied substances (VAs) and their metabolites (purpuric acids) were synthesized at the Golikov Research Center of Toxicology. Their structure and purity were confirmed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, high-performance liquid chromatography (HPLC), and spectrophotometry (SP). Metabolism and anti-hypoxic activity were studied using a model of hemic hypoxia induced by a lethal dose of sodium nitrite in outbred male white rats. Solutions of violuric acids for *in vitro* studies and administration to animals were prepared in distilled water with the addition of tris(oxyethyl)aminomethane (TRIS), while purpurates in the form of salts were dissolved in distilled water. The dosages of the test substances for rats ranged from 50–75 mg/kg for intraperitoneal administration and 50–100 mg/kg for intragastric administration. The reference substance (amtizole succinate) was administered to animals at a dose of 100 mg/kg. A 0.9% sodium chloride solution, administered at a volume of 1 mL per animal, was used as a control. Quantitative analysis of the substances and their metabolites in biological media was performed by HPLC with SP detection.

**Results.** It was established that the studied substances (violuric acid, 2-thiovioluric acid, 1-butylvioluric acid, and 1-(4-bromophenyl)violuric acid) are metabolized in the animal organism to form the corresponding derivatives of purpuric acid (purpurates), whose structure was confirmed by counter synthesis. Violuric acids and their metabolites are primarily excreted in the urine. It was demonstrated that 1-butylvioluric acid and its metabolite *N,N'*-dibutylpurpuric acid exhibit pronounced anti-hypoxic activity in the model of acute sodium nitrite poisoning, preventing mortality in 100% of animals, whereas the reference antihypoxant amtizole only prolongs survival time (by 23%).

**Conclusions.** The formation of purpurates is a characteristic pathway of metabolic transformation for the violuric acid scaffold. These metabolites exhibit pronounced activity and, in all likelihood, can contribute to the overall biological effect of violuric acids.

**Keywords:** violuric acid; derivatives; metabolism; purpuric acids; rats; antihypoxants; HPLC; amtizole

**For citation:** Krasnov K.A., Feklistova K.A., Krasnova A.A., Gaft S.S., Papp V.T., Melikhova M.V., Belyakova N.A. Investigation of biotransformation processes and pharmacological activity of violuric acids and their metabolites in *in vivo* experiments. *Extreme Medicine*. 2026;28(2):277–286. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-414>

**Funding:** the study was performed within the framework of the state assignment (FMBA of Russia) No. 388-00070-25-01 for applied scientific research.

**Compliance with the ethical principles:** the study was conducted in compliance with the bioethical principles approved by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. The research protocol was approved by the Bioethics Committee of the Golikov Research Center of Toxicology (Minutes No. 1/08-25 dated 13.08.2025).

**Potential conflict of interest:** the authors declare no conflict of interest.

✉ Konstantin A. Krasnov [krasnov\\_tox@mail.ru](mailto:krasnov_tox@mail.ru)

**Received:** 13 Oct. 2025 **Revised:** 18 Nov. 2025 **Accepted:** 24 Nov. 2025 **Online first:** 30 Dec. 2025

## ВВЕДЕНИЕ

Антигипоксантами, антиоксидантами, адаптогенами, актопротекторами и другими лекарственными препаратами, повышающими адаптивные возможности организма, играют заметную роль в современной фармакологии. Препараты этих фармацевтических групп, прежде всего антигипоксантами, широко востребованы в медицине: они используются в хирургической практике [1], кардиологии [2], неврологии [3, 4], спортивной и экстремальной медицине [5], психиатрии [6], при травмах головного мозга и нарушениях мозгового кровообращения [7, 8], лечении интоксикаций печени [9] и во многих других областях [10]. При этом разработка новых антигипоксических препаратов и поиск новых подходов в терапии гипоксических состояний продолжают оставаться актуальными [11].

Приоритетными направлениями поиска антигипоксикантов являются оригинальные группы синтетических гетероциклических веществ, среди которых могут быть обнаружены препараты, позволяющие задействовать дополнительные механизмы повышения адаптационного резерва организма. В этом плане значительный интерес вызывают 5-оксиминобарбитуровые кислоты, известные как виолуровые кислоты (ВК), которые представляют собой группу гетероциклических оксимов с перспективными фармакологическими свойствами [12]. Простейшее производное данного ряда — незамещенная виолуровая кислота (ВК1),

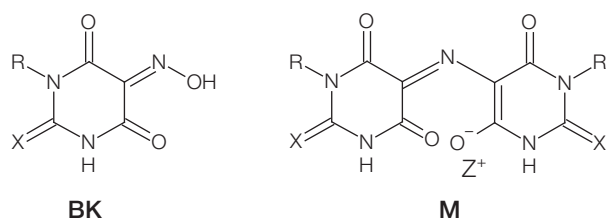
структура которой приведена на рисунке 1. Данное вещество было исследовано в работе<sup>1</sup>, где установлено, что оно обладает высокой антидотной активностью на моделях гемической гипоксии, вызванной угарным газом и метгемоглобинообразующими ядами (нитритом натрия, анилином и др.), превосходя такие стандарты, как унитиол, амтизол, гутимин и метиленовый синий. Также ВК1 демонстрировала хорошие результаты на моделях гипобарической и гиперкапнической гипоксии. Другое производное этого ряда (2-тиовиолуровая кислота (ВК2)) аналогично обладало антидотной активностью при нитрит-индуцированной гемической гипоксии, но помимо этого ВК2 проявляла выраженное защитное действие на модели отека легкого, вызванного оксидом азота<sup>2</sup>. 1-бутилвиолуровая кислота (ВК3), использованная в виде цинкового комплекса, проявила защитное действие при отравлении угарным газом, превосходя известный препарат ацизол, а также показала лечебный эффект у животных при отравлениях нейротоксикантами [12].

Для ВК1 и ее аналогов на биохимическом уровне отмечали антиоксидантные, мембраностабилизирующие свойства и способность повышать устойчивость гемоглобина *in vitro*<sup>3</sup>. [12, 13]. Помимо перечисленных видов активности, в ряду ВК у различных производных были выявлены гепатопротекторные, антимикробные, противовирусные, анальгетические, транквилизирующие и другие свойства [14]. Отдельно следует отметить 1-(4-бромфенил)виолуровую кислоту (ВК4), которая

<sup>1</sup> Бурбелло АТ. Производные барбитуровой кислоты — новый класс соединений для профилактики и лечения отравлений нитросоединениями: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. СПб., 1991.

<sup>2</sup> Там же.

<sup>3</sup> Там же.



X = O, R = H	(BK1)	X = O, R = H, Z = NH <sub>4</sub>	(M1)
X = S, R = H	(BK2)	X = S, R = H, Z = NH <sub>4</sub>	(M2)
X = O, R = <i>n</i> -Bu	(BK3)	X = O, R = <i>n</i> -Bu, Z = K	(M3)
X = O, R = 4-BrC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	(BK4)	X = O, R = 4-BrPh, Z = Na	(M4)

Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

**Рис. 1.** Структурные формулы виолуровых кислот и солевых производных пурпуровой кислоты

была официально зарегистрирована в качестве гепатопротекторного лекарственного средства<sup>4</sup>.

Все это свидетельствует о виолуровых кислотах как о фармакологически перспективной группе, на основе которой возможна разработка новых лекарственных препаратов, в частности антигипоксантов, актопротекторов и антидотных средств, актуальных для современной медицины. Однако до настоящего времени биологические мишени и механизмы действия виолуровых кислот неизвестны. В связи с этим, учитывая ключевую роль данных о метаболизме препаратов для скрининга и фармацевтической разработки [15], изучение закономерностей распределения и биотрансформации виолуровых кислот *in vivo* имеет большое практическое значение.

Цель исследования — установление структуры продуктов метаболизма виолуровых кислот и их количественная оценка в эксперименте *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Методы физико-химического анализа

Для подтверждения молекулярной структуры синтезированных веществ использовали спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Спектры <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР зарегистрированы в ДМСО-*d*<sub>6</sub> на приборе Bruker Avance 400WB при рабочей частоте 400 и 100 МГц соответственно. Электронные спектры синтезированных веществ в УФ- и видимой области записаны на сканирующем спектрофотометре Shimadzu UV-1800 с использованием стандартных кварцевых кювет. Анализ чистоты синтезированных веществ, идентификацию и оценку их количественного содержания в биосредах экспериментальных животных осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence, снабженном автосемплером и спектрофотометрическим детектором диодно-матричного типа. Разделение проводили на обращенно-фазной колонке монолитного типа Chromolit Performance-RP длиной 10 см при температуре колонки 40 °С. Скорость потока элюента составляла 5 мл/мин, в качестве подвижной фазы

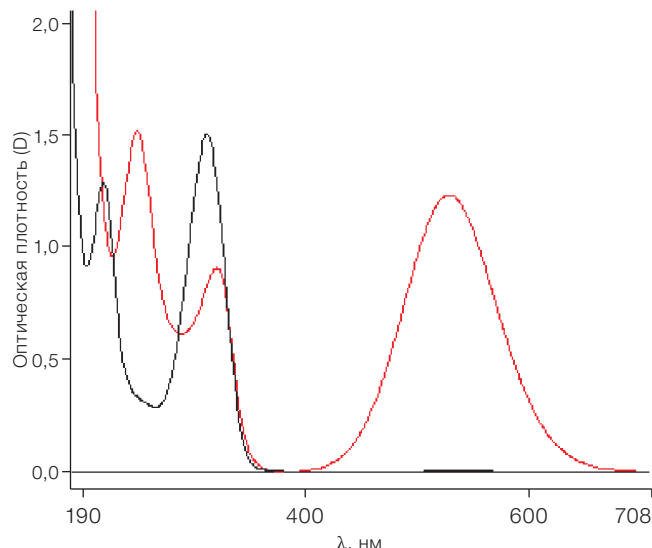


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

**Рис. 2.** Спектры поглощения 1-бутилвиолуровой кислоты (черный) и ее метаболита (красный) при концентрации каждого из веществ  $9 \times 10^{-5}$  моль/л (вода, pH 7,0)

использовали ацетонитрил (фаза А) и водный раствор ацетата аммония 0,1% (фаза Б) в режиме градиентного элюирования. Условия градиента: А 1–30% (0–3 мин), А 30% (3–5 мин).

Аналитические характеристики исследуемых веществ и их метаболитов, использованные для их идентификации и количественного анализа в биосредах, представлены в таблице 1.

В качестве иллюстрации на рисунке 2 представлены электронные спектры 1-бутилвиолуровой кислоты (BK3) и ее метаболита — *N,N'*-дибутилпурпурата (M3).

### Синтез исследуемых и стандартных веществ

Синтез всех исследуемых веществ был выполнен на базе ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России.

Виолуровые кислоты (VK) синтезировали по общей методике патента [14]. Схема синтеза VK включала два этапа. На первом этапе из замещенных мочевины и малонового эфира получали соответствующие производные барбитуровой кислоты, из которых путем нитрозирования на втором этапе получали целевые VK. Чистота синтезированных веществ составляла не менее 98%.

Пурпуровая кислота в форме аммониевой соли (M1, мурексид) — коммерческий продукт (ч.д.а., «Ленреактив» (Россия)). Все прочие использованные в работе вещества — коммерчески доступные продукты.

Метаболиты производных виолуровых кислот — 2,2'-дитиопурпуровая кислота (M2) и *N,N'*-дибутилпурпуровая кислота (M3) были получены в форме аммониевой и калиевой солей соответственно по методике, описанной в работе [16], с чистотой не менее 95%.

<sup>4</sup> Государственный реестр лекарственных средств. Регистрационное удостоверение ЛП-00444 от 01.09.2017. [https://grls.rosminzdrav.ru/GrIs\\_View\\_v2.aspx?routingGuid=89b99d38-99b5-45b1-a65d-5659336e3ded0](https://grls.rosminzdrav.ru/GrIs_View_v2.aspx?routingGuid=89b99d38-99b5-45b1-a65d-5659336e3ded0)

Таблица 1. Спектральные и хроматографические характеристики виолуровых и пурпуровых кислот

Вещество	$\lambda_{\max}$ , нм	$E_{\max}$ , $M^{-1} \times cm^{-1}$	$T_{уд}$ , мин
ВК1	311,0	24 800	0,289
ВК2	349,0	22 300	0,300
ВК3	312,0	18 700	0,617
ВК4	314,0	14 900	0,910
М1	521,0	10 400	0,300
М2	568,5	19 500	0,340
М3	528,5	12 900	1,832
М4	526,5	10 000	1,920

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

**Примечание:**  $\lambda_{\max}$  — длина волны максимума характеристичной полосы поглощения;  $E_{\max}$  — мольный коэффициент экстинкции в точке максимума поглощения;  $T_{уд}$  — время удерживания вещества на хроматограмме ВЭЖХ.

Методика синтеза натриевой соли *N,N'*-ди-(4-бромфенил)пурпуровой кислоты (М4). 0,005 моль (1,56 г), 1-(4-бромфенил)виолуровой кислоты (ВК4) и 0,005 моль (1,41 г) 1-(4-бромфенил)барбитуровой кислоты [14] растворяли в 10 мл диметилсульфоксида (ДМСО) при 50 °С. К этому раствору при перемешивании добавляли 0,01 моль ацетата аммония, растворенного в 3 мл метанола. Полученную смесь перемешивали в течение 1 ч при 50 °С, затем разбавляли 25 мл 3% водного раствора гидрокарбоната натрия и выдерживали 1 ч при комнатной температуре для формирования осадка. Полученный осадок отделяли на фильтре Шотта, промывали 10 мл 1% водного раствора гидрокарбоната натрия, затем 5 мл дистиллированной воды и сушили на воздухе до постоянного веса. Получали 1,35 г темно-красного порошка М4 с температурой разложения свыше 250 °С. Выход пурпурата М4 составил 78% от теоретического, чистота — не менее 95%.

Спектр ЯМР  $^1H$  (ДМСО- $d_6$ ), химический сдвиг мультиплета ( $\delta$ ), миллионных долей (м.д.): 7,23 (4H, Ar), 7,66 (4H, Ar), 10,5–11,5 уш. с или уширенный синглет (2H, 2NH). Спектр ЯМР  $^{13}C$  (ДМСО- $d_6$ ),  $\delta_C$ , м.д.: 121,1 ( $C^5 + C^{5a}$ ), 131,5 ( $4C_{Ar}$ ), 131,6 ( $4C_{Ar}$ ), 135,2 ( $4C_{Ar}$ ), 149,9 ( $2C^{2O}$ ), 155–165 уш. с. ( $4CO$ ).

Препарат амтизол, использованный в качестве референсного антигипоксанта, был синтезирован в форме сукцината по методике, описанной в патенте [17], чистота препарата составила не менее 98%.

Структура и чистота всех синтезированных веществ были подтверждены методами ЯМР и ВЭЖХ.

### Животные и их содержание

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах возрастом 3 мес. массой 200–240 г, приобретенных в Филиале НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ — ПЛЖ «Рапполово». Животные содержались в стандартных условиях при 12-часовом световом режиме, получали стандартный корм для крыс

и питьевую воду *ad libitum* в условиях свободного доступа. Животные при составлении экспериментальных групп рандомизировались по весу.

### Определение виолуровых кислот и их метаболитов в моче крыс

Работа проведена на 16 животных, из которых было сформировано 4 группы по 4 особи на каждое исследуемое вещество. Введение осуществляли с помощью атравматического желудочного зонда. Производные ВК1 и ВК2 вводили животным в дозе 80 мг/кг м.т. в виде 5% водных суспензий с добавкой 2% Твин-80, а производные ВК3 и ВК4 вводили в дозе 100 мг/кг м.т. в виде 1% водных растворов с добавкой трис(оксиметил)аминометана (ТРИС). После введения веществ животных помещали в метаболические клетки для сбора мочи, где их содержали в течение 24 ч без доступа к пище, при этом доступ к воде не ограничивался. Сбор мочи осуществляли через заданные промежутки времени (4, 8 и 24 ч) с регистрацией объема. Полученные образцы мочи хранили в морозильной камере при -10 °С для последующего ВЭЖХ-анализа. Методики количественного анализа ВК и их метаболитов в моче были разработаны и валидированы в соответствии с отечественными и международными рекомендациями<sup>5</sup>.

Для количественного анализа веществ мочу разбавляли в 2 раза дистиллированной водой и исследовали методом ВЭЖХ. Объем вводимых проб составлял 10 мкл. Параллельно хроматографировали градуировочные растворы соответствующих стандартов. Линейная зависимость между площадью хроматографического пика и содержанием исследуемого вещества в пробе была установлена в диапазоне концентраций 0,1–50 мкг/мл. Количественное содержание соединения в образцах мочи рассчитывали на основе площади хроматографического пика и соответствующих аналитических характеристик, приведенных в таблице 1.

<sup>5</sup> Береговых ВВ. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств. М.: 2008.

### Изучение метаболизма 1-бутилвиолуровой кислоты (ВКЗ) по результатам анализа плазмы крови и органов крыс

Исследование проведено на 20 животных по 2 особи на каждую временную точку (15, 30, 60, 120, 180 мин). Для изучения биотрансформации и распределения ВКЗ *in vivo* животные были распределены на 2 группы по 10 особей в зависимости от способа введения исследуемых соединений: внутрибрюшинного (1-я группа) и внутрижелудочного (2-я группа) пути введения вещества. Дозировка ВКЗ в обоих случаях составляла 50 мг/кг м.т., исследуемое вещество вводили животным в виде 1% водного раствора с добавкой 0,7% ТРИС. По истечении указанных промежутков времени животных выводили из эксперимента декапитацией. У крыс забирали цельную кровь (4–6 мл) и отделяли плазму от эритроцитов путем центрифугирования крови при 6000 об/мин, а также отбирали внутренние органы (печень и почки). Пробы плазмы крови и органы замораживали сразу после отбора и хранили при -10 °С для последующего ВЭЖХ-анализа.

*Подготовка образцов плазмы крови к ВЭЖХ-анализу.* В центрифужную пробирку помещали 0,5 мл плазмы крови крысы, приливали 1,0 мл метанола, перемешивали и отделяли осадок белка центрифугированием 5 мин при 16 000 об/мин. Надосадочный раствор отделяли и анализировали методом ВЭЖХ, объем инъекции составлял 30 мкл. Содержание веществ ВКЗ и МЗ в образцах плазмы крови определяли из площади хроматографического пика при соответствующих аналитических характеристиках, приведенных в таблице 1. Методика расчета концентрации веществ ВКЗ и его метаболита МЗ в плазме крови была валидирована в соответствии с отечественными и международными рекомендациями<sup>6</sup>.

*Подготовка образцов ткани печени к ВЭЖХ-анализу.* 0,5 г образца печени крысы растирали в агатовой ступке до получения однородной кашицы. Растертый материал смешивали с 1 мл метанола, переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали 5 мин при 16 000 об/мин. Надосадочный раствор отделяли и анализировали методом ВЭЖХ, объем инъекции составлял 30 мкл. Подготовка образцов ткани почек к ВЭЖХ-анализу проводили так же, как и для печени.

Содержание веществ ВКЗ и его метаболита МЗ в образцах печени и почек определяли из площади хроматографического пика при соответствующих аналитических характеристиках, приведенных в таблице 1.

Для изучения антигипоксической активности 1-бутилвиолуровой кислоты (ВКЗ) и ее метаболита — *N,N'*-дибутилпурпурата калия (МЗ) формировали 4 экспериментальные группы ( $n = 6$ ): № 1 — контроль, № 2 — эталон, № 3 и 4 — опытные группы. Исследование проводили на модели гемической гипоксии, вызванной смертельной дозой нитрита натрия, в соответствии с методическими рекомендациями по изучению антигипоксических средств<sup>7</sup>. Защитную активность оценивали в условиях профилактического

внутрибрюшинного введения веществ. В качестве эталонного вещества был использован препарат Амтизол, который считается одним из наиболее универсальных антигипоксикантов [18].

Контрольным животным группы № 1 вводили 0,9% раствора хлорида натрия в объеме 1 мл. Животным группы № 2 вводили амтизол сукцинат в дозе 100 мг/кг в виде водного раствора 10%. Животным групп № 3 и 4 вводили исследуемые вещества ВКЗ и МЗ соответственно в виде водных 7,5% растворов, дозировки веществ составляли 75 мг/кг.

Нитрит натрия (х.ч., «ЛенРеактив», Россия) вводили крысам подкожно в виде водного 2% раствора через 30 мин после введения исследуемых веществ. Доза нитрита натрия составляла 100 мг/кг, что на 25% превышало смертельную для крыс ( $LD_{100} = 80$  мг/кг). Животных на время эксперимента помещали в вольеры по 6 особей для свободного наблюдения за клинической картиной.

В ходе эксперимента регистрировали клинические проявления действия нитрита натрия и исследуемых веществ. Гибель животных фиксировали на момент остановки сердца. Наблюдения за выжившими животными проводили в течение 3 сут. Критериями эффективности исследуемых веществ служили увеличение продолжительности жизни животных и процент выживания по сравнению с контролем.

Статистическая обработка (расчет среднего значения и абсолютной погрешности) данных проведена с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн исследования *in vivo* в первую очередь был нацелен на идентификацию качественного состава метаболитов виолуровых кислот, что позволяло минимизировать число использованных в экспериментах животных.

Определение метаболитов в моче животных проводили после внутрижелудочного введения соответствующих веществ ВК1–ВК4. Сроки сбора мочи были выбраны так, чтобы оценить начальную, промежуточную и финальную стадии экскреции. При исследовании состава мочи экспериментальных животных методом ВЭЖХ во всех случаях, помимо неизмененных соединений ВК1–ВК4, были обнаружены соответствующие производные пурпуровой кислоты М1–М4, структуры которых приведены на рисунке 1.

Идентификация пурпуратов в моче была выполнена в каждом случае на основе сравнения времени удерживания на хроматограмме и диодно-матричном спектре с синтезированным стандартным веществом М1–М4. Как уже отмечалось выше, пурпулаты обладают характерными спектрами поглощения в УФ- и видимой области (табл. 1 и рис. 2), что позволило, используя синтезированные стандарты М1–М4, однозначно идентифицировать их в составе биосред.

Количественные показатели выведения виолуровых кислот и их метаболитов с мочой у крыс

<sup>6</sup> Там же.

<sup>7</sup> Лукьянова ЛД, ред. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств. М.: МЗ СССР, 1990.

за соответствующие промежутки времени представлены в таблице 2 и на рисунке 3.

Полученные результаты свидетельствуют, что образование пурпуратов является общей закономерностью биотрансформации виолуровых кислот в организме крыс. Из рассмотренных веществ в наибольшей степени метаболизируется 1-бутилвиолуровая кислота ВК3, около половины (47%) которой выводится с мочой в виде *N,N'*-дибутилпурпурата М3, а 53% — в неизменном виде. Наименее склонным к метаболизму субстратом является 1-(4-бромфенил)виолуровая кислота ВК4, у которой степень конверсии в метаболит составляет лишь 15%.

Нельзя не отметить, что наблюдаемая метаболическая трансформация виолуровых кислот весьма необычна, и можно даже говорить о ее уникальности. Судя по структуре образующихся пурпуратов, в ходе биотрансформации виолуровых кислот протекает конденсация и сшивка двух фрагментов исходной молекулы, что нельзя отнести к общеизвестным путям метаболизма ксенобиотиков, таким как окисление, гидролиз, конъюгация и другие превращения [19]. Данная трансформация, по всей видимости, требует участия специфического биохимического механизма, так как случайная сшивка двух молекул ВК3 друг с другом представляется маловероятной ввиду низкой концентрации субстрата в организме, тем более что в растворах *in vitro* такая реакция для виолуровых кислот не характерна даже при значительно более высоких концентрациях.

Для объяснения протекающего процесса мы предположили механизм, схематично изображенный на рисунке 4. С химической точки зрения очевидно, что на одной из стадий реакции происходит восстановление оксимной группы ВК3, но сложнее

объяснить, как восстановленный интермедиат в условиях организма сочетается с исходной молекулой. Здесь ключевую роль могут играть комплексообразующие свойства, которыми, как известно, обладают виолураты [20]. В результате образования комплекса 1 с катионом многовалентного металла (например, катионом железа, цинка, кальция или другим) две молекулы ВК группируются вокруг одного координирующего центра. Последующее ферментативное восстановление оксиминогруппы с образованием интермедиата 2 и его конденсация по механизму нуклеофильного замещения выглядит логичным продолжением процесса, приводящего к образованию новой хелатирующей системы — молекулы пурпурата М.

По предварительным данным<sup>8</sup>, из производных ВК1–ВК4 вещество ВК3 представляло наибольший интерес с точки зрения антигипоксической активности, поэтому оно было выбрано для углубленного исследования. В ходе проведения настоящей работы мы оценили динамику концентрации 1-бутилвиолуровой кислоты ВК3 и ее метаболита М3 в плазме крови крыс после внутрижелудочного и внутрибрюшинного введения ВК3. Результаты представлены в таблице 3.

Метаболит М3 появлялся в плазме крови уже на 15 мин в концентрации 0,10 мг/л после внутрижелудочного и 0,38 мг/л после внутрибрюшинного введения 1-бутилвиолуровой кислоты, что свидетельствовало о быстром протекании метаболизма (рис. 5). При этом судя по тому, что концентрация М3 в точке максимума не превышала 0,75 мг/л, существенного накопления метаболита в крови не наблюдалось, что было связано с его более быстрым, по сравнению с исходным веществом, элиминированием через почки с мочой. Пурпурат обнаруживали также в органах — печени и почках крыс, причем максимум концентрации после

**Таблица 2.** Усредненные количества исходных веществ и их метаболитов, выделенных с мочой после внутрижелудочного введения виолуровых кислот

Исходное вещество (доза, мг/кг)	Продукты в моче	Выведено с мочой, мг/кг			Выведено всего за 24 ч	
		Период времени, ч			мг/кг	% от исходной дозы
		0–4	4–8	8–24		
ВК1 (80)	ВК1	4,27	4,37	0,30	8,94	11,2 ± 1,8
	М1	1,57	1,76	0,37	3,70	4,63 ± 0,91
ВК2 (80)	ВК2	1,25	0,30	0,28	1,83	2,29 ± 0,35
	М2	0,27	0,071	0,023	0,36	0,45 ± 0,12
ВК3 (100)	ВК3	8,35	3,24	1,83	13,42	13,42 ± 2,26
	М3	4,94	4,99	2,32	12,25	12,25 ± 1,92
ВК4 (100)	ВК4	5,12	0,91	0,18	6,21	6,21 ± 1,45
	М4	0,95	0,12	0,012	1,08	1,08 ± 0,34

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

<sup>8</sup> Поиск антигипоксантов и актопротекторов в ряду производных виолуровой кислоты: отчет о НИР. Руководитель Краснов КА; исполнители: Краснова АА, Лапина НВ, Ивницкий ЮЮ и др. ФГБУ «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова» Федерального медико-биологического агентства. СПб., 2024. Рег. № НИР 124022400178-1.

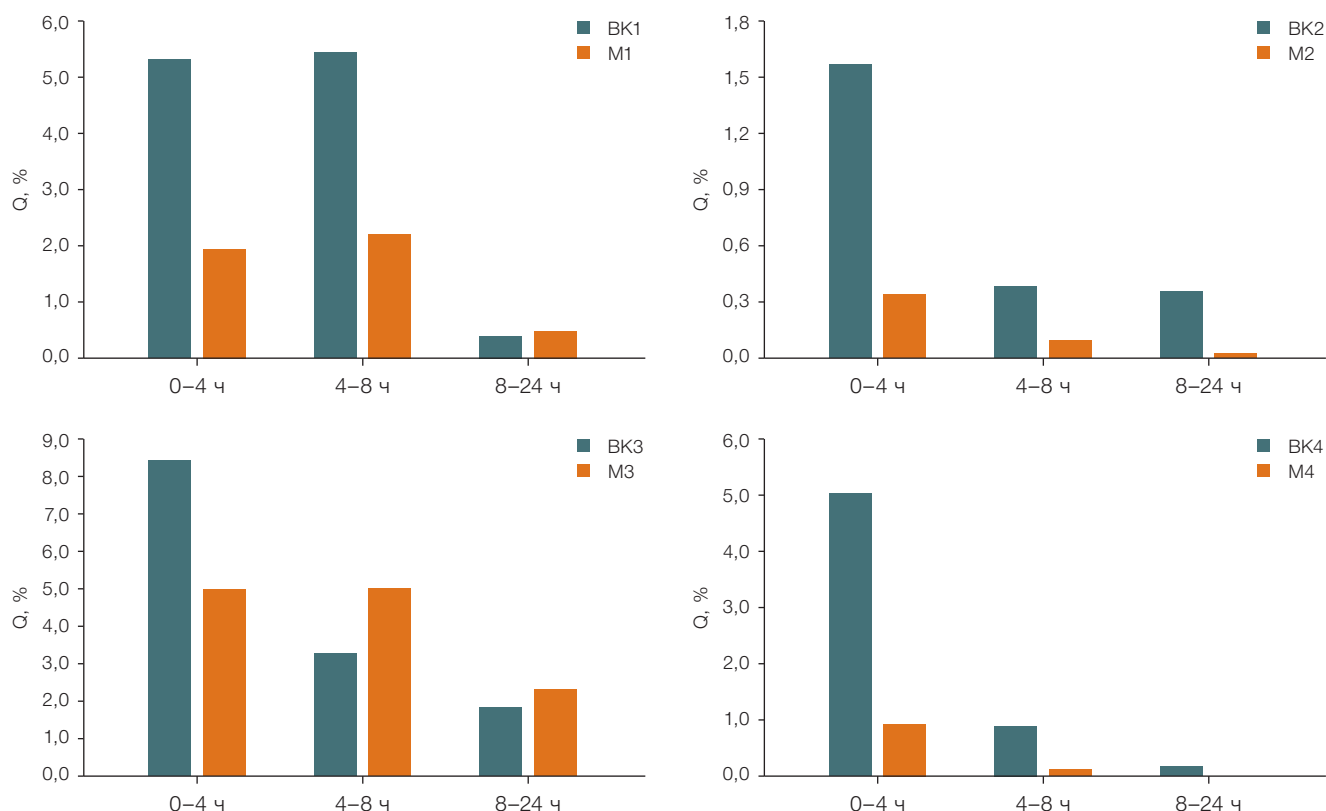


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

**Рис. 3.** Динамика выведения виолуровых кислот и их метаболитов с мочой у крыс после внутрижелудочного введения: данные представлены в виде среднего значения; Q — массовое количество выведенного вещества в % от введенной дозы

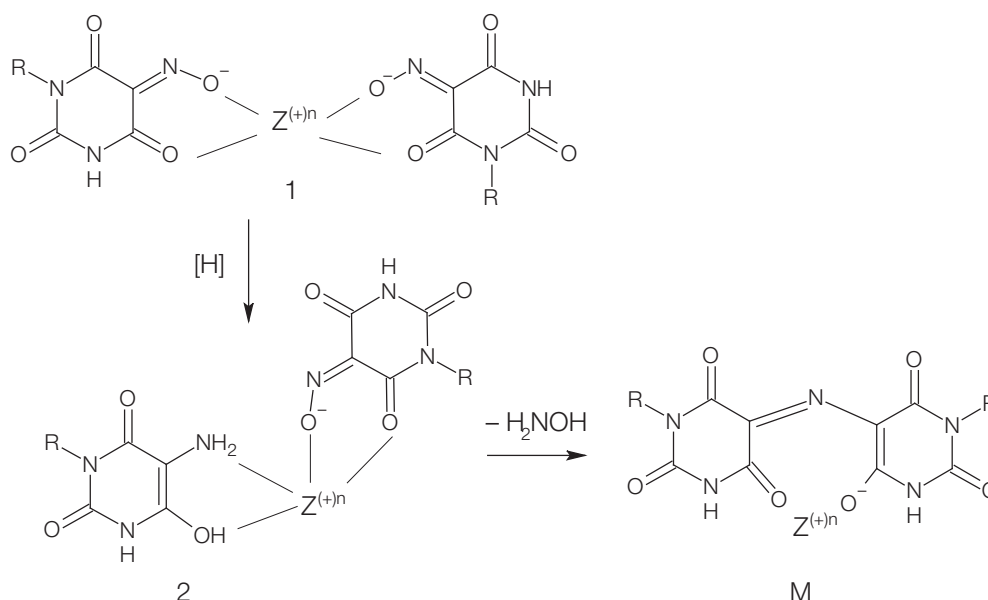


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

**Рис. 4.** Гипотетический механизм трансформации виолуровой кислоты в пурпурат *in vivo*

внутрибрюшинного введения достигался через 1 ч, то есть позже, чем в крови. Максимальное содержание пурпурата в гомогенате печени было 0,46 мг/кг, что в 1,6 раза ниже, чем в крови, а в почках — 1,23 мг/кг, что в 1,6 раза выше, чем в крови.

Для ответа на вопрос о биологической активности метаболита M3 мы провели экспериментальное исследование и показали, что этот продукт обладает выраженной антигипоксической активностью на модели гемической гипоксии у крыс. Профилактическое

**Таблица 3.** Концентрация веществ в плазме крови при внутрижелудочном и внутривнутрибрюшинном введении 1-бутилвиолуровой кислоты

Время, мин	Вещество	Концентрация, мг/л	
		Внутрижелудочное введение	Внутривнутрибрюшинное введение
15	ВКЗ	16,6 ± 2,5	70,8 ± 19,5
	МЗ	0,10 ± 0,05	0,38 ± 0,40
30	ВКЗ	27,4 ± 3,9	29,3 ± 5,3
	МЗ	0,13 ± 0,03	0,74 ± 0,24
60	ВКЗ	16,9 ± 2,7	8,7 ± 2,3
	МЗ	0,43 ± 0,11	0,75 ± 0,19
120	ВКЗ	5,5 ± 1,2	1,9 ± 0,5
	МЗ	0,35 ± 0,14	менее 0,05
180	ВКЗ	3,9 ± 1,2	1,8 ± 0,5
	МЗ	0,09 ± 0,02	менее 0,005

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

**Примечание:** ВКЗ — 1-бутилвиолуровая кислота; МЗ — *N,N'*-дибутилпурпуровая кислота.

введение *N,N'*-дибутилпурпурата калия МЗ полностью предотвращало гибель животных, получивших смертельную дозу нитрита натрия. Аналогичный защитный эффект демонстрировала 1-бутилвиолуровая кислота ВКЗ (табл. 4).

Клиническая картина отравления у крыс развивалась через 25–30 мин после подкожного введения нитрита. Наблюдалась атаксия, одышка, затем судороги и гибель животных в группе контроля. У крыс, предварительно получивших вещества ВКЗ и МЗ, симптомы отравления также отмечались, однако они были менее выраженными и практически исчезали спустя 2 ч после инъекции нитрита, а начиная с 4 ч все животные в этих группах выглядели абсолютно здоровыми. В тех же условиях эталонный препарат сравнения амтизол не предотвращал гибели животных, лишь на 23% продлевая время их жизни.

Таким образом, было установлено, что МЗ является активным метаболитом кислоты ВКЗ и, возможно, играет роль в развитии фармакологического эффекта последней. Данный результат также показывает, что пурпулаты, биологическая активность которых ранее не исследовались, могут представлять интерес как потенциальные средства для купирования отравлений ядами метгемоглобинообразующего действия.

## ВЫВОДЫ

1. Виолуровые кислоты метаболизируются в организме животных, образуя соответствующие производные пурпуровой кислоты.
2. Механизм биотрансформации виолуровых кислот в пурпулаты включает восстановление

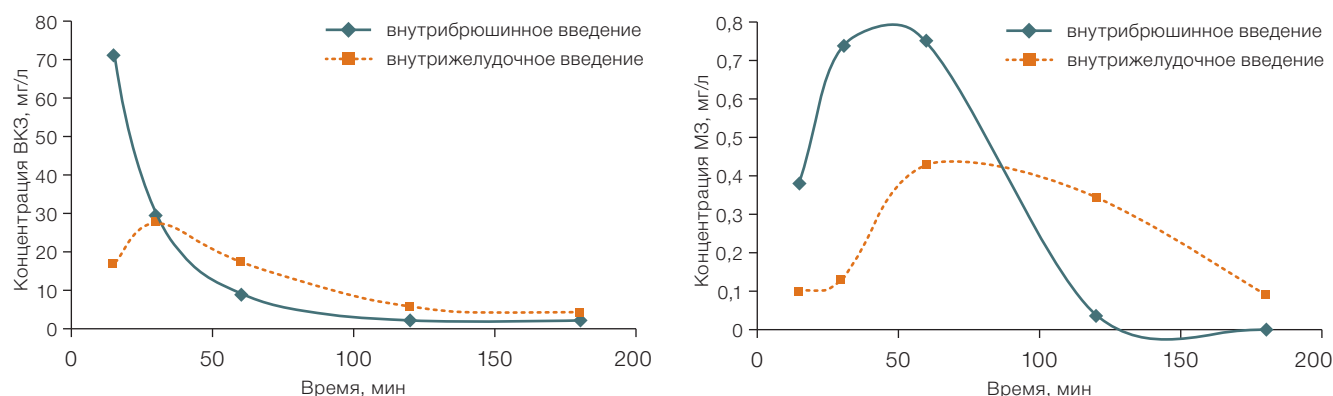


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

**Рис 5.** Динамика концентрации 1-бутилвиолуровой кислоты (слева) и ее метаболита (справа) в плазме крови крыс при ее внутривнутрибрюшинном и внутрижелудочном введении

**Таблица 4. Защитная эффективность веществ у крыс в условиях смертельного отравления нитритом натрия**

Вещество	Доза, мг/кг	Выживаемость, %	Среднее время жизни,	
			мин (± ΔX)	% к контролю
Контроль (вода)	–	0	46,1 (± 4,1)	100
Амтизол сукцинат	100	0	56,8 (± 4,5)	123
ВКЗ	75	100	Гибели нет	
МЗ	75	100	Гибели нет	

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

**Примечание:** ΔX — абсолютная погрешность значений; «—» — вводили воду без активного вещества в объеме 1 мл.

оксиаминогруппы и перекрестную конденсацию с молекулой исходного субстрата.

3. Виолуровые кислоты и их метаболиты выводятся из организма в значительной степени почками с мочой.

4. 1-бутилвиолуровая кислота ВКЗ и ее метаболит *N,N'*-дибутилпурпуровая кислота МЗ обладают

выраженной защитной активностью при отравлении нитритом натрия.

5. Пурпуровые кислоты наравне с виолуровыми представляют интерес для дальнейшего изучения в качестве потенциальных средств купирования отравлений ядами-метгемоглобинообразователями.

## Литература / References

1. Староконов ПМ, Ханевич МД. Антигипоксанта́ны в хирургии: перспективы развития. *Госпитальная медицина: наука и практика*. 2022;5(3):56–62. Starokon PM, Khanevich MD. Antihypoxants in surgery: development prospects. *Hospital Medicine: Science and Practice*. 2022;5(3):56–62 (In Russ.). EDN: [GVBQTE](#)
2. Оганов РГ. Положительный опыт применения этилметилгидроксипиридина сукцината в лечении кардиологических больных. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2017;16(5):91–4. Oganov RG. Positive experience of ethylmethylhydroxypyridine succinate usage in cardiological patients. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2017;16(5):91–4 (In Russ.). <https://doi.org/10.15829/1728-8800-2017-5-91-94>
3. Головкин АИ, Батоцыренова ЕГ, Комов ЮВ, Хальчицкий СЕ, Кашуро ВА. Обзор лекарственных препаратов для коррекции нарушений ЦНС, развившихся в результате действия нейротоксикантов. *Medline.ru*. 2022;23:385–419. Golovko AI, Batocurenova EG, Komov JuV, Khalchitsky SE, Kashuro VA. Review of drugs for the correction of CNS disorders developed as a result of the action of neurotoxicants. *Medline.ru*. 2022;23:385–419 (In Russ.). EDN: [WEDJBD](#)
4. Шустов ЕБ, Каркищенко ВН, Семёнов ХХ, Оковитый СВ, Болотова ВЦ, Юсковец ВН. Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием. *Биомедицина*. 2015;1:18–23. Shustov EB, Karkishhenko VN, Semjonov HH, Okovity SV, Bolotova VTs, Yuskovets VN. Search of regularities, determining antihypoxic activity of the compounds with nootropic and neurotropic action. *Journal Biomed*. 2015;1:18–23 (In Russ.). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2037.3200>
5. Oliyunk S, Oh S. The pharmacology of actoprotectors: practical application for improvement of mental and physical performance. *Biomolecules and Therapeutics*. 2012;20(5):446–56. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.5.446>
6. Шамрей ВК, Курасов ЕС, Нечипоренко ВВ, Колчев АИ, Цыган НВ. Возможности применения Мексидола в комплексной терапии психических расстройств. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020;120(5):160–4. Shamrey VK, Kurasov ES, Nechiporenko VV, Kolchev AI, Tsygan NV. Possibilities of using Mexidol in the complex therapy of mental disorders. *S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2020;120(5):160–4 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/jnevro2020120051160>
7. Шабанов ПД, Зарубина ИВ. Гипоксия и антигипоксанта́ны, в фокусе черепно-мозговой травмы. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2019;17(1):7–16. Shabanov PD, Zarubina IV. Hypoxia and antihypoxants, focus on brain injury. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2019;17(1):7–16 (In Russ.). <https://doi.org/10.17816/RCF1717-16>
8. Федоров ВН, Петровский АК, Вдовиченко ВП, Захарова МН, Аршинов АВ. Проблемы классификации и характеристика нейротропных средств, применяемых для терапии нарушений мозгового кровообращения. *Медицинская этика*. 2022;1:25–33. Fedorov VN, Petrovsky AK, Vdovichenko VP, Zakharova MN, Arshinov AV. Problems of classification and characteristics of neurotropic agents used for the treatment of cerebrovascular accidents. *Medical Ethics*. 2022;1:25–33 (In Russ.). EDN: [JYWWBB](#)
9. Репина ЭФ, Хуснутдинова НЮ, Тимашева ГВ, Байгильдин СС, Каримов ДО, Мусина ЛА и др. Морфологические особенности гепатопротекторного действия антигипоксанта́нов при остром поражении печени тетрахлорметаном в эксперименте. *Токсикологический вестник*. 2019;1(154):43–8. Repina EF, Khusnutdinova NU, Timasheva GV, Baygildin SS, Karimov DO, Musina LA, et al. Morphological specificities of hepatoprotective effects of antihypoxants in experimental acute liver damage with carbon tetrachloride. *Toxicological Review*. 2019;1(154):43–8 (In Russ.). <https://doi.org/10.36946/0869-7922-2019-1-43-48>
10. Оковитый СВ, Суханов ДС, Заплутанов ВА, Смагина АН. Антигипоксанта́ны в современной клинической практике. *Клиническая медицина*. 2012;90(9):63–8. Okovityj SV, Suhanov DS, Zaplutanov VA, Smagina AN.

- Antihypoxants in current clinical practice. *Clinical Medicine (Russian Journal)*. 2012;90(9):63–8 (In Russ.).  
EDN: [PUHHAZ](#)
11. Уракова НА, Ураков АЛ. Антигипоксанта́ны нового поколения: Щелочные растворы перекиси водорода как генераторы медицинского газа кислорода. *Психофармакология и биологическая наркология*. 2025;16(1):35–42.  
Urakova NA, Urakov AA. New-generation antihypoxants: Alkaline hydrogen peroxide solutions as generators of medical oxygen gas. *Psychopharmacology and Biological Narcology*. 2025;16(1):35–42 (In Russ.).  
<https://doi.org/10.17816/phbn642337>
  12. Краснов КА, Краснова АА, Феклистова КА, Папп ВТ. Виолуровые кислоты: история, фармакология и перспективы (Аналитический обзор). *Medline.ru*. 2024;25:630–47.  
Krasnov KA, Krasnova AA, Feklistova KA, Papp VT. Violuric acids: history, pharmacology and prospects (analytical review). *Medline.ru*. 2024;25:630–47 (In Russ.).  
EDN: [ALHSLT](#)
  13. Шугалей ИВ, Целинский ИВ, Краснов КА, Седельникова НА. Ингибирующее действие производных виолуровой кислоты в реакции окисления оксигемоглобина нитрит-ионом. *Журнал общей химии*. 1993;63(7):1646–50.  
Shugalej IV, Celinskij IV, Krasnov KA, Sedel'nikova NA. The inhibitory effect of violuric acid derivatives in the oxidation reaction of oxyhemoglobin with nitrite ion. *Russian Journal of General Chemistry*. 1993;63(7):1646–50 (In Russ.).
  14. Ашкинази РИ. N-Замещенные производные 5-оксиминобарбитуровой кислоты. Патент Российской Федерации № 2188196;2002.  
Ashkinazi RI. N-Substituted derivatives of 5-hydroxyimino-barbituric acid. Patent of the Russian Federation No. 2188196;2002 (In Russ.).  
EDN: [ADPSVU](#)
  15. Liu L, Liu Y, Zhou X, Xu Zh, Zhang Y, Ji L, et al. Analyzing the metabolic fate of oral administration drugs: A review and state-of-the-art roadmap. *Pharmacology*. 2022;13:962718.  
<https://doi.org/10.3389/phar.2022.962718>
  16. Краснов КА, Феклистова КА, Краснова АА, Папп ВТ, Гафт СС. Синтез и свойства N-замещенных производных пурпуровой кислоты и их 2-тиоаналогов. *Журнал общей химии*. 2024;94(9):958–64.  
Krasnov KA, Feklistova KA, Krasnova AA, Papp VT, Gaft SS. Synthesis and Properties of N-Substituted Purpuric Acid Derivatives and Their 2-Thioanalogues. *Journal of General Chemistry*. 2024;94(9):958–64 (In Russ.).  
EDN: [ROZXFJ](#)
  17. Конев ВФ, Томчин АБ, Виноградов ВМ, Маслеников АИ, Костычева МВ, Зюкина ГВ и др. Сукцинат 3,5-диамино-1,2,4-тиадиазола, обладающий противогипоксической активностью. Патент СССР № 1584340;1996.  
Konev VF, Tomchin AB, Vinogradov VM, Maslenikov AI, Kostycheva MV, Zjukina GV, et al. 3,5-Diamino-1,2,4-thiadiazole succinate showing antihypoxic activity. Patent of the USSR No. 1584340;1996 (In Russ.).  
EDN: [FXYAFC](#)
  18. Марышева ВВ. Антигипоксанта́ны аминотиолового ряда. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2007;5(1):17–27.  
Marysheva VV. Antihypoxants of the aminothioliol series. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2007;5(1):17–27 (In Russ.).  
EDN: [HZLMGN](#)
  19. Куценко СА. Основы токсикологии. СПб.: Фолиант; 2004.  
Kutsenko SA. *Fundamentals of Toxicology*. St. Petersburg: Foliant; 2004 (In Russ.).  
EDN: [QKMWIB](#)
  20. Lorenz V, Liebing P, Engelhardt F, Stein F, Kuhling M, Schroder L, et al. Review: the multicolored coordination chemistry of violurate anions. *Journal of Coordination Chemistry*. 2019;72(1):1–34.  
<https://doi.org/10.1080/00958972.2018.1560431>

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: К.А. Краснов — научный замысел, разработка плана исследования, семантика, трактовка данных, подготовка черновика рукописи, окончательное утверждение публикуемой версии рукописи; К.А. Феклистова — синтез производных виолуровой и пурпуровой кислот; А.А. Краснова — спектрофотометрические исследования; С.С. Гафт — исследования методом ВЭЖХ; В.Т. Папп — контроль качества синтезированных субстанций, статистическая обработка результатов фармакокинетических исследований; М.В. Мелихова — изучение фармакологической активности соединений на животных; Н.А. Белякова — проведение фармакокинетических исследований. Все авторы участвовали в обсуждении результатов, подготовке и редактировании рукописи статьи.

#### Об авторах:

**Краснов Константин Андреевич**, д-р хим. наук, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1503-2243>

**Феклистова Кристина Александровна**, ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-3670-2145>

**Краснова Александра Андреевна**, ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-1666-2161>

**Гафт Семен Самуилович**, ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-5092-8161>

**Папп Владимир Трофимович**

**Мелихова Марина Валентиновна**, канд. мед. наук, ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-0654-6404>

**Белякова Наталья Александровна**, канд. мед. наук, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0838-8391>