

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ КСИМЕДОНА И ЕГО КОНЬЮГАТА С *L*-АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ ПРИ ОТРАВЛЕНИИ МЫШЕЙ ПОЛУЛЕТАЛЬНОЙ ДОЗОЙ ПАРАЦЕТАМОЛА

Г.П. Беляев*, А.Б. Выштакалюк, А.А. Парфенов, И.В. Галяметдинова, В.Э. Семенов, В.В. Зобов

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова –
обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН,
420088, Казань, ул. Академика Арбузова, 8; *e-mail: gregoir4@gmail.com

В настоящее время существует острая потребность в создании эффективной терапии, направленной на предотвращение последствий лекарственного повреждения печени (ЛПП). В связи с этим, данная работа была посвящена оценке гепатопротекторного действия производных пиримидина ксимедона (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)-пиримидин-2-он) и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой на модели отравления мышей линии ICR (CD-1) полулетальной дозой парацетамола (ацетаминофена). В ходе исследования мыши однократно перорально получали парацетамол в дозе ЛД₅₀ 425 мг/кг. Изучаемые соединения вводили однократно внутривентриально в различных дозах через полчаса после парацетамола. В течение 5 дней наблюдали за выживаемостью животных. На 6 день проводили биохимическую и гистопатологическую оценку эффектов изучаемых соединений. Ксимедон смягчал токсическое воздействие сывороточной аланинаминотрансферазы и уровень малонового диальдегида. При этом, конъюгат ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой оказывал более выраженный гепатопротекторный эффект по сравнению с нативной молекулой ксимедона.

Ключевые слова: производные пиримидина; ксимедон; гепатопротекторы; парацетамол; ацетаминофен; лекарственные поражения печени

DOI: 10.18097/BMCRM00249

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные поражения печени (ЛПП) представляют серьезную проблему для госпитализированных пациентов во всем мире. 17% ЛПП с летальным исходом приходится на применение парацетамола (ацетаминофена). В России ЛПП регистрируются почти у 3% госпитализированных больных. ЛПП обусловлены приёмом противовоспалительных, противоопухолевых, противомикробных и других лекарственных средств. Токсичность различных препаратов приводит к повреждению гепатоцитов, нарушению биохимических процессов в печени и развитию острой печеночной недостаточности [1-3]. В последние десятилетия увеличивается количество случаев острой печеночной недостаточности, вызванной бесконтрольным приемом биологически активных добавок и средств растительного происхождения [4].

В данном исследовании в качестве модели ЛПП был использован парацетамол, как наиболее доступный и часто применяемый анальгетик-антипиретик, токсичность которого является второй по распространённости причиной трансплантации печени в мире [5]. Против острого токсического воздействия парацетамола применяется антидот *N*-ацетилцистеин (НАС), который необходимо использовать непосредственно после интоксикации, однако, существует потребность в поисках эффективной терапии, направленной на более поздние этапы развития отравления [6].

На рынке представлен большой спектр гепатопротекторных препаратов, направленных на защиту

и восстановление ткани печени; однако, для них часто отсутствует клинически доказанная эффективность [7]. В создании новых эффективных гепатопротекторов активно исследуются производные пиримидина, обладающие высокой биологической активностью [8]. Одним из таких производных пиримидина является ксимедон (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)-пиримидин-2-он) – отечественный лекарственный препарат, стимулятор регенерации клеток. Ксимедон и его производные, в том числе конъюгаты ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой, уже известны своей способностью восстанавливать ткань печени крыс на модели острого токсического повреждения четыреххлористым углеродом [9]. Однако о гепатопротекторном эффекте ксимедона и его производных при ЛПП мало информации.

Таким образом, целью данного исследования была оценка гепатопротекторного эффекта ксимедона и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой при отравлении полулетальной дозой парацетамола и их влияния на биохимические показатели состояния печени мышей.

МЕТОДИКА

Ксимедон и его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой (рис. 1) были получены в лаборатории химии нуклеотидных оснований ИОФХ им. А.Е. Арбузова по описанным ранее методикам [9, 10].

Исследования были проведены на 110 самках мышей линии ICR (CD-1) массой от 28 г до 35 г, полученных из НПП Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН (Пушино).



Животных содержали в стандартных условиях вивария с 12-часовым световым днем и неограниченным доступом к еде и воде. Кормление осуществляли стандартным гранулированным кормом для грызунов. Для оценки гепатопротекторных свойств исследуемых соединений была использована мышьяная модель, так как она является наиболее приближенной к состоянию человека [11].

Дизайн эксперимента был разработан на основе работы [12]. Животные были разделены на 10 групп: 1) интактная группа ($n = 10$), 2) контрольная группа ($n = 20$), которой вводили только парацетамол в полулетальной дозе 425 мг/кг, и у половины мышей забирали биоматериал спустя 5 ч после интоксикации, 3) 4 группы ($n = 10$ каждая), получавшие ксимедон в дозах 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг, 4) 4 группы ($n = 10$ каждая), получавшие конъюгат ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой в дозах 2.1 мг/кг, 21 мг/кг, 210 мг/кг и 420 мг/кг, содержащие эквивалентные дозы ксимедона.

В ходе эксперимента мышей лишали корма за 12 ч до начала эксперимента, затем однократно перорально вводили 17% раствор Твина-80, содержащий парацетамол в полулетальной дозе 425 мг/кг, а в интактной группе эквивалентный объем 17% раствора Твина-80 без парацетамола. Полулетальная доза парацетамола валидировалась для мышей экспериментально. Сразу после введения парацетамола мышам возвращали корм. Через полчаса после введения парацетамола мышам однократно внутрибрюшинно вводили исследуемые соединения. За животными наблюдали в течение 5 дней, после чего проводили эвтаназию путем ингаляционной анестезии 5% изофлураном и отбирали образцы биологического материала для исследований.

Для гистологического анализа печень мышей фиксировали в течение суток в 10% забуференном формалине («БиоВитрум», Россия), затем проводили гистологическую проводку при помощи автоматического гистопроцессора Tissue-Tek Vip5 («Sakura», Япония). Срезы ткани печени толщиной 4-5 мкм готовили на ротационном микротоме Accu-Cut SRM 200 («Sakura») и окрашивали гематоксилин-эозином («БиоВитрум», Россия). Визуализацию полученных срезов проводили на световом микроскопе Nikon H550S («Nikon», Япония).

Забор крови осуществляли из сердца животного посмертно, затем, для отделения сыворотки, проводили центрифугирование при 3000 об/мин в течение 20 мин при 4°C с помощью центрифуги LMC-4200R («BioSan», Латвия). Активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ), уровень глюкозы и общего белка в сыворотке крови мышей определяли с помощью готовых наборов реагентов («Диакон-ДС», Россия) и планшетного спектрофотометра Epoch («BioTech», США).

Уровень малонового диальдегида (МДА) определяли в сыворотке крови и гомогенатах печени мыши согласно [13]. Сыворотку крови получали, как описано выше. 10% гомогенаты печени готовили после разморозки, в соответствии с руководством гомогенизатора TissueLiser LT («Qiagen», Германия) с использованием натрий-фосфатного буфера (pH 7.4). Полученные гомогенаты разбавляли так, чтобы концентрация белка в них составляла от 1 мг/мл до 10 мг/мл.

Анализ уровня МДА в сыворотке и гомогенатах проводили с использованием 30% раствора трихлоруксусной

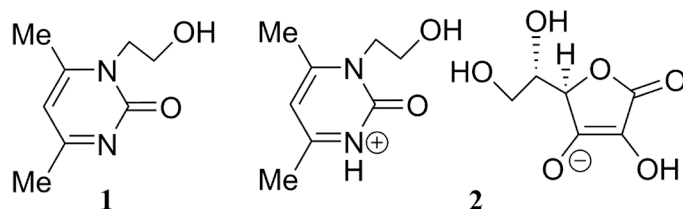


Рисунок 1. Структурная формула ксимедона (1) и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой (2).

кислоты (ТХУ) («Вектон», Россия) и 0.8% раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК) («AlfaAesar», США). Реакционную смесь нагревали до 100°C в течение 15 мин, затем охлаждали до комнатной температуры в течение 30 мин и центрифугировали при 5000 *g* 15 мин с помощью центрифуги Smart R17 Plus («Hanil», Корея). Надосадочную жидкость исследовали с помощью планшетного спектрофотометра Epoch («BioTech») при длине волны 532 нм.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы SPSS Statistics. Все данные в статье представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего. Нормальное распределение определялось по критерию Колмогорова-Смирнова. Для статистического анализа полученных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Анализ выживаемости проводили с использованием метода Каплана-Майера. Для сравнения двух кривых выживаемости использовали непараметрический критерий Мантела-Кокса, различия считали значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

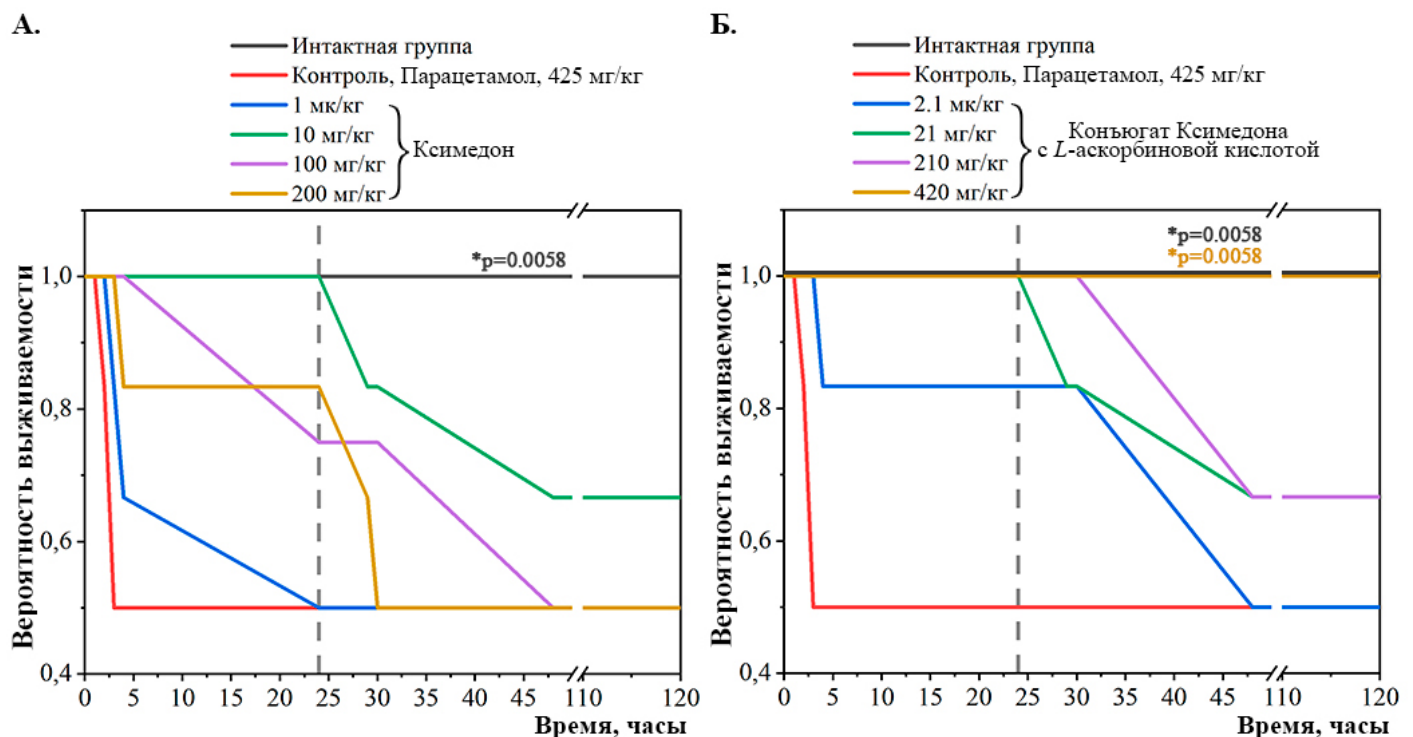
В ходе исследования было показано, что однократное введение парацетамола в дозе 425 мг/кг в контрольной группе приводило к гибели 50% животных в течение 3-х часов после введения (табл. 1). Смерть животных при воздействии парацетамола могла быть связана с его гепатотоксическим эффектом. Известно, что парацетамол метаболизируется в печени посредством цитохрома P450 с последующим образованием токсического соединения *N*-ацетил-*P*-бензохинонимина (NAPQI), который в свою очередь приводит к оксидативному стрессу и повреждению гепатоцитов [14].

В то время как введение ксимедона в дозе 10 мг/кг спустя полчаса после воздействия парацетамола увеличивало количество выживших животных на 20% относительно контрольной группы. Однако введение ксимедона в дозах 1 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг оказалось неэффективным и приводило к гибели 50% животных аналогично контрольной группе. Тем не менее, воздействие ксимедона во всех дозах достоверно ($p < 0.05$) отсрочило время наступления смерти мышей после отравления парацетамолом в среднем на 25 ч по сравнению с контрольной группой, что может говорить о защитном эффекте данного соединения.

Конъюгат ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой оказал больший эффект на выживаемость мышей после отравления парацетамолом. Так, при однократном внутрибрюшинном введении конъюгата ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой в дозах 21 мг/кг, 210 мг/кг и 420 мг/кг происходило

Таблица 1. Оценка выживаемости мышей в течение 120 ч после отравления парацетамолом в дозе 425 мг/кг.

Показатели	Группы									
	Интактная группа	Контроль, парацетамол, 425 мг/кг	Ксимедон, мг/кг				Конъюгат ксимедона с L-аскорбиновой кислотой, мг/кг			
			1	10	100	200	2.1	21	210	420
Пало	0	5	5	3	5	5	5	4	3	0
Выжило	10	5	5	7	5	5	5	6	7	10
% выживших	100	50	50	70	50	50	50	60	70	100
Среднее время наступления смерти, ч	–	2.7 ± 0.2	10.3 ± 4.3*	38.5 ± 5.5*	32 ± 5.1*	21 ± 5.4*	27.3 ± 8.0*	37 ± 6.4*	48 ± 0.0.*	–

* – различия с контрольной группой достоверны, $p \leq 0.05$.**Рисунок 2.** Анализ выживаемости мышей в течение 120 ч после отравления парацетамолом в дозе 425 мг/кг по методу Каплана-Майера: (А) – при однократном введении ксимедона в разных дозах, (Б) – при однократном введении конъюгата ксимедона с L-аскорбиновой кислотой в разных дозах. Цветные линии представляют собой функцию выживаемости. Пунктирной линией обозначено 24 часа. * – различия с контрольной группой достоверны по критерию Мантла-Кокса, $p \leq 0.05$.

увеличение количества выживших животных на 10%, 20% и 50% соответственно по сравнению с контрольной группой. Кроме того, при воздействии конъюгата ксимедона с L-аскорбиновой кислотой во всех дозах увеличивалось время до наступления смерти мышей после отравления парацетамолом в среднем на 58 ч по сравнению с контрольной группой. Это может свидетельствовать о более выраженном защитном эффекте конъюгата ксимедона с L-аскорбиновой кислотой по сравнению с нативной молекулой ксимедона.

Затем был проведен анализ выживаемости мышей по методу Каплана-Майера, позволяющему дать интегральную оценку этого показателя (рис. 2, табл. 2). Было показано, что однократное введение парацетамола в дозе

425 мг/кг в контрольной группе достоверно приводило к снижению среднего значения времени выживания на 48.9% относительно интактной группы животных ($\chi^2 = 7.62$, $p = 0.0058$).

Введение ксимедона в дозах 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг способствовало увеличению среднего значения времени выживания мышей, которое не достигало уровня статистической значимости по сравнению с контрольной группой (рис. 2А, табл. 2).

Конъюгат ксимедона с L-аскорбиновой кислотой оказал больший эффект на выживаемость мышей после отравления парацетамолом. При дозе конъюгата ксимедона с L-аскорбиновой кислотой 420 мг/кг увеличение среднего значения времени выживания мышей достигало уровня

Таблица 2. Показатели анализа выживаемости мышей в течение 120 ч после отравления парацетамолом в дозе 425 мг/кг по методу Каплана-Майера.

Показатели	Группы									
	Интактная группа	Контроль, парацетамол, 425 мг/кг	Ксимедон, мг/кг				Конъюгат ксимедона с L-аскорбиновой кислотой, мг/кг			
			1	10	100	200	2.1	21	210	420
Среднее время выживания, ч	120 ± 0*	61.3 ± 17.7	65.2 ± 16.7	92.8 ± 11.7	76 ± 12.3	70.5 ± 15.1	73.7 ± 14.5	96 ± 10.2	92.3 ± 12.0	120 ± 0.0*
Медиана времени выживания, ч	120	3	24	120	48	30	48	120	120	120

* – различия с контрольной группой достоверны, $p \leq 0.05$.

статистической значимости по сравнению с контрольной группой. Это свидетельствует об усилении эффекта конъюгата ксимедона с L-аскорбиновой кислотой по сравнению с немодифицированной молекулой ксимедона (рис. 2Б, табл. 2).

Далее была проведена оценка массового коэффициента и общей морфологии печени. Существенных достоверных изменений массового коэффициента печени среди всех групп отмечено не было (рис. 3). Тем не менее, при введении конъюгата ксимедона с L-аскорбиновой кислотой во всех дозах можно отметить тенденцию к сохранению массового коэффициента неизменным по сравнению с интактной группой.

При изучении общей морфологии печени было показано (рис. 4), что спустя 5 дней после однократного введения парацетамола в дозе 425 мг/кг печень характеризовалась наличием обширных очагов некроза и геморрагий по сравнению с интактной группой животных. При этом печень мышей, которым вводили ксимедон и его конъюгат с L-аскорбиновой кислотой в наиболее повышающих выживаемость дозах (10 мг/кг и 420 мг/кг соответственно), характеризовалась значительным уменьшением зон некротических повреждений и геморрагий.

В ходе гистологической оценки ткани печени было показано (рис. 5), что в контрольной группе спустя 5 дней после однократного введения парацетамола в дозе 425 мг/кг отмечены изменения в архитектуре ткани органа по сравнению с интактной группой животных. В ткани печени контрольной группы были выявлены обширные очаги некротических изменений (баллонная дистрофия). При введении ксимедона и его конъюгата с L-аскорбиновой кислотой в наиболее эффективных, повышающих выживаемость дозах 10 мг/кг и 420 мг/кг соответственно, встречались признаки гепатоцеллюлярного повреждения и небольших некротических очагов, менее обширные по сравнению с контрольной группой.

Также были оценены основные биохимические параметры функционального состояния печени мышей: активность сывороточных АЛТ, АСТ, концентрация глюкозы и общего белка (рис. 6) [15]. Через 5 ч после однократного введения парацетамола в дозе 425 мг/кг происходило значимое ($p = 0.0002$) увеличение активности АЛТ в 15 раз по сравнению с интактной группой, что говорит о развитии повреждения гепатоцитов, которое

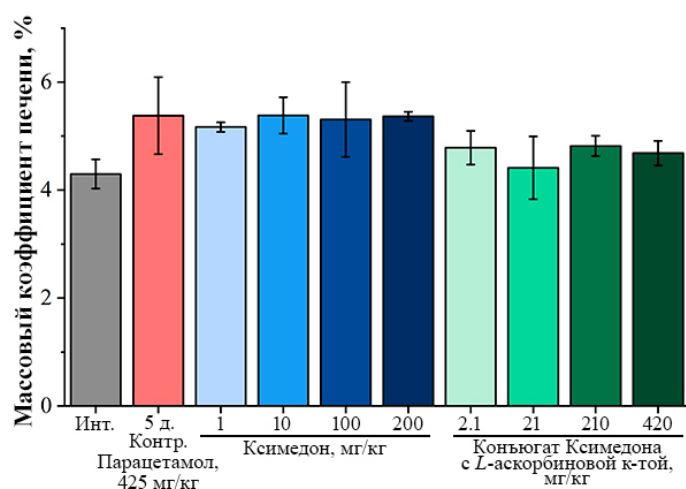


Рисунок 3. Массовый коэффициент печени после отравления парацетамолом в дозе 425 мг/кг. (Инт.) – интактная группа. (Контр.) – контрольная группа.

могло стать причиной гибели животных (рис. 6А). Через 5 дней после введения парацетамола в дозе 425 мг/кг также сохранялась повышенная в 3 раза ($p = 0.047$) активность АЛТ по сравнению с интактной группой. Однократное введение Ксимедона в дозах 1 мг/кг, 10 мг/кг, 100 мг/кг и 200 мг/кг приводило к значимому снижению активности АЛТ в 2.4 раза ($p = 0.003$), в 2.2 раза ($p = 0.001$), в 5.2 раза ($p = 0.006$) и в 4.2 раза ($p = 0.001$) соответственно по сравнению с контрольной группой. Важно отметить, что Ксимедон в дозах 100 мг/кг и 200 мг/кг восстанавливал активность АЛТ до уровня референсных значений здоровых мышей линии ICR (CD-1), которые составляют 25-76 Ед/л [16].

При введении конъюгата Ксимедона с L-аскорбиновой кислотой в дозах 2.1 мг/кг, 21 мг/кг, 210 мг/кг и 420 мг/кг также было показано достоверное снижение активности АЛТ в 2.8 раза ($p = 0.0007$), в 3.6 раза ($p = 0.002$), в 2.8 раза ($p = 0.0009$), в 2.1 раза ($p = 0.0003$) соответственно по сравнению с контрольной группой. При этом, конъюгат ксимедона с L-аскорбиновой кислотой в дозах 2.1 мг/кг, 21 мг/кг, 210 мг/кг также восстанавливал активность АЛТ до уровня референсных значений здоровых мышей линии ICR (CD-1) [16].

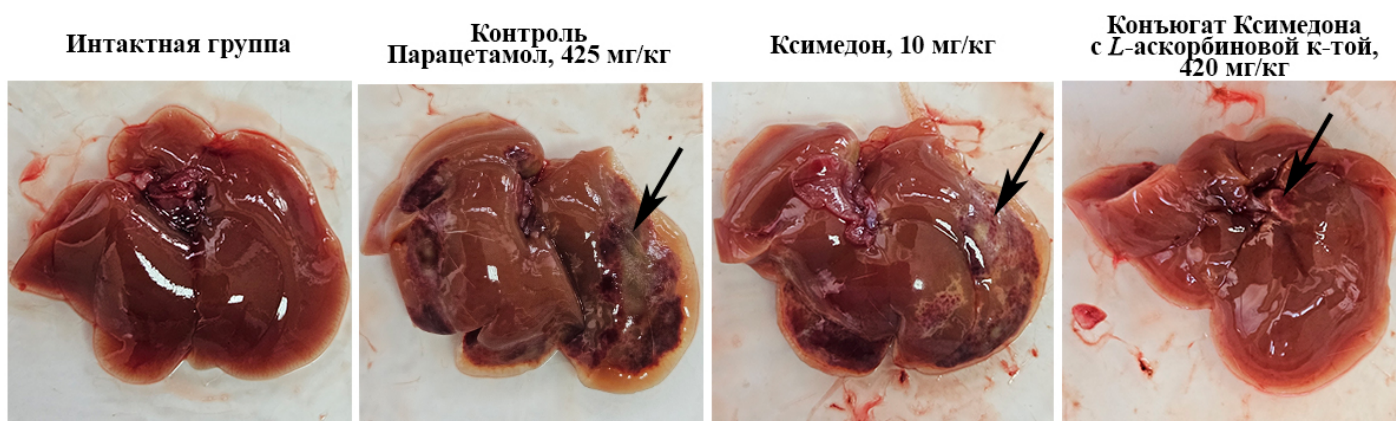


Рисунок 4. Репрезентативные макрофотографии печени после отравления парацетамолом в дозе 425 мг/кг. Представлены только эффективные дозы изучаемых соединений. Стрелкой показаны очаги некроза и геморрагий.

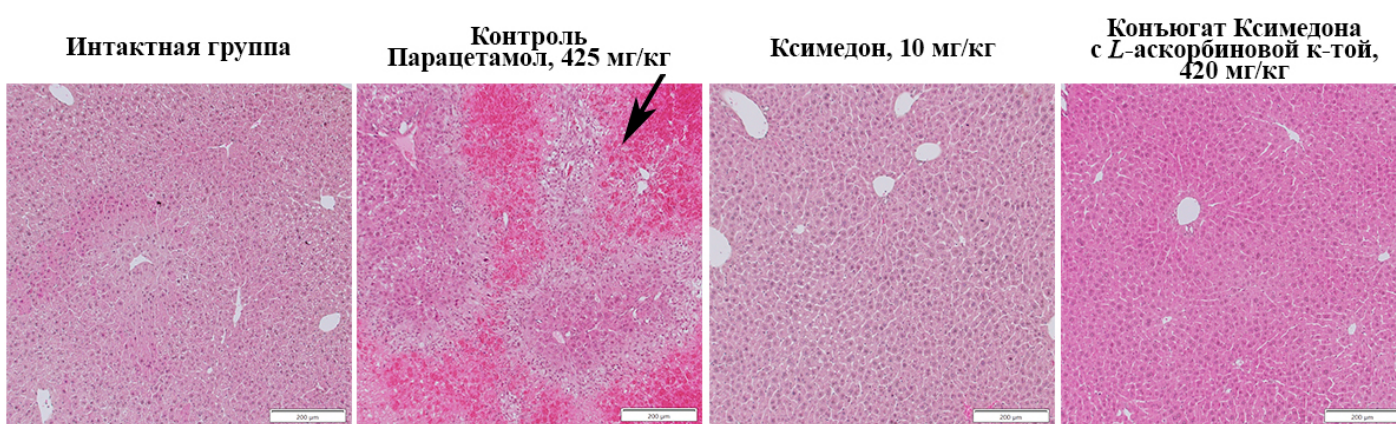


Рисунок 5. Репрезентативные микрофотографии ткани печени после отравления парацетамолом в дозе 425 мг/кг, окраска гематоксилин-эозином, увеличение 150х. Представлены только эффективные дозы изучаемых соединений. Стрелкой показаны гепатоцеллюлярные повреждения и некроз.

Таким образом, снижение активности АЛТ при однократном введении изучаемых соединений говорит о проявлении гепатопротекторного эффекта исследуемых соединений при отравлении парацетамолом. Кроме того, данный гепатопротекторный эффект соединений может объяснять увеличение среднего значения времени выживания мышей, показанного выше.

В случае маркера цитолиза клеток АСТ, было показано (рис. 6Б), что спустя 5 дней после однократного введения парацетамола в дозе 425 мг/кг отмечено недостоверное ($p = 0.19$) повышение активности АСТ в 1.7 раз по сравнению с интактной группой. В опытных группах, которым вводили Ксимедон и его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой, также наблюдалась высокая активность АСТ, сопоставимая с контрольной группой. Повышенная активность АСТ в исследуемых группах может свидетельствовать о повреждениях в других органах помимо печени [15].

Статистически значимых отличий между опытными группами при изучении биохимических показателей метаболической функции печени – концентрации глюкозы и общего белка, обнаружено не было (рис. 6В, 6Г).

Одним из важных показателей развития окислительного стресса/перекисного окисления липидов (ПОЛ) является уровень МДА в биологических образцах [17]. В ходе оценки уровня МДА в сыворотке крови было показано (рис. 7А), что спустя 5 часов после однократного введения парацетамола в дозе 425 мг/кг происходило значимое увеличение уровня

МДА на 28.6% ($p = 0.049$) по сравнению с интактной группой. Статистически значимое увеличение уровня МДА на 34.9% ($p = 0.019$) наблюдалось и спустя 5 дней после однократного введения парацетамола по сравнению с интактной группой, что свидетельствует о развитии окислительного стресса у животных.

Введение ксимедона в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг приводило к незначительному снижению уровня МДА на 5 день наблюдения по сравнению с контрольной группой. При этом, введение ксимедона в дозах 100 мг/кг и 200 мг/кг способствовало статистически значимому снижению уровня МДА на 29.8% ($p = 0.013$) и 34.1% ($p = 0.0004$) соответственно по сравнению с контрольной группой.

Введение конъюгата ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой в дозах 2.1 мг/кг и 420 мг/кг также приводило к значимому снижению уровня МДА на 28.1% ($p = 0.003$) и 21.8% ($p = 0.026$) соответственно по сравнению с контрольной группой. При этом, воздействие конъюгата ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой в дозах 21 мг/кг и 210 мг/кг также незначительно снижало уровень МДА на 11.0% ($p = 0.892$) и 16.3% ($p = 0.341$) соответственно по сравнению с контрольной группой. Таким образом, ксимедон и его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой способствовали снижению системного окислительного стресса, вызванного парацетамолом.

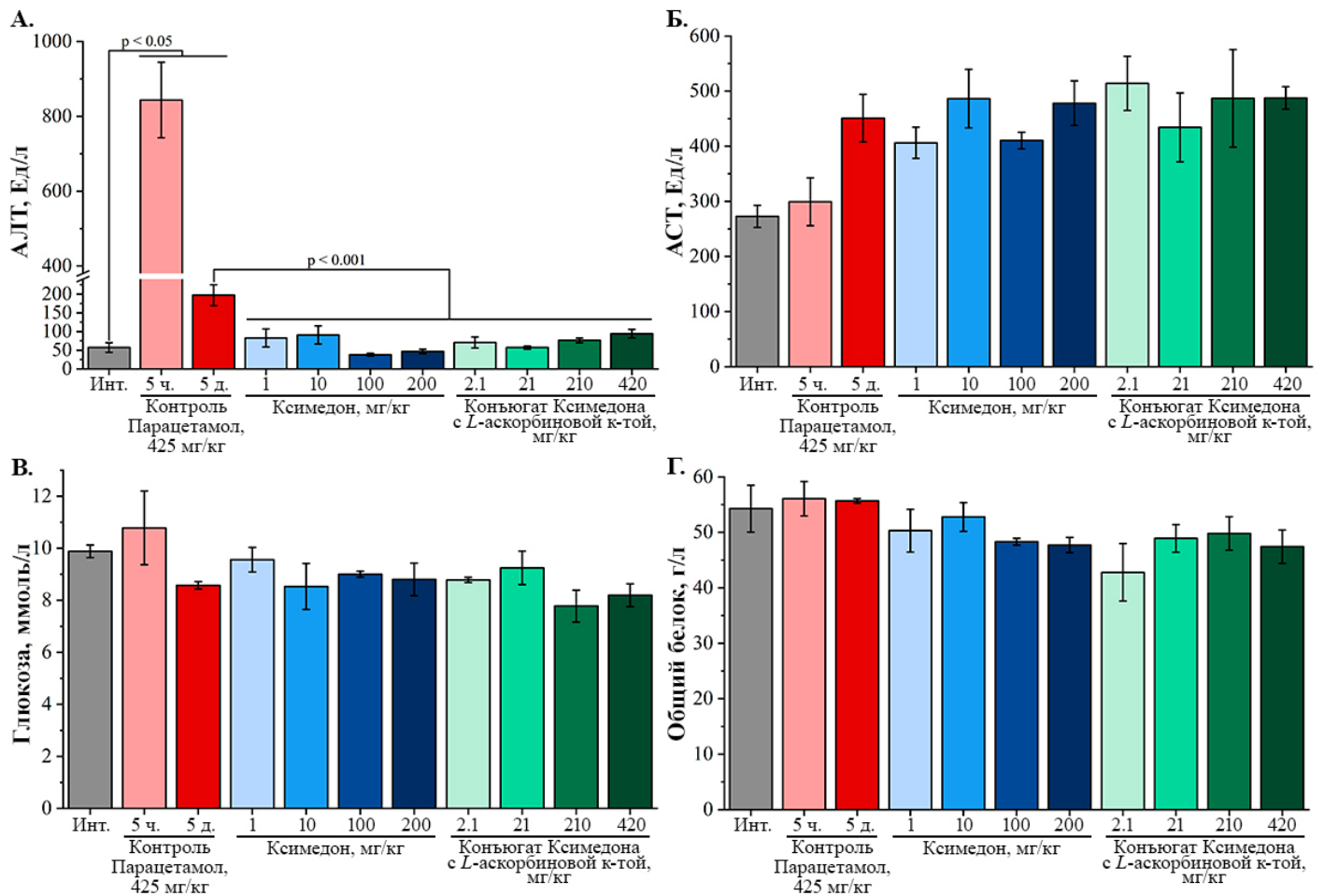


Рисунок 6. Изменение биохимических параметров сыворотки крови после отравления парацетамолом в дозе 425 мг/кг. Маркеры цитолиза клеток печени: (А) – активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), (Б) – активность аспаргатаминотрансферазы (АСТ). Маркеры метаболической функции печени: (В) – уровень глюкозы, (Г) – уровень общего белка. (Инт.) – интактная группа. Уровни значимости определены с помощью теста ANOVA с апостериорным критерием Тьюки.

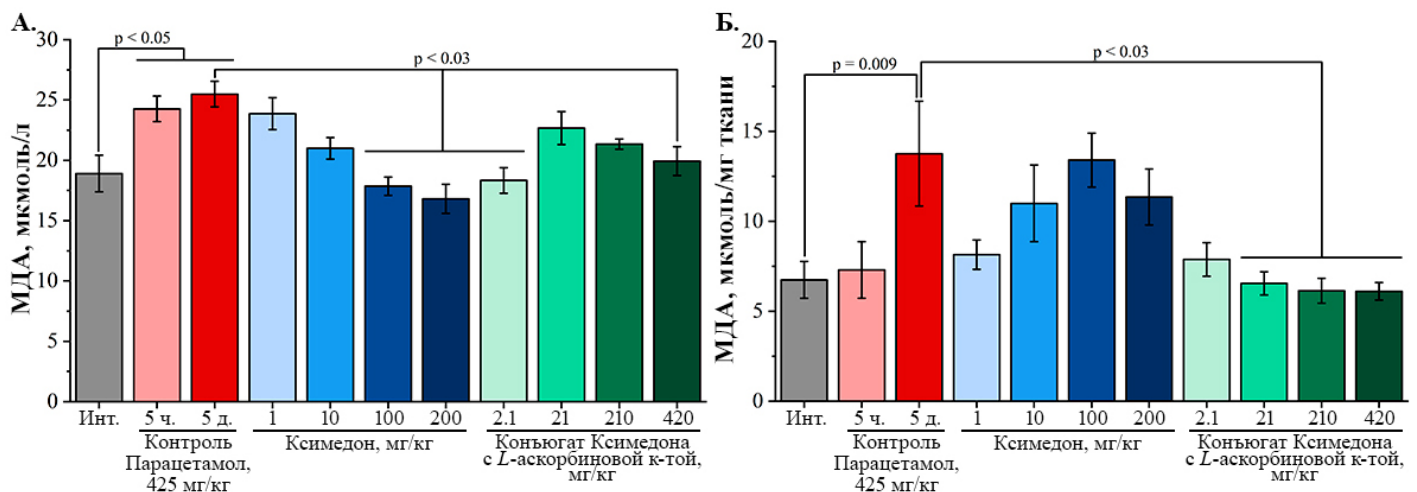


Рисунок 7. Изменение содержания МДА после отравления парацетамолом в дозе 425 мг/кг: (А) – в сыворотке крови мыши, (Б) – в гомогенатах ткани печени мыши. Инт. – интактная группа. Уровни значимости определены с помощью теста ANOVA с апостериорным критерием Тьюки.

В ходе оценки уровня МДА в гомогенатах ткани печени мышей было показано, что через 5 часов после однократного введения парацетамола в дозе 425 мг/кг не наблюдалось значимого повышения уровня МДА по сравнению с интактной группой (рис. 7Б). Однако на 5 день после введения парацетамола в дозе 425 мг/кг происходило значимое

($p = 0.009$) увеличение показателя МДА на 104.2% по сравнению с интактной группой, что говорит о развитии окислительного стресса в клетках печени. При введении ксимедона в дозах 1 - 200 мг/кг наблюдалось некоторое снижение показателя МДА по сравнению с контрольной группой, которое не достигало уровня статистической

значимости. Конъюгат ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой в дозах 21 мг/кг, 210 мг/кг и 420 мг/кг, в отличие от ксимедона, значимо снижал уровень МДА на 52% ($p = 0.03$), 55% ($p = 0.02$) и 56% ($p = 0.006$) соответственно по сравнению с контрольной группой. Важно отметить, что именно эти дозы конъюгата ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой приводили к повышению выживаемости мышей при отравлении парацетамолом по сравнению с нативной молекулой ксимедона. Таким образом, можно предположить, что более выраженный эффект на выживаемость мышей при воздействии конъюгата ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой также мог быть связан с более высокой антиоксидантной активностью конъюгата.

Интересно отметить, что изменение уровня МДА в данном исследовании согласуется с данными, полученными при лечении ксимедоном и его конъюгатом с *L*-аскорбиновой кислотой остро токсического гепатита крыс, вызванного четыреххлористым углеродом [18].

Таким образом, в ходе проведенного исследования было показано, что введение полудозы парацетамола приводило к серьезному структурно-функциональному повреждению ткани печени мышей с нарушением биохимических показателей, что соответствует литературным данным [19]. Тем не менее, однократное внутривенное введение ксимедона способствовало значимой задержке наступления смерти мышей, а также имело тенденцию к увеличению среднего времени выживания животных. Это, по-видимому, было обусловлено гепатопротекторным эффектом ксимедона, направленным на восстановление структуры и биохимических параметров функционального состояния печени. При этом, конъюгат ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой оказал более выраженный эффект по сравнению с исходной молекулой ксимедона. Данный эффект, по-видимому, был связан не только с восстановлением биохимических параметров крови, но также с более выраженной антиоксидантной активностью конъюгата ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой в ткани печени.

Гепатопротекторный эффект ксимедона, возможно, был обусловлен изменением активности метаболизма клеток и ускорением переработки токсичного метаболита парацетамола NAPQI. Из литературы известно, что ксимедон способен влиять на активность аденилатциклазы и уровень сАМР в клетках [20]. В свою очередь изменение уровня вторичного посредника сАМР может приводить к различным биологическим эффектам, в том числе модулировать процессы воспаления, пролиферации/апоптоза и метаболизма клеток [21]. При этом, конъюгат ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой способствовал усилению гепатопротекторных свойств нативной молекулы.

Предположительно, в результате получения молекулы конъюгата ксимедона и *L*-аскорбиновой кислоты повышается биодоступность соединения. Ускорение преодоления гематоканевых барьеров молекулой ксимедона в комплексе с *L*-аскорбиновой кислотой, возможно, могло осуществляться при взаимодействии с клеточными транспортерами *L*-аскорбиновой кислоты [22]. Кроме того, известно, что ассоциация различных молекул с аскорбиновой кислотой может повышать их биологический эффект и биодоступность [23, 24]. Показано также, что *L*-аскорбиновая кислота сама по себе обладает гепатопротекторными свойствами [25] и могла сыграть роль в обеспечении усиления защитного

эффекта ксимедона. Однако из литературных данных известно [26], что в моделях отравления парацетамолом *L*-аскорбиновая кислота проявляет положительный эффект только в дозах, превышающих 1000 мг/кг либо в меньших дозах, но в виде жирорастворимой формы *L*-аскорбиновой кислоты – аскорбилпальмитата [27]. Из чего следует, что в форме конъюгата ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой, эффективного в дозах от 21 мг/кг, гепатопротекторные свойства аскорбиновой кислоты существенно усиливаются.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ксимедон и его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой проявляют гепатопротекторный эффект при лекарственных поражениях печени, повышая выживаемость животных после отравления полудозой парацетамола. Гепатопротекторный эффект данных соединений проявляется в сохранении архитектуры и функционального состояния ткани печени, в том числе происходит восстановление биохимических параметров цитолиза клеток печени – аланинаминотрансферазы и маркера перекисного окисления липидов – малонового диальдегида. Конъюгат ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой проявляет более выраженные гепатопротекторные свойства по сравнению с исходным соединением.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Животных содержали в соответствии с положениями руководства по доклиническим испытаниям под редакцией А.Н. Миронова [28] при свободном доступе к корму и воде и 12-часовом световом дне, регулируемом автоматически. Все исследования и протоколы по работе с животными были одобрены Комиссией по Биэтике ФИЦ КазНЦ РАН (Протокол № 24/1 от 4 октября 2024 года).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках финансирования Государственного задания № 122011800131-8 Федерального исследовательского центра «Казанского научного центра Российской академии наук».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

- Allison, R., Guraka, A., Shawa, I. T., Tripathi, G., Moritz, W., Keramanizadeh, A. (2023). Drug induced liver injury—a 2023 update. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, **26**(8), 442-467. DOI: 10.1080/10937404.2023.2261848
- Li, X., Tang, J., Mao, Y. (2022) Incidence and risk factors of drug-induced liver injury. *Liver International*, **42**(9), 1999-2014. DOI: 10.1111/liv.15262
- Ivashkin, V.T., Baranovsky, A.Yu., Raikhelson, K.L., Palgova, L.K., Maevskaya, M.V., Kondrashina, E.A., Marchenko, N.V., Nekrasova, T.P., Nikitin, I.G. (2019) Drug-Induced Liver Injuries (Clinical Guidelines for Physicians). *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, **29**(1), 85-115. DOI: 10.22416/1382-4376-2019-29-1-101-131
- Devvarbhavi, H., Asrani, S.K., Arab, J.P., Nartey, Y.A., Pose, E., Kamath, P.S. (2023) Global burden of liver disease: 2023 update. *Journal of hepatology*, **79**(2), 516-537. DOI: 10.1016/j.jhep.2023.03.017
- Bavia, L., Guiloski, I.C., Carvalho Carneiro, M., Prodocimo, M.M. (2023). Different mice strains in biomarker responses to toxic agents: the example

- of acetaminophen. In *Biomarkers in Toxicology* (V.B. Patel, V.R. Preedy, R. Rajendram eds.). Springer, Cham, pp. 1111-1132. DOI: 10.1007/978-3-031-07392-2_78
6. Jaeschke, H., Akapko, J.Y., Umbaugh, D.S., Ramachandran, A. (2020) Novel therapeutic approaches against acetaminophen-induced liver injury and acute liver failure. *Toxicological Sciences*, **174**(2), 159-167. DOI: 10.1093/toxsci/kfaa002
7. Bibik E.Yu., Shipilova N.V., Krivokolysko B.S., Semenid E.A., Burdeynaya A.A. (2019) Features of the pharmacological properties of modern hepatoprotectors. *Morfologicheskij al'manax imeni V.G. Koveshnikova*, **17**(4), 101-110.
8. Natarajan, R., Anthoni Samy, H.N., Sivaperuman, A., Subramani, A. (2023) Structure-activity relationships of pyrimidine derivatives and their biological activity-a review. *Medicinal Chemistry*, **19**(1), 10-30. DOI: 10.2174/1573406418666220509100356
9. Vyshatakalyuk, A.B., Semenov, V.E., Zobov, V.V., Galyametdinova, I.V., Gumarova, L.F., Parfenov, A.A., Nazarov, N.G., Lenina, O.A., Kondrashova, S.A., Latypov, Sh.K., Cherepnev, G.V., Shashyn, M.S., Reznik, V.S. (2017) Synthesis and primary evaluation of the hepatoprotective properties of novel pyrimidine derivatives. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **43**(5), 604-611. DOI: 10.1134/S106816201704015X
10. Reznik, V.S., Pashkurov, N.G. (1966) Reactions of pyrimidinols and pyrimidinethiols with 2-chloroethanol and with 2-chloro-1-propanol. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of Chemical Science*, **15**(9), 1554-1557. DOI: 10.1007/BF00848915
11. Maes, M., Vinken, M., Jaeschke, H. (2016) Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. *Toxicology and applied pharmacology*, **290**, 86-97. DOI: 10.1016/j.taap.2015.11.016
12. McGill, M.R., Williams, C.D., Xie, Y., Ramachandran, A., Jaeschke, H. (2012) Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*, **264**(3), 387-394. DOI: 10.1016/j.taap.2012.08.015
13. Pavlova, O.N., Gulenko, O.N., Karimova, R.G., Boriskin, P.V., Devyatkin, A.A., Nikitin, A.G., Toropovskiy, A. N. (2019) Interrelation of the distribution of concentration of the little dialdehyde in the serum of the blood and tissues of small animals. *Scientific Notes Kazan Bauman State Academy of Veterinary Medicine*, **238**(2), 150-154. DOI: 10.31588/2413-4201-1883-238-2-150-154
14. Kane, A.E., Mitchell, S.J., Mach, J., Huizer-Pajkos, A., McKenzie, C., Jones, B., Cogger, V., Le Couteur, D.G., de Cabo, R., Hilmer, S.N. (2016) Acetaminophen hepatotoxicity in mice: effect of age, frailty and exposure type. *Experimental gerontology*, **73**, 95-106. DOI: 10.1016/j.exger.2015.11.013
15. Kalas, M.A., Chavez, L., Leon, M., Taweasedt, P.T., Surani, S. (2021) Abnormal liver enzymes: A review for clinicians. *World journal of hepatology*, **13**(11), 1688-1698. DOI: 10.4254/wjh.v13.i11.1688
16. Serfilippi, L.M., Stackhouse Pallman, D.R., Russell, B., Spainhour, C.B. (2003). Serum clinical chemistry and hematology reference values in outbred stocks of albino mice from three commonly used vendors and two inbred strains of albino mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, **42**(3), 46-52.
17. Tsikas, D. (2017) Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical biochemistry*, **524**, 13-30. DOI: 10.1016/j.ab.2016.10.021
18. Vyshatakalyuk, A.B., Semenov, V.E., Sudakov, I.A., Bushmeleva, K.N., Gumarova, L.F., Parfenov, A.A., Nazarov, N.G., Galyametdinova, I.V., Zobov, V.V. (2018) Xymedon conjugate with biogenic acids. Antioxidant properties of a conjugate of Xymedon with l-ascorbic acid. *Russian Chemical Bulletin*, **67**(4), 705-711. DOI: 10.1007/s11172-018-2126-3
19. Randle, L.E., Goldring, C.E.P., Benson, C.A., Metcalfe, P.N., Kitteringham, N.R., Park, B.K., Williams, D.P. (2008) Investigation of the effect of a panel of model hepatotoxins on the Nrf2-Keap1 defence response pathway in CD-1 mice. *Toxicology*, **243**(3), 249-260. DOI: 10.1016/j.tox.2007.10.011
20. Slabnov Y.D., Cherepnev G.V., Karimova F.G., Garaev R.S. (1998) Effect of pyrimidine derivatives on adenylate cyclase system of immunocompetent cell regulation in vitro. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **125**(6), 588-590. DOI: 10.1007/bf02445248.
21. Beavo, J.A., Brunton, L.L. (2002) Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century. *Nature reviews Molecular cell biology*, **3**(9), 710-717. DOI: 10.1038/nrm911
22. Rivas, C.I., Zúñiga, F.A., Salas-Burgos, A., Mardones, L., Ormazabal, V., Vera, J.C. (2008) Vitamin C transporters. *Journal of Physiology and Biochemistry*, **64**(4), 357-375. DOI: 10.1007/BF03174092
23. Harrison, F.E., May, J.M. (2009) Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radical Biology and Medicine*, **46**(6), 719-730. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.018
24. Moteki, H., Kimura, M., Sunaga, K., Tsuda, T., Ogihara, M. (2013) Signal transduction mechanism for potentiation by α 1- and β 2-adrenoceptor agonists of L-ascorbic acid-induced DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes. *European journal of pharmacology*, **700**(1-3), 2-12. DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.12.010
25. Kimura, M., Moteki, H., Uchida, M., Natsume, H., Ogihara, M. (2014) L-ascorbic acid-and L-ascorbic acid 2-glucoside accelerate in vivo liver regeneration and lower serum alanine aminotransferase activity in 70% partially hepatectomized rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **37**(4), 597-603. DOI: 10.1248/bpb.b13-00839
26. Roomi, M.W., Kalinovskiy, T., Ivanov, V., Rath, M., Niedzwiecki, A. (2008) A nutrient mixture prevents acetaminophen hepatic and renal toxicity in ICR mice. *Human & experimental toxicology*, **27**(3), 223-230. DOI: 10.1177/0960327108090276
27. Hargreaves, R.J., Evans, J.G., Pelling, D., Butterworth, K.R. (1982) Studies on the effects of l-ascorbic acid on acetaminophen-induced hepatotoxicity: II. An in vivo assessment in mice of the protection afforded by various dosage forms of ascorbate. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **64**(3), 380-392. DOI: 10.1016/0041-008X(82)90234-4
28. Mironov, A.N., Bunyatyan, N.D., Vasil'ev, A.N., Verstakova, O.L., Zhuravleva, M.V., Lepakhin, V.K., Korobov, N.V., Merkulov, V.A., Orekhov, S.N., Sakaeva, I.V., Uteshev, D.B., Yavorskii, A.N. (2012) Rukovodstvo po Provedeniyu Doklinalicheskikh Issledovaniy Lekarstvennykh Sredstv [Guidelines on Preclinical Trials of Medicinal Agents]. Grif i K, Moscow, 944 pp.

Поступила: 08.10.2024
 После доработки: 27.10.2024
 Принята к публикации: 30.10.2024

HEPATOPROTECTIVE EFFECT OF XYMEDON AND ITS CONJUGATE WITH *L*-ASCORBIC ACID DURING POISONING OF MICE WITH A SEMILETHAL DOSE OF PARACETAMOL

*G.P. Belyaev**, *A.B. Vyshtakalyuk*, *A.A. Parfenov*, *I.V. Galyametdinova*, *V.E. Semenov*, *V.V. Zobov*

Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
8 Arbuzov str., Kazan, 420088 Russia; *e-mail: gregoir4@gmail.com

There is currently an urgent need to develop effective therapies aimed at preventing the consequences of drug-induced liver injury (DILI). In this context, our study focused on assessing the hepatoprotective effect of pyrimidine derivatives of xymedon (1,2-dihydro-4,6-dimethyl-1-(2-hydroxyethyl)-pyrimidin-2-one) and its conjugate with *L*-ascorbic acid in a mouse model of paracetamol (acetaminophen) poisoning. ICR (CD-1) mice were treated with a single oral LD₅₀ dose of paracetamol (425 mg/kg), followed by intraperitoneal injections of various doses of the test compounds at various doses half an hour later. The animals' survival was monitored for 5 days. On the day 6, biochemical and histopathological evaluations of the effects of the test compounds were conducted. Serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities were analyzed. Malondialdehyde (MDA) levels in blood and liver tissue were also determined. Xymedon attenuated the toxic effects of paracetamol on the liver, improving animal survival and enhancing the macro- and micro-structure of the liver, normalizing the biochemical indicator of liver condition ALT and the serum marker of oxidative stress MDA. The conjugate of xymedon with *L*-ascorbic acid exhibited a more pronounced hepatoprotective effect compared to the native xymedon molecule.

Key words: pyrimidine derivatives; xymedon; hepatoprotectors; paracetamol; acetaminophen; drug-induced liver injury

FUNDING

This study was performed within the framework of the state assignment № 122011800131-8 of the Federal Research Center «Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences».

Received: 08.10.2024, revised: 27.10.2024, accepted: 30.10.2024