

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 591.8+615.275.4

doi: 10.26907/2542-064X.2023.2.175-189

АНТИФИБРОЗНЫЙ ЭФФЕКТ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА КСИМЕДОНА И ЕГО КОНЬЮГАТА С *L*-АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТОЙ

*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 ФИЦ Казанский науч-
ный центр РАН, 420088 Казань, Россия*

Аннотация

Целью настоящего исследования стало изучение противофиброзных свойств производных пириимидина препарата Ксимедон, далее соединение (I), и конъюгата Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой, далее соединение (II), на модели экспериментального фиброза крыс при профилактической схеме введения.

Экспериментальный фиброз вызывали у крыс линии Wistar четыреххлористым углеродом (5% масляный раствор в дозе 0.2 мл/кг перорально, 2 раза в неделю) в сочетании с этанолом (5% раствор в питьевой воде, при свободном доступе), на фоне введения которых осуществляли профилактическое введение исследуемых соединений (I) и (II). Оценку фибротических изменений в печени проводили гистологическими методами при окрашивании по Ван-Гизону. Эффективность влияния веществ на состояние печени и клиническое состояние животных также оценивали по биохимическим показателям сыворотки крови.

В результате исследования было показано, что под действием соединений (I) и (II) наблюдалось снижение выявляемых областей фиброзных образований втрое, а также уменьшение признаков стеатозных и некротических изменений в ткани печени экспериментальных животных по сравнению с контрольной группой; наблюдалась нормализация биохимических показателей крови. При этом соединение (II) проявило более выраженный эффект.

Таким образом, на модели экспериментального фиброза крыс выявлен антифиброзный эффект производных пириимидина Ксимедона и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой.

Ключевые слова: фиброз, антифиброзный эффект, коллаген, ксимедон, четыреххлористый углерод.

Введение

Фиброз печени – это хронический воспалительный процесс, характеризующийся избыточным отложением волокон внеклеточного матрикса (в том числе коллагена), что приводит к печеночной недостаточности [1]. В современном мире прогрессирующий фиброз печени (и цирроз – последняя стадия фиброза) является одной из основных проблем здравоохранения и приводит к смерти около 1 миллиона человек в год. Кроме того, некоторыми специалистами про-

гнозируется увеличение количества таких заболеваний печени [2]. Несмотря на прогресс в изучении механизмов и способов лечения фиброза печени, до сих пор не существует удовлетворительной антифиброзной терапии [3]. Именно поэтому поиск новых способов лечения хронических заболеваний печени остается важной задачей.

В данном исследовании агентом, вызывающим повреждение печени, является четыреххлористый углерод (CCl_4), механизм действия которого связан с образованием свободнорадикальных метаболитов, вызывающих перекисное окисление липидов клеточной мембраны и дальнейшее повреждение клеток [4]. Кроме того, для имитации алкогольного поражения печени человека использовался этанол, токсичные метаболиты которого также способствуют оксидативному стрессу [5].

Объектом данного исследования были производные пиримидина: лекарственный препарат Ксимедон (соединение (I)) (1,2-дигидро-2-оксо-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)пиримидин), а также конъюгат Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой (соединение (II)), структурная формула которых представлена в формуле (рис. 1).

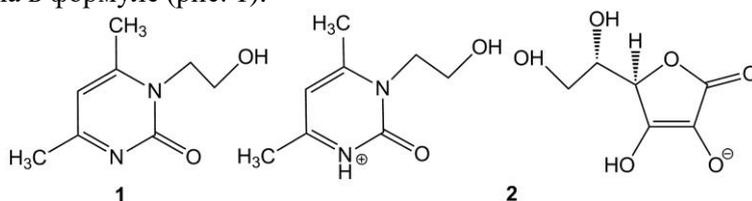


Рис. 1. Структурные формулы изучаемых соединений. 1 – Ксимедон (соединение (I)), 2 – конъюгат Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой (соединение (II))

Таким образом, в настоящем исследовании проведена оценка влияния производных пиримидинов соединения (I) и соединения (II) на процесс фиброгенеза ткани печени крыс при хроническом токсическом повреждении CCl_4 и этанолом. Мы предполагаем, что противовоспалительный и регенерирующий эффекты соединений (I) и (II), показанные ранее на острых моделях повреждения ткани печени [6], будут способствовать ингибированию развития фиброза в ткани печени. Результаты, полученные в ходе исследования, подтвердили наше предположение.

1. Материалы и методы

1.1. Синтез соединений. Ксимедон (1,2-Дигидро-4,6-диметил-1-(2-оксиэтил)-пиримидин-2-он) и конъюгат Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой были синтезированы по описанным ранее методикам [7, 8].

1.2. Схема эксперимента. Эксперимент проводился на 24 взрослых самках крыс линии Wistar массой 200–250 г., полученных из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН (Пушино). Животных содержали в соответствии с положениями [9, 10] в стандартных условиях вивария с 12-часовым световым днем и неограниченным доступом к еде и воде. Животных кормили комплексным кормом, изготовленным в соответствии со спецификацией (белок 22%, клетчатка не более 4%, жир не более 5%, зола не более 9%, влажность не

более 13.5%, калорийность 295 ккал на 100 г. Все исследования и протоколы по работе с животными были одобрены локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (протокол № 4 от 18 мая 2017 года).

Крысы случайным образом были поделены на 4 группы: группа интактного контроля ($n = 6$), группа контроля ($n = 6$), группа соединения (I) ($n = 6$) и группа соединения (II) ($n = 6$). Схема эксперимента представляла собой профилактическое введение соединений (I) и (II) каждый день на протяжении 1 недели. Соединение (I) и (II) вводили внутривентрально в дозе 0.24 мг/кг и 0.5 мг/кг соответственно. Растворы соединений для инъекций готовились непосредственно перед введением. В контрольной группе вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Затем, начиная со 2 по 8 неделю эксперимента, вызывали хроническое повреждение печени введением четыреххлористого углерода и этанола (CCl_4 +этанол) по нижеописанной схеме. 5% масляный раствор CCl_4 в дозе 0.2 мл/кг вводили животным перорально 2 раза в неделю. Для имитации алкогольного повреждения печени человека [5], а также потенцирования действия CCl_4 , со 2 по 8 неделю крысам давали 5% водный раствор этилового спирта через поилки при свободном доступе. При этом продолжали ежедневно вводить соединения (I) и (II) и физиологический раствор в контрольной группе. Группа интактного контроля оставалась без воздействий на протяжении всего опыта. По окончании введения веществ, животных подвергали эвтаназии и проводили забор материала.

1.3. Анализ крови. Из образцов крови получали сыворотку путем центрифугирования (3 000 об/мин 10 мин), которую исследовали на автоматическом биохимическом анализаторе АРД 200 («АРД», Россия). Была проведена оценка таких показателей, как аланинаминотрансфераза (АлАТ), аспартатаминотрансфераза (АсАТ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ).

1.4. Гистологический анализ. Образцы печени для гистологического анализа подготавливали по стандартным гистологическим методикам. Срезы печени толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и по методу Ван-Гизона. Морфометрический анализ срезов печени проводили на прямом световом микроскопе Nikon H550S (Nikon, Япония) с программным обеспечением NIS-Elements Basic Research.

Качественную оценку фиброза проводили по методу METAVIR [11], где $F0$ – отсутствие фиброза, $F1$ – звездчатое увеличение портального тракта, но без образования перегородок, $F2$ – увеличение воротного тракта с редким образованием перегородок, $F3$ – многочисленные перегородки без цирроза, а $F4$ – цирроз. Степень фиброза выражали как среднее значение десяти полей, взятых с каждого предметного стекла.

Количественная оценка фиброза (% фиброза) осуществлялась как соотношение площади коллагена к площади видимой области ткани печени на микроскопических изображениях с использованием методов анализа цифровых изображений, как описано в [11]. К каждому образцу изображения применялась интерактивная пороговая обработка, чтобы выделить контрастно окрашенный коллаген. Для повышения контрастности изображения срезы окрашивались по методу Ван-Гизона без использования гематоксилина Вейгерта, таким образом, контрастно окрашенные красные волокна коллагена обнаруживались на жел-

том фоне ткани. Для измерения фиброза (%) использовали увеличение 40х, изучая по 10 областей печени от одной крысы.

1.5. Статистический анализ. Все цифровые значения в статье представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($\bar{X} \pm SE$). Нормальность распределения определяли по критерию Колмогорова – Смирнова. В случае нормальности распределения для статистического анализа полученных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки, при этом уровень значимости при $p < 0.05$ считался значимым. Для анализа признаков, распределение которых отличается от нормального, использовали непараметрический критерий Краскела – Уоллиса и попарное сравнение по тесту Манна – Уитни с поправкой Бонферрони для множественного сравнения, при этом уровень значимости при $p < 0.0085$ считался значимым. Статистический анализ проводили в программе SPSS Statistics (IBM, США).

2. Результаты

2.1. Оценка массы тела и массового коэффициента печени. В процессе проведения эксперимента у всех четырех групп крыс наблюдался равномерный прирост массы тела. Прибавка массы тела животных за два месяца эксперимента составила в среднем $10.6 \pm 0.5\%$.

В ходе исследования массового коэффициента печени крыс (рис. 2) было показано, что массовый коэффициент печени контрольной группы после воздействия CCl_4 + этанол увеличился ($p = 0.011$) ($3.3 \pm 0.1\%$) по сравнению с интактным контролем ($2.6 \pm 0.0\%$).

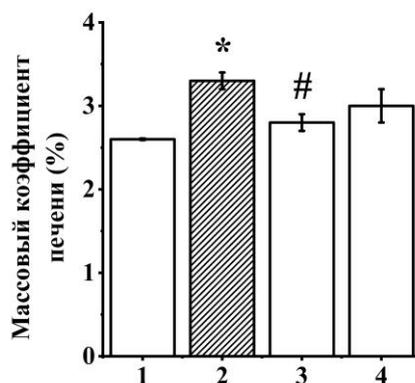


Рис. 2. Влияние соединений (I) и (II) на массовый коэффициент печени крыс. 1 – группа интактного контроля, 2 – группа контроля, 3 – группа соединения (I), 4 – группа соединения (II). * – различия с интактной группой достоверны, $p < 0.05$; # – различия с контрольной группой достоверны, $p < 0.05$

В группе крыс, получавших дополнительно к воздействию CCl_4 + этанол соединение (I), показано снижение ($p = 0.047$) массового коэффициента печени ($2.8 \pm 0.1\%$) по сравнению с контрольной группой. При этом в группе крыс, получавших совместно с CCl_4 + этанол соединение (II), мы также наблюдаем

тенденцию к снижению ($p = 0.174$) массового коэффициента печени ($3.0 \pm 0.2\%$) по сравнению с контролем.

2.2. Оценка биохимических показателей сыворотки крови. В данном исследовании в результате введения CCl_4 + этанол мы наблюдаем изменения биохимических маркеров повреждения печени (рис. 3). Показано увеличение ($p = 0.004$) показателей повреждения гепатоцитов АлАТ в 1.8 раз и увеличение ($p = 0.047$) АсАТ в 1.9 раза по сравнению с интактным контролем (105.8 ± 7.3 относительно 58.3 ± 2.8 Ед/л для АлАТ; 210.8 ± 32.8 относительно 98.7 ± 0.9 Ед/л для АсАТ). В случае профилактического введения соединений (I) и (II) наблюдается снижение ($p = 0.026$) для показателя АлАТ при введении соединения (II) показателей АлАТ и АсАТ по сравнению с контролем (88.5 ± 8.4 и 75.0 ± 3.5 Ед/л соответственно для АлАТ; 153.3 ± 21.4 и 122.6 ± 9.7 Ед/л соответственно для АсАТ). Что касается маркера общего повреждения клеток ЛДГ, наблюдается резкое увеличение ($p = 0.026$) уровня ЛДГ в 4.9 раза в контрольной группе после воздействия CCl_4 +этанол по сравнению с интактным контролем (2732.5 ± 667.0 против 559.3 ± 148.4 Ед/л). В случае воздействия соединений (I) и (II) уровень ЛДГ был ниже ($p = 0.036$ и $p = 0.018$ соответственно), чем в контроле (1044.8 ± 151.8 и 764.0 ± 181.0 Ед/л соответственно).

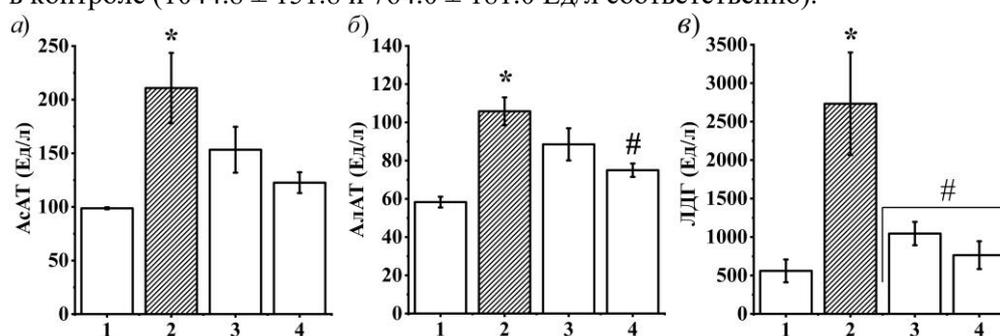


Рис. 3. Влияние соединений (I) и (II) на маркеры повреждения клеток: а) активность аспаратаминотрансферазы (АсАТ), б) активность аланинаминотрансферазы (АлАТ), в) активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ). 1 – группа интактного контроля, 2 – группа контроля, 3 – группа соединения (I), 4 – группа соединения (II). * – различия с интактной группой достоверны, $p < 0.05$; # – различия с контрольной группой достоверны, $p < 0.05$

2.3. Оценка общего состояния ткани печени. Оценка общего состояния ткани печени (рис. 4) проводилась при помощи стандартной окраски гематоксилин-эозином. Были изучены степень развития стеатоза и наличие других паренхиматозных дистрофий. Для крыс интактной группы показано, что морфология ткани печени не изменена, гепатоциты нормальной формы. На фоне воздействия CCl_4 + этанол в контрольной группе архитектура ткани печени была нарушена, гепатоциты часто неправильной формы, отекающие, сильно модифицированы. Среди патологий клеток печени преобладает гидропическая дистрофия, а также некротические повреждения (такие, как баллонная дистрофия, апоптоз клеток и кариорексис), кроме того, встречается жировое перерождение (стеатоз). В ткани печени опытных групп, получавших соединения (I) и (II), в отличие от контрольной группы сохраняется структура дольки печени, больше областей с нормальными (полноценными) гепатоцитами. Среди дис-

трофий чаще встречается стеатоз, в отличие от контроля, где существенно больше некротических повреждений.

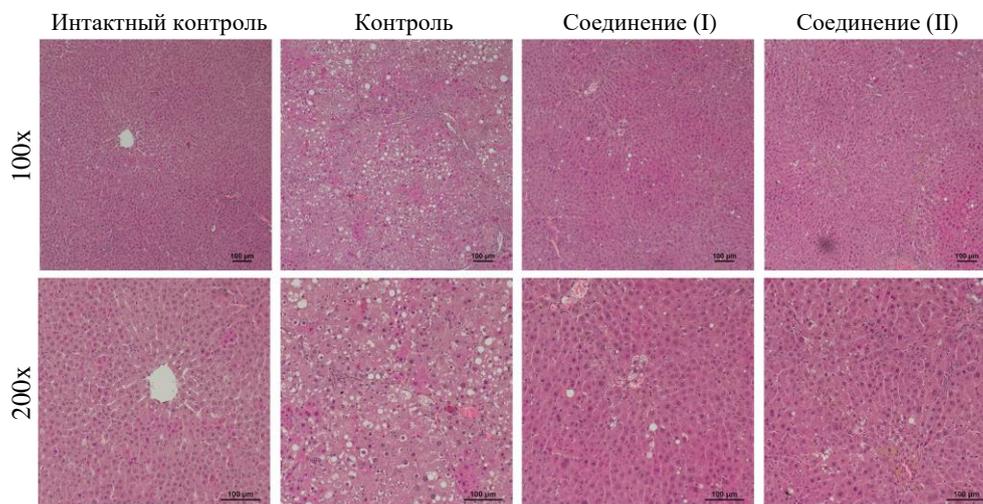


Рис. 4. Влияние соединений (I) и (II) на морфологию ткани печени, окраска гематоксилин-эозином, увеличение 100x и 200x

2.4. Оценка фиброза ткани печени. Качественную оценку фиброза ткани печени (рис. 5) проводили по системе METAVIR. Показано, что в группе интактного контроля портальные тракты не увеличены, что соответствует стадии *F0*. У крыс контрольной группы, получавших CCl_4 + этанол, в ткани печени крыс наблюдаются многочисленные перегородки без цирроза или (реже) цирроз, характеризующийся образованием ложных долек, что соответствует стадии *F3–F4*. В ткани печени опытных групп наблюдается коллаген без образования септ или (реже) с единичными септами, что соответствует стадии фиброза *F1–F2*.

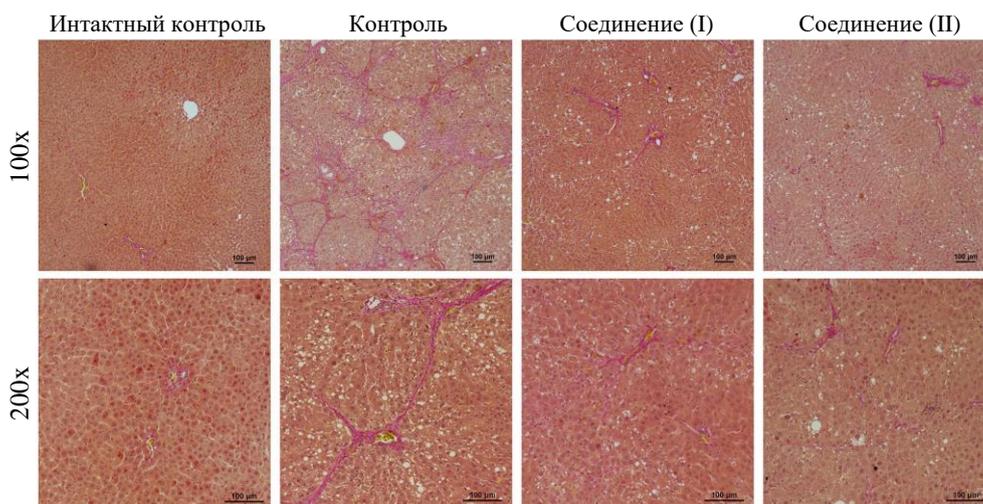


Рис. 5. Влияние соединений (I) и (II) на развитие коллагеновых волокон (красного цвета) в ткани печени, окраска по методу Ван-Гизона, увеличение 100x и 200x

В результате количественной оценки фиброза (рис. 6, 7) было показано, что при хроническом воздействии CCl_4 + этанол в контрольной группе процент площади коллагена увеличивается ($p < 0.0001$) в 5.7 раз по сравнению с интактным контролем (6.3 ± 0.9 и $1.1 \pm 0.1\%$ соответственно), что подтверждает развитие фибротических изменений. Однако в группе крыс, получавших дополнительно к воздействию CCl_4 + этанол соединения (I) и (II), показано снижение ($p < 0.0001$) площади коллагена в ткани печени в 3 раза по сравнению с контрольной группой (2.2 ± 0.1 и $2.1 \pm 0.1\%$ соответственно), что говорит о торможении развития фибротических изменений при профилактическом введении данных соединений.

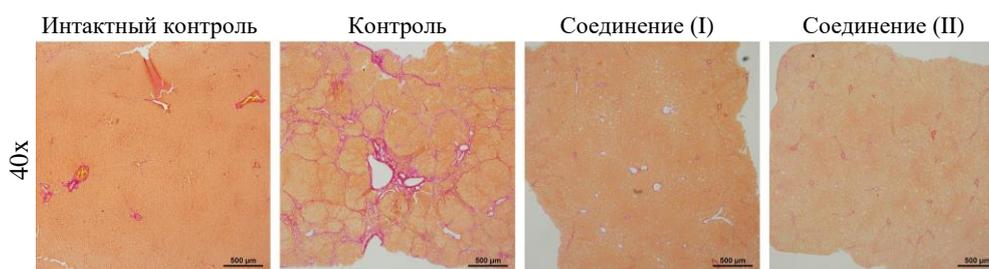


Рис. 6. Влияние соединений (I) и (II) на развитие коллагеновых волокон (красного цвета) в ткани печени, окраска по методу Ван-Гизона в отсутствие гематоксилина Вейгерта для контрастирования окраски коллагена, увеличение 40х.

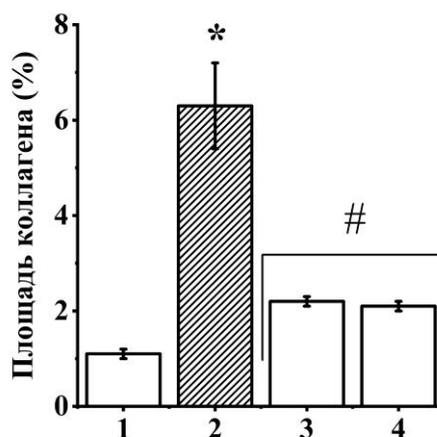


Рис. 7. Влияние соединений (I) и (II) на процент площади коллагена в ткани печени крыс. 1 – группа интактного контроля, 2 – группа контроля, 3 – группа соединения (I), 4 – группа соединения (II). * – различия с интактной группой достоверны, $p < 0.0085$; # – различия с контрольной группой достоверны, $p < 0.0085$

3. Обсуждение

В проведенном исследовании в результате воздействия гепатотоксинов по использованной нами схеме введения (CCl_4 + этанол) выявлены нарушения, сопоставимые с приведенными литературными данными, описывающими развитие повреждений печени у животных при моделировании острых и хрониче-

ских заболеваний, такие как увеличение массового коэффициента печени, существенное отклонение от нормы биохимических показателей сыворотки крови [12], различные гистопатологические изменения, а также увеличение экспрессии коллагена в ткани печени [13].

На фоне профилактического введения соединений (I) и (II) наблюдалось значительное уменьшение признаков развития фиброза, проявляющееся в снижении детекции коллагена в ткани печени крыс примерно втрое. Кроме того, под действием исследованных соединений наблюдалась нормализация биохимических показателей – снижение маркеров повреждения клеток АлАТ, АсАТ и ЛДГ, что свидетельствует об уменьшении некротических и деструктивных изменений и значительном улучшении функционального состояния клеток печени.

При этом соединение (II) продемонстрировало более выраженный эффект нормализации биохимических показателей в сравнении с соединением (I), что подтверждает полученные ранее данные о большей эффективности соединения (II) в протекции клеток печени при остром токсическом гепатите [8]. Более высокая эффективность соединения (II), вероятно, связана с тем, что *L*-аскорбиновая кислота усиливает биологический эффект соединения (I), так как существуют данные о влиянии *L*-аскорбиновой кислоты на усиление пролиферации гепатоцитов *in vitro* [14] и регенерацию ткани печени крыс [15]. Кроме того, известно, что конъюгация веществ с *L*-аскорбиновой кислотой повышает их биодоступность [16].

Итак, показанное в статье ингибирование развития фиброза ткани печени может объясняться тем, что изучаемое соединение (I), предположительно, воздействует на уровень аденилатциклазы и, соответственно, внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), что было показано на иммунокомпетентных клетках [17]. Известно, что цАМФ является вторичным посредником и обеспечивает проявление разнообразных биологических эффектов у различных типов клеток [18]. Кроме того, показана некоторая связь уровня цАМФ и фибротических изменений. Так, цАМФ в фибробластах снижает их пролиферативную активность [19], что в свою очередь может изменять процессы фиброгенеза в тканях. Также от уровня цАМФ может зависеть дифференцировка и активация макрофагов [20], играющих важную роль в разрешении фиброза [21]. Таким образом, противомфиброзный эффект соединений (I) и (II) предположительно может объясняться изменением уровня цАМФ и последующим влиянием на рекрутирование и активность макрофагов, а также подавлением пролиферации фибробластов.

Кроме того, известно, что в развитии фиброза важную роль играет воспалительный процесс, активирующий трансдифференцировку звездчатых клеток, превращение их в миофибробласты [1] и последующее развитие коллагена. Поэтому показанный в статье противомфиброзный эффект соединений (I) и (II) может объясняться их противовоспалительным воздействием на клетки, показанным ранее в работе [6]. В дополнение к вышеперечисленному, в предыдущей работе авторов статьи [22] показано, что при воздействии соединения (II) на ткань печени при остром токсическом гепатите, вызванном CCl_4 , происходит повышение уровня интерлейкина 10, стимулирующего апоптоз звездчатых

клеток [23], а также снижение уровня интерлейкина 13, который обладает про-фиброзным эффектом [24]. Такое влияние соединений (I) и (II) на воспалительный статус ткани печени также может объясняться влиянием соединения (I) на уровень цАМФ [17], так как показано, что изменение количества последнего регулирует уровень провоспалительных цитокинов [25], что непосредственным образом влияет на развитие фибротических изменений, из-за трансдифференцировки звездчатых клеток. Кроме того, авторами работы ранее было показано [26], что при воздействии соединения (II) уровень экспрессии α -актина гладких мышц (α -SMA) в ткани печени крыс ниже, чем в контрольной группе при моделировании острого токсического гепатита. Как известно, α -SMA является маркером образования миофибробластов, которые непосредственно участвуют в развитии фиброза и синтезе коллагена [27], что еще раз подтверждает способность соединений снижать активность звездчатых клеток и уменьшать экспрессию коллагена в ткани печени крыс.

Заключение

На экспериментальной модели фиброза печени крыс, вызванной сочетанным введением CCl_4 и этанола, при профилактической схеме введения соединений, показана антифиброзная активность производных пиримидина Ксимедона и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой. Установлено, что профилактическое введение изучаемых соединений на фоне воздействия CCl_4 и этанола приводит к снижению отложения коллагеновых волокон и сохранению структуры ткани печени, а также к поддержанию нормального функционирования гепатоцитов, что проявляется в нормализации биохимических показателей крови. Таким образом, проведенное фундаментальное исследование открывает новые возможности для использования Ксимедона и его производных в качестве эффективных соединений для лечения как острых, так и хронических заболеваний печени.

Благодарности. Работа выполнена в рамках финансирования Государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.

Литература

1. Faccioli L.A.P., Dias M.L., Paranhos B.A., dos Santos Goldenberg R.C. Liver cirrhosis: An overview of experimental models in rodents // *Life Sci.* 2022. V. 301. art. 120615. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120615.
2. Mokdad A.A., Lopez A.D., Shahrzad S., Lozano R., Mokdad A.H., Stanaway J., Murray C.J., Naghavi M. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: A systematic analysis // *BMC Med.* 2014. V. 12, No 1. art. 145. doi: 10.1186/s12916-014-0145-y.
3. Li M.-H., Feng X., Deng Ba D.J., Chen C., Ruan L.-Y., Xing Y.-X., Chen L.-Y., Zhong G.-J., Wang J.-S. Hepatoprotection of *Herpetospermum caudigerum* Wall. against CCl_4 -induced liver fibrosis on rats // *J. Ethnopharmacol.* 2019. V. 229. P. 1–14. doi: 10.1016/j.jep.2018.09.033.
4. Ben Hsouna A., Hfaiedh M., Slima S.B., Romdhane W.B., Akacha B.B., Bouterra M.T., Dhifi W., Mnif W., Brini F., Ben Saad R., Ben Salah R. Antioxidant and hepatoprotective effects of novel heteropolysaccharide isolated from *Lobularia maritima* on CCl_4 -induced

- liver injury in rats // *Food Sci. Nutr.* 2022. V. 10, No 7. P. 2271–2284. doi: 10.1002/fsn3.2836.
5. *Brol M.J., Rösch F., Schierwagen R., Magdaleno F., Uschner F.E., Manekeller S., Queck A., Schwarzkopf K., Odenthal M., Drebber U., Thiele M., Lingohr P., Plamper A., Kristiansen G., Lotersztajn S., Krag A., Klein S., Rheinwalt K.P., Trebicka J.* Combination of CCl₄ with alcoholic and metabolic injuries mimics human liver fibrosis // *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.* 2019. V. 317, No 2. P. G182–G194. doi: 10.1152/ajpgi.00361.2018.
 6. *Vyshtakalyuk A.B., Nazarov N.G., Semenov V.E., Galyametdinova I.V., Diabankana R.G.K., Porfiriev A.G., Zobov V.V.* Recovery of liver damaged by CCl₄ under treatment by conjugate of drug Xymedon with L-ascorbic acid // *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2018. V. 9, No 10. P. 4117–4126. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.9(10).4117-26.
 7. *Reznik V.S., Pashkurov N.G.* Reactions of pyrimidinols and pyrimidinethiols with 2-chloroethanol and with 2-chloro-1-propanol // *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.* 1966. V. 15, No 9. P. 1554–1557. doi: 10.1007/BF00848915.
 8. *Vyshtakalyuk 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.* Synthesis and primary evaluation of the hepatoprotective properties of novel pyrimidine derivatives // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2017. V. 43, No 5. P. 604–611. doi: 10.1134/S106816201704015X.
 9. *Миронов А.Н.* (ред.) Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 2. М.: Гриф и К, 2012, 536 с.
 10. Commission Recommendation of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes (2007/526/EC) // *OJEU.* 2007. V. L197. P. 1–89.
 11. *Arjmand A., Tsiouras M.G., Tzallas A.T., Forlano R., Manousou P., Giannakeas N.* Quantification of liver fibrosis – A comparative study // *Appl. Sci.* 2020. V. 10, No 2. art. 447. doi: 10.3390/app10020447.
 12. *Abd-Elhakim Y.M., Ghoneim M.H., Khairy M.H., Eissa S.A.* Single or combined protective and therapeutic impact of taurine and hesperidin on carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rat // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020. V. 27, No 12. P. 13180–13193. doi: 10.1007/s11356-020-07895-1.
 13. *Zheng W.V., Li Y., Cheng X., Xu Y., Zhou T., Li D., Xiong Y., Wang S., Chen Z.* Uridine alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by regulating the activity of liver-related cells // *J. Cell. Mol. Med.* 2021. V. 26, No 3. P. 840–854. doi: 10.1111/jcmm.17131.
 14. *Moteki H., Kimura M., Sunaga K., Tsuda T., Ogihara M.* 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 // *Eur. J. Pharmacol.* 2013. V. 700, No 1-3. P. 2–12. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.12.010.
 15. *Kimura M., Moteki H., Uchida M., Natsume H., Ogihara M.* L-ascorbic acid- and L-ascorbic acid 2-glucoside accelerate *in vivo* liver regeneration and lower serum alanine aminotransaminase activity in 70% partially hepatectomized rats // *Biol. Pharm. Bull.* 2014. V. 37, No 4. P. 597–603. doi: 10.1248/bpb.b13-00839.
 16. *Luo Q., Jiang M., Kou L., Zhang L., Li G., Yao Q., Shang L., Chen Y.* Ascorbate-conjugated nanoparticles for promoted oral delivery of therapeutic drugs via sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1) // *Artif. Cells, Nanomed., Biotechnol.* 2017. V. 46, No 1. P. 198–208. doi: 10.1080/21691401.2017.1417864.

17. *Slabnov Y.D., Cherepnev G.V., Karimova F.G., Garaev R.S.* Effect of pyrimidine derivatives on adenylate cyclase system of immunocompetent cell regulation *in vitro* // Bull. Exp. Biol. Med. 1998. V. 125, No 6. P. 588–590. doi: 10.1007/bf02445248.
18. *Ladilov Y., Appukuttan A.* Role of soluble adenylyl cyclase in cell death and growth // BBA, Biochim. Biophys. Acta., Mol. Basis Dis. 2014. V. 1842, No 12. P. 2646–2655. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.034.
19. *Borland G., Smith B.O., Yarwood S.J.* EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP // Br. J. Pharmacol. 2009. V. 158, No 1. P. 70–86. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00087.x.
20. *Tavares L.P., Negreiros-Lima G.L., Lima K.M., E Silva P.M.R., Pinho V., Teixeira M. M., Sousa L.P.* Blame the signaling: Role of cAMP for the resolution of inflammation // Pharmacol. Res. 2020. V. 159. art. 105030. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105030.
21. *Strickland J.D., Copple B.L.* Chapter Six – Modulation of macrophage phenotype to treat liver fibrosis—Current approaches and future possibilities // Advances in Pharmacology. Vol. 91: Advances in immunopharmacology. Copple B.L., Rockwell C.E. (Eds.). Acad. Press, 2021. P. 213–228. doi: 10.1016/bs.apha.2021.03.001.
22. *Parfenov A., Belyaev G., Vyshtakalyuk A., Gumarova L., Khasanshina L., Semenov V., Zobov V.* The influence of Xymedon conjugate with L-ascorbic acid on initial development of fibrosis in the rat liver after toxic exposure of CCl₄ // Eur. J. Clin. Invest. 2021. V. 51, No S1. P. 78.
23. *Chen D., Chen J., Chen Y., Chen F., Wang X., Huang Y.* Interleukin-10 regulates starvation-induced autophagy through the STAT3-mTOR-p70s6k axis in hepatic stellate cells // Exp. Biol. Med. 2022. V. 247, No 10. P. 832–841. doi: 10.1177/15353702221080435.
24. *Xu Y., Liang P., Bian M., Chen W., Wang X., Lin J., Shang M., Qu H., Wu Z., Huang Y., Yu X.* Interleukin-13 is involved in the formation of liver fibrosis in *Clonorchis sinensis*-infected mice // Parasitol. Res. 2016. V. 115, No 7. P. 2653–2660. doi: 10.1007/s00436-016-5012-7.
25. *Elnagdy M., Barve S., McClain C., Gobejishvili L.* cAMP signaling in pathobiology of alcohol associated liver disease // Biomolecules. 2020. V. 10, No 10. art. 1433. doi: 10.3390/biom10101433.
26. *Семенов В.Э.* Средство гепатопротекторного действия. Патент РФ No. 2590952, 2016.
27. *Rockey D.C., Du Q., Shi Z.* Smooth muscle α -actin deficiency leads to decreased liver fibrosis via impaired cytoskeletal signaling in hepatic stellate cells // Am. J. Pathol. 2019. V. 189, No 11. P. 2209–2220. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.07.019.

Поступила в редакцию 29.06.2022

Принята к публикации 07.10.2022

Беляев Григорий Павлович – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН

ул. Академика Арбузова, дом 8, г. Казань, 420088, Россия

E-mail: gregoir4@gmail.com

Вышкалюк Александра Борисовна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории химико-биологических исследований

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН

ул. Академика Арбузова, дом 8, г. Казань, 420088, Россия

E-mail: alex.vysh@mail.ru

Парфенов Андрей Анатольевич – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории химико-биологических исследований

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН

ул. Академика Арбузова, дом 8, г. Казань, 420088, Россия

E-mail: *aimt66@gmail.com*

Галяметдинова Ирина Владимировна – научный сотрудник лаборатории химии нуклеотидных оснований

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН

ул. Академика Арбузова, дом 8, г. Казань, 420088, Россия

E-mail: *iragal2009@yahoo.com*

Семенов Вячеслав Энгельсович – доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией химии нуклеотидных оснований

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН

ул. Академика Арбузова, дом 8, г. Казань, 420088, Россия

E-mail: *sve@iopc.ru*

Зобов Владимир Васильевич – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией химико-биологических исследований

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН

ул. Академика Арбузова, дом 8, г. Казань, 420088, Россия

E-mail: *vz30608@mail.ru*

ISSN 2542-064X (Print)

ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI

(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2023, vol. 165, no. 2, pp. 175–189

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2023.2.175-189

**Antifibrotic Effect of Pyrimidine Derivatives of Xymedon
and Its Conjugate with L-Ascorbic Acid**

*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, Kazan, 420088 Russia*

E-mail: **gregoir4@gmail.com*, ***alex.vysh@mail.ru*, ****aimt66@gmail.com*,
*****iragal2009@yahoo.com*, ******sve@iopc.ru*, ******vz30608@mail.ru*

Received June 29, 2022; Accepted October 7, 2022

Abstract

This article considers the antifibrotic properties of pyrimidine derivatives of the drug Xymedon (compound (I)) and its conjugate with L-ascorbic acid (compound (II)) in an experimental rat model of fibrosis with a preventive administration scheme.

Experimental fibrosis was induced in Wistar rats given carbon tetrachloride (5% oil solution, 0.2 mL/kg orally twice a week) in combination with ethanol (5% solution in drinking water, free access) against compounds (I) and (II), both administered preventively. Fibrotic changes in the liver were detected by Van Gieson's staining. The effects of the studied compounds on the liver and clinical condition of rats were evaluated through serum biochemical parameters.

The treatment of rats with compounds (I) and (II) reduced the number of fibrotic areas threefold, ameliorated hepatic steatosis and necrosis as compared to the control group, and improved blood biochemical parameters (ALT, AST, and LDH). Interestingly, compound (II) had a more pronounced effect.

Therefore, pyrimidine derivatives of Xymedon and its conjugate with *L*-ascorbic acid showed an antifibrotic effect in our experimental rat model of fibrosis.

Keywords: fibrosis, antifibrotic effect, collagen, Xymedon, carbon tetrachloride

Acknowledgements. This study was performed under the state assignment to the FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences.

Figure Captions

- Fig. 1. Structural formulas of the studied compounds. 1 – Xymedon (compound (I)), 2 – conjugate of Xymedon with *L*-ascorbic acid (compound (II)).
- Fig. 2. Effect of compounds (I) and (II) on the rat liver mass ratio. 1 – intact control group, 2 – control group, 3 – compound (I) group, 4 – compound (II) group. * – differences with the intact group are reliable, $p < 0.05$; # – differences with the control group are reliable, $p < 0.05$.
- Fig. 3. Effect of compounds (I) and (II) on the cell damage markers. A – aspartate aminotransferase (AST) activity, B – alanine aminotransferase (ALT) activity, C – lactate dehydrogenase (LDH) activity. 1 – intact control group, 2 – control group, 3 – compound (I) group, 4 – compound (II) group. * – differences with the intact control group are reliable, $p < 0.05$; # – differences with the control group are reliable, $p < 0.05$.
- Fig. 4. Effect of compounds (I) and (II) on the liver tissue morphology, hematoxylin and eosin staining, magnification 100x and 200x.
- Fig. 5. Effect of compounds (I) and (II) on the development of collagen fibers (red) in the liver tissue, Van Gieson's staining, magnification 100x and 200x.
- Fig. 6. Effect of compounds (I) and (II) on the development of collagen fibers (red) in the liver tissue, Van Gieson's staining without Weigert's hematoxylin to contrast collagen staining, magnification 40x.
- Fig. 7. Effect of compounds (I) and (II) on the percentage of collagen area in the rat liver tissue. 1 – intact control group, 2 – control group, 3 – compound (I) group, 4 – compound (II) group. * – differences with the intact control group are reliable, $p < 0.0085$; # – differences with the control group are reliable, $p < 0.0085$.

References

1. Faccioli L.A.P., Dias M.L., Paranhos B.A., dos Santos Goldenberg R.C. Liver cirrhosis: An overview of experimental models in rodents. *Life Sci.*, 2022, vol. 301, art. 120615. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120615.
2. Mokdad A.A., Lopez A.D., Shahrzaz S., Lozano R., Mokdad A.H., Stanaway J., Murray C.J., Naghavi M. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: A systematic analysis. *BMC Med.*, 2014, vol. 12, no. 1, art. 145. doi: 10.1186/s12916-014-0145-y.
3. Li M.-H., Feng X., Deng Ba D.J., Chen C., Ruan L.-Y., Xing Y.-X., Chen L.-Y., Zhong G.-J., Wang J.-S. Hepatoprotection of *Herpetospermum caudigerum* Wall. against CCl₄-induced liver fibrosis on rats. *J. Ethnopharmacol.*, 2019, vol. 229, pp. 1–14. doi: 10.1016/j.jep.2018.09.033.
4. Ben Hsouna A., Hfaiedh M., Slima S.B., Romdhane W.B., Akacha B.B., Bouterra M.T., Dhifi W., Mnif W., Brini F., Ben Saad R., Ben Salah R. Antioxidant and hepatoprotective effects of novel

- heteropolysaccharide isolated from *Lobularia maritima* on CCl₄-induced liver injury in rats. *Food Sci. Nutr.*, 2022, vol. 10, no. 7. pp. 2271–2284. doi: 10.1002/fsn3.2836.
5. Brol M.J., Rösch F., Schierwagen R., Magdaleno F., Uschner F.E., Manekeller S., Queck A., Schwarzkopf K., Odenthal M., Drebber U., Thiele M., Lingohr P., Plamper A., Kristiansen G., Lotersztajn S., Krag A., Klein S., Rheinwalt K.P., Trebicka J. Combination of CCl₄ with alcoholic and metabolic injuries mimics human liver fibrosis. *Am. J. Physiol.: Gastrointest. Liver Physiol.*, 2019, vol. 317, no. 2, pp. G182–G194. doi: 10.1152/ajpgi.00361.2018.
 6. Vyshtakalyuk A.B., Nazarov N.G., Semenov V.E., Galyametdinova I.V., Diabankana R.G.K., Porfiriev A.G., Zobov V.V. Recovery of liver damaged by CCl₄ under treatment by conjugate of drug Xymedon with L-ascorbic acid. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 2018, vol. 9, no. 10, pp. 4117–4126. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.9(10).4117-26.
 7. Reznik V.S., Pashkurov N.G. Reactions of pyrimidinols and pyrimidinethiols with 2-chloroethanol and with 2-chloro-1-propanol. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem. Sci.*, 1966, vol. 15, no. 9, pp. 1554–1557. doi: 10.1007/BF00848915.
 8. Vyshtakalyuk 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. Synthesis and primary evaluation of the hepatoprotective properties of novel pyrimidine derivatives. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, 2017, vol. 43, no. 5, pp. 604–611. doi: 10.1134/S106816201704015X.
 9. Mironov A.N. (Ed.) *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* [A Guide to Preclinical Drug Testing]. Pt. 2. Moscow, Grif i K, 2012. 536 p. (In Russian)
 10. Commission Recommendation of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes (2007/526/EC). *OJEU*, 2007, vol. L197, pp. 1–89.
 11. Arjmand A., Tsiouras M.G., Tzallas A.T., Forlano R., Manousou P., Giannakeas N. Quantification of liver fibrosis—A comparative study. *Appl. Sci.*, 2020, vol. 10, no. 2, art. 447. doi: 10.3390/app10020447.
 12. Abd-Elhakim Y.M., Ghoneim M.H., Khairy M.H., Eissa S.A. Single or combined protective and therapeutic impact of taurine and hesperidin on carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rat. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2020, vol. 27, no. 12, pp. 13180–13193. doi: 10.1007/s11356-020-07895-1.
 13. Zheng W.V., Li Y., Cheng X., Xu Y., Zhou T., Li D., Xiong Y., Wang S., Chen Z. Uridine alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by regulating the activity of liver-related cells. *J. Cell. Mol. Med.*, 2021, vol. 26, no. 3, pp. 840–854. doi: 10.1111/jcmm.17131.
 14. Moteki H., Kimura M., Sunaga K., Tsuda T., Ogihara M. 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. *Eur. J. Pharmacol.*, 2013; vol. 700, nos. 1–3, pp. 2–12. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.12.010.
 15. Kimura M., Moteki H., Uchida, M., Natsume H., Ogihara M. L-ascorbic acid- and L-ascorbic acid 2-glucoside accelerate *in vivo* liver regeneration and lower serum alanine aminotransaminase activity in 70% partially hepatectomized rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 2014, vol. 37, no. 4, pp. 597–603. doi: 10.1248/bpb.b13-00839.
 16. Luo Q., Jiang M., Kou L., Zhang L., Li G., Yao Q., Shang L., Chen Y. Ascorbate-conjugated nanoparticles for promoted oral delivery of therapeutic drugs via sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1). *Artif. Cells, Nanomed., Biotechnol.*, 2017, vol. 46, no. 1, pp. 198–208. doi: 10.1080/21691401.2017.1417864.
 17. Slabnov Y.D., Cherepnev G.V., Karimova F.G., Garaev R.S. Effect of pyrimidine derivatives on adenylate cyclase system of immunocompetent cell regulation *in vitro*. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 1998, vol. 125, no. 6, pp. 588–590. doi: 10.1007/bf02445248.
 18. Ladilov Y., Appukuttan A. Role of soluble adenylyl cyclase in cell death and growth. *BBA, Biochim. Biophys. Acta., Mol. Basis Dis.*, 2014, vol. 1842, no. 12, pp. 2646–2655. doi: 10.1016/j.bbadis.2014.06.034.
 19. Borland G., Smith B.O., Yarwood S.J. EPAC proteins transduce diverse cellular actions of cAMP. *Br. J. Pharmacol.*, 2009, vol. 158, no. 1, pp. 70–86. doi: 10.1111/j.1476-5381.2008.00087.x.

20. Tavares L.P., Negreiros-Lima G.L., Lima K.M., E Silva P.M.R., Pinho V., Teixeira M.M., Sousa L.P. Blame the signaling: Role of cAMP for the resolution of inflammation. *Pharmacol. Res.*, 2020, vol. 159, art. 105030. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105030.
21. Strickland J.D., Copple B.L. Chapter Six – Modulation of macrophage phenotype to treat liver fibrosis – Current approaches and future possibilities. In: *Advances in Pharmacology*. Vol. 91: Advances in immunopharmacology. Copple B.L., Rockwell C.E. (Eds.). Acad. Press, 2021, pp. 213 -- 228. doi: 10.1016/bs.apha.2021.03.001.
22. Parfenov A., Belyaev G., Vyshtakalyuk A., Gumarova L., Khasanshina L., Semenov V., Zobov V. The influence of Xymedon conjugate with L-ascorbic acid on initial development of fibrosis in the rat liver after toxic exposure of CCl₄. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2021, vol. 51, no. S1, p. 78.
23. Chen D., Chen J., Chen Y., Chen F., Wang X., Huang Y. Interleukin-10 regulates starvation-induced autophagy through the STAT3-mTOR-p70s6k axis in hepatic stellate cells. *Exp. Biol. Med.*, 2022, vol. 247, no. 10, pp. 832–841. doi: 10.1177/15353702221080435.
24. Xu Y., Liang P., Bian M., Chen W., Wang X., Lin J., Shang M., Qu H., Wu Z., Huang Y., Yu X. Interleukin-13 is involved in the formation of liver fibrosis in *Clonorchis sinensis*-infected mice. *Parasitol. Res.*, 2016, vol. 115, no. 7, pp. 2653–2660. doi: 10.1007/s00436-016-5012-7.
25. Elnagdy M., Barve S., McClain C., Gobejishvili L. cAMP signaling in pathobiology of alcohol associated liver disease. *Biomolecules*, 2020, vol. 10, no. 10, art. 1433. doi: 10.3390/biom10101433.
26. Semenov V.E. Hepatoprotective agent. Patent RF no. 2590952, 2016. (In Russian)
27. Rockey D.C., Du Q., Shi Z. Smooth muscle α -actin deficiency leads to decreased liver fibrosis via impaired cytoskeletal signaling in hepatic stellate cells. *Am. J. Pathol.*, 2019, vol. 189, no. 11, pp. 2209–2220. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.07.019.

Для цитирования: Беляев Г.П., Выштакалюк А.Б., Парфенов А.А., Галяметдинова И.В., Семенов В.Э., Зобов В.В. Антифиброзный эффект производных пиримидина ксимедона и его конъюгата с L-аскорбиновой кислотой // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. 2023. Т. 165, кн. 2. С. 175–189. doi: 10.26907/2542-064X.2023.2.175-189.

For citation: Belyaev G.P., Vyshtakalyuk A.B., Parfenov A.A., Galyametdinova I.V., Semenov V.E., Zobov V.V. Antifibrotic effect of pyrimidine derivatives of Xymedon and its conjugate with L-ascorbic acid. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2023, vol. 165, no. 2, pp. 175–189. doi: 10.26907/2542-064X.2023.2.175-189. (In Russian)