

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 577.12+615.275.4

doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.231-248

АНТИАПОПТОЗНЫЙ МЕХАНИЗМ РЕАЛИЗАЦИИ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНА В ИССЛЕДОВАНИЯХ *IN VIVO*

А.А. Парфенов¹, А.Б. Вышатакалюк^{1,2}, И.В. Галяметдинова¹,
В.Э. Семёнов^{1,3}, В.В. Зобов^{1,2}

¹Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова
ФИЦ Казанский научный центр РАН, г. Казань, 420015, Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

³Казанский национальный исследовательский технологический университет,
г. Казань, 420015, Россия

Аннотация

В работе исследовано влияние производных пиримидина (лекарственного препарата Ксимедон и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой, проявляющих гепатопротекторную активность) на апоптоз клеток печени крыс на фоне воздействия гепатотоксического агента тетрахлорметана. Предпринята попытка определить, на какие маркеры апоптоза воздействуют исследуемые соединения – Ксимедон и его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой. Основным использованным методом был современный мультиплексный анализ маркеров раннего апоптоза Akt, BAD, BCL-2, p53, Active Caspase-8 Active и Caspase-9 в гомогенатах печени крыс с применением системы MagPix (MerkMillipore, США). В результате исследования выявлено, что Ксимедон и его производное с *L*-аскорбиновой кислотой проявляют антиапоптозный эффект, приводя к существенному снижению количества маркеров раннего апоптоза BAD, Active Caspase-9, а также что производное с *L*-аскорбиновой кислотой уменьшает экспрессию p53. Более того, было показано, что под действием соединений происходит нормализация исследованных биохимических маркеров повреждения печени (трансаминаз, щелочной фосфатазы, билирубина, общего белка, альбумина) и повышение уровня глюкозы в сыворотке крови крыс на фоне острого токсического повреждения печени четыреххлористым углеродом. Полученные результаты имеют как теоретическую ценность – раскрывают механизмы действия производных пиримидина, так и практическую, связанную с возможностью создания эффективного препарата с гепатопротекторной активностью.

Ключевые слова: производные пиримидина, Ксимедон, апоптоз, четыреххлористый углерод, токсическое повреждение печени

Введение

Печень в организме играет ключевую роль в детоксикации экзогенных и эндогенных токсичных веществ. Несвоевременно начатое лечение легких форм патологий печени, вызванных действием гепатотоксических веществ, может привести к более серьезным, вплоть до некротических повреждений [1]. Объектом настоящего исследования были лекарственный препарат на основе производного

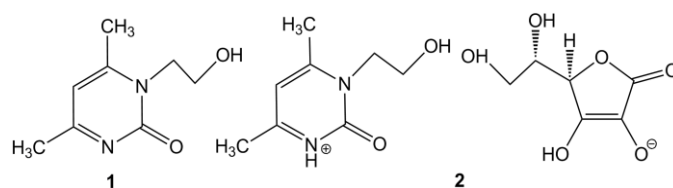


Рис. 1. Структурная формула исследуемых соединений: 1 – Ксимедон; 2 – конъюгат Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой

пиримидина Ксимедон (соединение 1) и его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой (соединение 2). Структурная формула этих соединений представлена на рис. 1.

Ксимедон (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)-пиримидин-2-он) – оригинальное российское лекарственное соединение, стимулятор регенерации тканей. Химическое соединение было синтезировано в Институте органической и физической химии им. А.Е. Арбузова в 1966 г. Оно обладает широким спектром действия, включая мембраностабилизирующее, регенерирующее, иммуномодулирующее и т. д. [2].

Ранее были получены данные, которые показали, что конъюгирование Ксимедона с некоторыми биологически активными кислотами приводит к усилению протекторного действия самой молекулы Ксимедона [3–9].

В результате поисковых исследований было выяснено, что конъюгат Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой в отличие от прочих исследованных конъюгатов обладает более выраженным и стабильным гепатопротекторным эффектом. *In vivo* было показано, что соединение 2 способствует уменьшению проявления морфологических признаков повреждения печени, индуцированных четыреххлористым углеродом [10]. Было также выявлено, что соединение 2 способствует нормализации биохимических маркеров повреждения тканей печени в крови животных на фоне воздействия четыреххлористого углерода [10]. Более того, для конъюгата Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой показан более выраженный гепатопротекторный эффект, чем для препарата сравнения – Тиотриазолина [10].

Таким образом, с учетом того факта, что нам известен гепатопротекторный потенциал конъюгата Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой, в настоящей работе предпринята попытка установить механизм, по которому осуществляется протекторный эффект изучаемого конъюгата. Цель настоящего исследования – изучить влияние лекарственного препарата Ксимедон и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой, проявляющих гепатопротекторную активность, на апоптоз клеток печени крыс на фоне воздействия гепатотоксического агента тетрахлорметана.

1. Материалы и методы

1.1. Синтез исследуемых соединений. Ксимедон (1,2-дигидро-4,6-диметил-1-(2-гидроксиэтил)-пиримидин-2-он) и его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой были синтезированы по ранее описанным в [4, 11] методам из 2-дигидро-4,6-диметилпиримидин-2-она и 2-хлорэтанола.

1.2. Дизайн эксперимента на лабораторных животных. Эксперименты проводили на взрослых самцах крыс линии Wistar массой тела 300–350 г, полученных из НПП «Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН» (г. Пушкино).

Животных содержали в соответствии с положениями руководства доклинических испытаний [12] и руководства Европейского комитета по содержанию и уходу за животными, используемыми для экспериментов и других исследовательских целей (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), в стандартных условиях вивария с 12-часовым световым днем и неограниченным доступом к еде и воде. Животных кормили комплексным кормом, изготовленным по ТУ 9296-002-70941247-2005 (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 (Приволжского) федерального университета (протокол № 4 от 18 мая 2017 г.).

Всего в эксперименте участвовало 24 животных (по 6 в каждой из 4 экспериментальных групп). Схема эксперимента выглядела следующим образом: введение CCl_4 в течение 3 дней, затем введение препаратов в течение 6 дней (всего 9 дней). Забор материала (кровь для биохимических исследований, образцы печени) осуществляли на следующий день после последнего введения CCl_4 (4-й день с начала эксперимента), спустя 3 дня после прекращения введения CCl_4 и 3 дня введения препаратов (7-й день эксперимента) и спустя 6 дней после прекращения введения CCl_4 и 6 дней введения препаратов (10-й день эксперимента), при эвтаназии животных.

Четыреххлористый углерод вводили перорально в виде 35%-ного масляного раствора, в дозе 1.5 мг/кг. Исследуемые соединения 1 и 2 вводили внутрибрюшинно в дозах 0.24 и 0.5 мг/кг. Растворы препаратов готовились каждый день непосредственно перед введением животным.

Сыворотку крови готовили путем двукратного центрифугирования крови при 3000 об./мин и температуре +4 °С. Хранение сыворотки до анализа осуществляли в морозильной камере при температуре –25 °С. Биохимические показатели исследованы на автоматическом биохимическом анализаторе АРД 200 («АРД», Россия) с помощью набора реагентов для клинической биохимии (Chronolab, Швейцария).

1.3. Гистологические исследования. Гистологическую проводку, приготовление парафиновых срезов, окрашивание гематоксилином Гарриса (BioVitrum, Россия), спиртовым эозином (BioVitrum, Россия) осуществляли по стандартным протоколам, более подробно описанным в работах [4–9]. Приготовление замороженных срезов и окрашивание их суданом 4 (BioVitrum, Россия) также выполняли по стандартным протоколам.

1.4. Исследование молекулярных маркеров апоптоза. Маркеры были изучены в лизатах печени крыс согласно протоколу к набору Early Apoptosis Magnetic Bead Kit (MilliporeSigma, США) с измерением показателей на приборе MagPix (MerkMillipore, США).

Для исследования маркеров апоптоза предварительно проводили лизирование 50 мг образцов ткани печени, отобранных у животных во время эвтаназии, согласно инструкциям к набору “MicroRotofor Lysis Kit” (“BioRad”, США), с добавлением ингибиторов протеаз “Protease Inhibitor Cocktail” (“Sigma-Aldrich”,

США). Далее выполняли выравнивание всех образцов по концентрации общего белка до 100 мкг/мл посредством измерения концентрации белка в образцах методом Брэдфорда с использованием набора Quick Start Bradford Protein Assay Kit (BioRad, США) и микропланшетного спектрофотометра Epoch (BioTech, США). Для построения калибровочного графика использовали бычий сывороточный альбумин (Amresco, США).

1.5. Статистическая обработка. Полученные экспериментальные данные были статистически обработаны. На рисунках представлены средние значения для каждого стандартного параметра и стандартные ошибки. В случае нормального распределения проводили дисперсионный анализ ANNOVA (при равенстве дисперсий) либо тест Уэлча (при неравенстве дисперсий). При выявлении различий между группами проводили их сравнение с помощью апостериорных тестов Тьюки HSD (при равенстве дисперсий) и теста Гэймса – Хоуэлла (при неравенстве дисперсий). Равенство дисперсий проверяли с помощью теста Левена. В случае отклонения распределения от нормального проводили тест Краскала – Уоллиса. При выявлении различий между группами использовали тест Манна – Уитни с поправкой на множественные сравнения. Новый уровень критической значимости рассчитывали по формулам [13]

$$p^* = 1 - 0.95^{1/n},$$
$$n = 0.5N(N - 1),$$

где p^* – новый уровень значимости, n – количество производимых сравнений, N – количество изучаемых групп.

В случае нахождения отличий на рисунках показаны вычисленные уровни значимости p для использованного в данном случае теста.

Статистическая обработка выполнена в программе SPSS 22.0. Визуализация данных осуществлена с помощью Origin Lab 2018, обработка рисунков выполнена в Adobe Photoshop 18.00.

2. Результаты

2.1. Оценка клинического состояния животных. После трехдневного курса введения CCl_4 у животных наблюдается картина острого токсического повреждения печени, подтвержденная на гистологических срезах, где были заметны очаги стеатоза, дистрофии гепатоцитов и некротических изменений (рис. 2).

На фоне введения соединений 1 и 2 изменения активности аминотрансфераз не носят такого выраженного характера, как это было в контрольной группе. Так, активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) при введении соединений 1 и 2 на 7-й и 10-й день снизилась менее значительно относительно показателей интактных животных, достоверных отличий от интактной группы обнаружено не было, в отличие от контрольной группы, где наблюдалось достоверное снижение АлАТ по сравнению с интактной группой на 4-й ($p = 0.000$, тест Тьюки HDS), 7-й ($p = 0.028$, тест Тьюки HDS) и 10-й день ($p = 0.000$, тест Тьюки HDS). Однако статистически достоверных различий между контрольной и опытными группами в соответствующие дни исследований не наблюдалось (рис. 3. б). Активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ) на фоне введения соединений 1 и 2 практически не отличалась

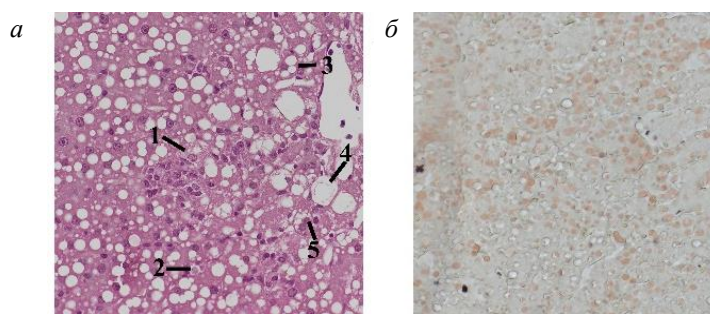


Рис. 2. Микрофотографии срезов печени крыс после трехдневного воздействия CCl_4 : *a* – окраска гематоксилином и эозином (1 – гидропическая дистрофия, 2 – тельце Каунсильмена, 3 – крупнокапельная жировая дистрофия, 4 – баллонная дистрофия, 5 – мелкокапельная жировая дистрофия); *б* – окраска суданом 4 (оранжевый цвет – капли жира)

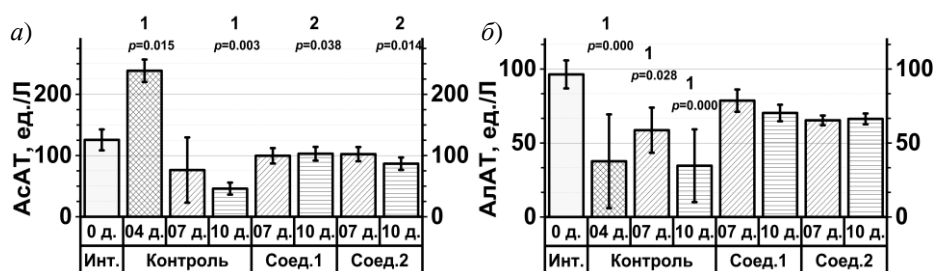


Рис. 3. Влияние соединений 1 и 2 на маркеры цитолиза клеток: *a*) активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ); *б*) активность аланинаминотрансферазы (АлАТ). 1 – отличия от интактной группы; 2 – отличия от контрольной группы того же дня. Уровни значимости p определены в тестах Тьюки HDS и Геймса – Хоуэлла

от референсных значений интактной группы животных. На фоне применения соединения 1 и 2 на 10-й день эксперимента активность АсАТ была статистически достоверно выше по сравнению с контрольной группой ($p = 0.003$ и $p = 0.038$, тест Геймса – Хоуэлла), в которой было выявлено достоверное снижение данного показателя ($p = 0.000$, тест Геймса – Хоуэлла) (рис. 3, *a*).

Под действием CCl_4 в контрольной группе в динамике наблюдения выявлено снижение активности щелочной фосфатазы (ЩФ), концентраций билирубина общего и его фракций (конъюгированного и неконъюгированного билирубина) на 7-й и 10-й день опыта (рис. 4). В опытных группах на 10-й день по сравнению с интактной группой уровни ЩФ, билирубина общего и его фракций не претерпевали значительных изменений. При использовании соединений 1 и 2 по сравнению с контрольной группой отмечено достоверное повышение концентрации общего билирубина на 10-й день эксперимента ($p = 0.000$ и $p = 0.000$, тест Геймса – Хоуэлла) (рис. 4, *б*).

При использовании соединений 1 и 2 на фоне токсических CCl_4 -индуцированных повреждений наблюдалось менее выраженное по сравнению с контрольной группой снижение концентрации общего белка и альбумина. На 10-й день опыта при использовании соединений 1 и 2 было отмечено статистически достоверное повышение количества общего белка ($p = 0.045$ и $p = 0.049$, тест Тьюки HDS) и альбумина ($p = 0.000$ и $p = 0.000$, тест Геймса – Хоуэлла) по сравнению с контрольной группой (рис. 5, *a, б*).

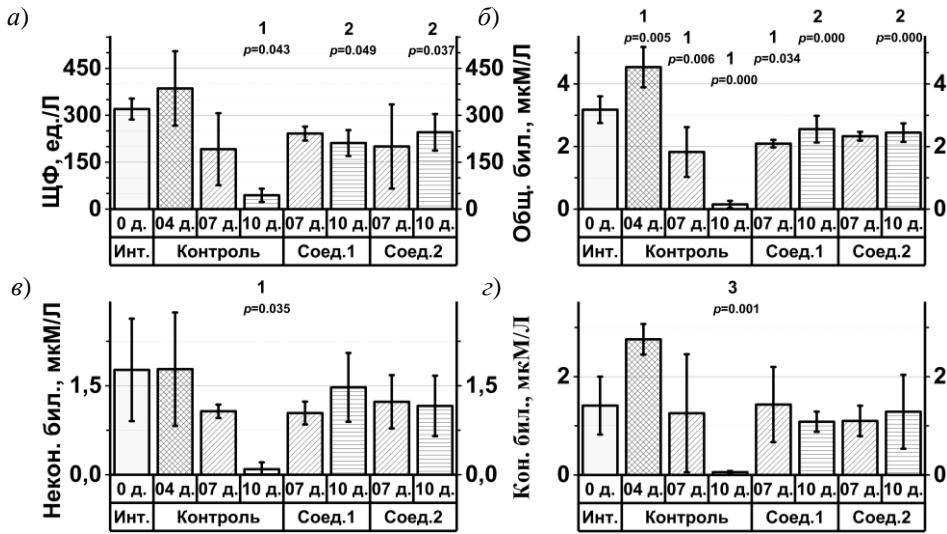


Рис. 4. Влияние соединений 1 и 2 на маркеры желчевыведения и выведения билирубина: а) активность щелочной фосфатазы (ЩФ); б) концентрация общего билирубина; в) концентрация неконъюгированного билирубина; г) концентрация конъюгированного билирубина. 1 – отличия от интактной группы; 2 – отличия от контрольной группы того же дня; 3 – отличия контрольных показателей на 4-й день от контрольных показателей на 10-й день. Уровни значимости p определены в тестах Тьюки HDS и Геймса – Хоуэлла

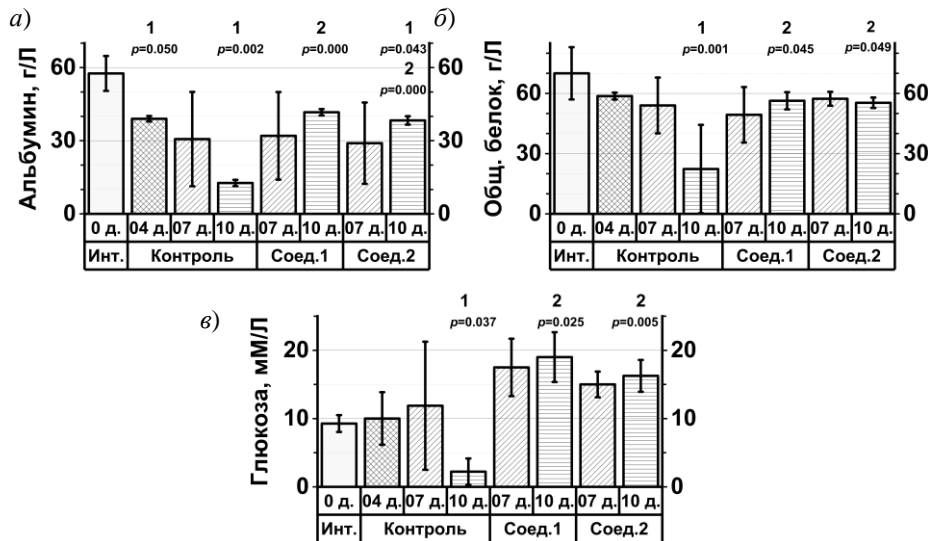


Рис. 5. Влияние соединений 1 и 2 на маркеры белкового обмена и глюкозу: а) концентрация альбумина; б) концентрация общего белка; в) концентрация глюкозы. 1 – отличия от интактной группы; 2 – отличия от контрольной группы того же дня. Уровни значимости p определены в тестах Тьюки HDS и Геймса – Хоуэлла

На фоне воздействия CCl_4 в контрольной группе к 10-му дню эксперимента наблюдается снижение концентрации глюкозы ($p = 0.037$, тест Геймса – Хоуэлла). При использовании соединений 1 и 2 подобного снижения не зафиксировано: концентрация глюкозы остается достоверно выше контроля ($p = 0.025$ и $p = 0.005$, тест Геймса – Хоуэлла) (рис. 5, в).

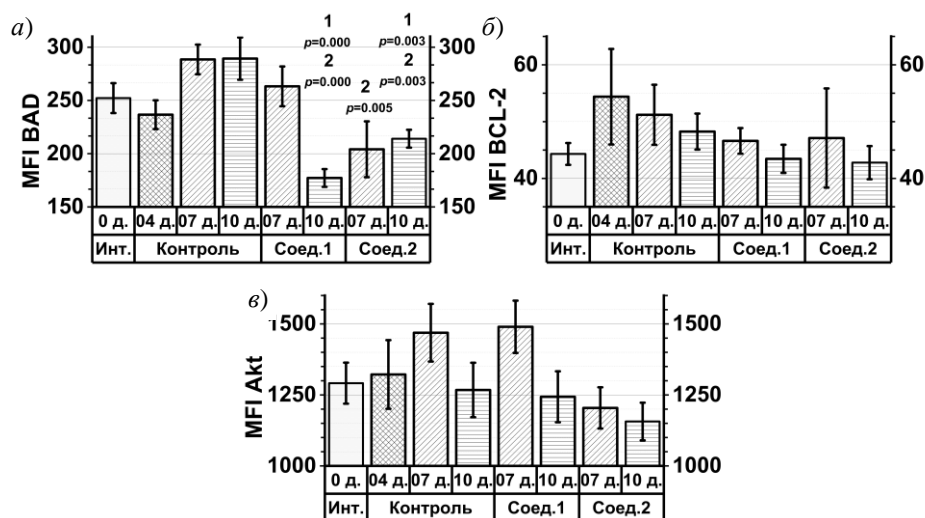


Рис. 6. Влияние соединений 1 и 2 на среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) маркеров раннего апоптоза: а) MFI BAD; б) MFI BCL-2; в) MFI Akt. 1 – отличия от интактной группы; 2 – отличия от контрольной группы того же дня. Уровни значимости p определены в тесте Манна – Уитни; критический уровень значимости $p^* = 0.002$

2.2. Молекулярные маркеры раннего апоптоза. Изучение маркеров раннего апоптоза лизатов печени позволило нам увидеть, каким образом трехдневное введение CCl_4 способствует возникновению такой *тенденции*, как увеличение MFI (Mean intensity of fluorescence – средняя интенсивность флуоресценции) проапоптотического белка BAD семейства BCL на 7-й и 10-й день эксперимента по сравнению с интактной группой ($p = 0.011$ и $p = 0.021$, тест Манна – Уитни) (рис. 6, а). В свою очередь, введение соединений 1 и 2 способствовало снижению MFI данного маркера раннего апоптоза. Так, соединение 1 на 7-й день эксперимента не оказало на обозначенный маркер значительного эффекта (рис. 6, а). Только на 10-й день эксперимента происходит снижение MFI BAD-белка в группе животных, которых лечили соединением 1 по сравнению с его содержанием в интактной группе животных ($p = 0.000$, тест Манна – Уитни), а также с аналогичными показателями в контрольной группе ($p = 0.000$, тест Манна – Уитни) (рис. 6, а). При использовании соединения 2 снижение MFI BAD-белка по отношению к контролю отмечено как на 7-й день эксперимента ($p = 0.005$, тест Манна – Уитни), так и на 10-й ($p = 0.003$, тест Манна – Уитни) (рис. 6, а). Рассматривая антиапоптотические маркеры BCL-2 и Akt в настоящем исследовании, мы не можем говорить о каком-либо достоверном влиянии на них CCl_4 и соединений 1 и 2, хотя очевидна тенденция к их повышению под влиянием CCl_4 в контрольной группе и к снижению в опытных группах, особенно на 10-й день опыта (рис. 6, б, в).

Трехдневное введение CCl_4 приводило к постепенному увеличению MFI активированной каспазы 9 (CASP9) на 10-й день эксперимента ($p = 0.006$, тест Манна – Уитни) (рис. 7, а). Введение соединения 1 способствовало достоверному уменьшению активации CASP9 на 10-й день эксперимента ($p = 0.000$, тест Манна – Уитни), а введение соединения 2 – как на 7-й, так и на 10-й день по сравнению с контрольной группой животных ($p = 0.004$ и $p = 0.006$, тест Манна –

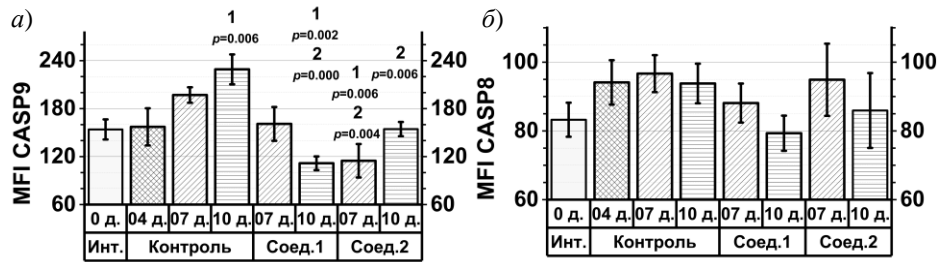


Рис. 7. Влияние соединений 1 и 2 на среднюю интенсивность флуоресценции (MFI) активированных каспаз 9 и 8: а) MFI активированной каспазы 9 (CASP9); б) MFI активированной каспазы 8 (CASP8). 1 – отличия от интактной группы, 2 – отличия от контрольной группы того же дня. Уровни значимости p определены в тесте Манна – Уитни; критический уровень значимости $p^* = 0.002$

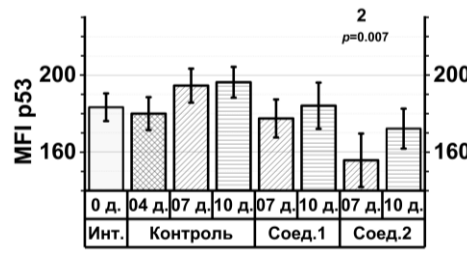


Рис. 8. Влияние соединений 1 и 2 на среднюю интенсивность флуоресценции MFI p53. 2 – отличия от контрольной группы того же дня. Уровни значимости p определены в тесте Манна – Уитни; критический уровень значимости $p^* = 0.002$

Уитни) (рис. 7, а). С другой стороны, введение CCl_4 и препаратов не привело к существенному изменению MFI активированной каспазы 8 (CASP8) (рис. 7, б).

Отмечена также тенденция к снижению MFI белка p53 при использовании соединения 2 относительно контроля на 7-й день исследования (рис. 8).

3. Обсуждение

Механизм действия самой молекулы Ксимедона предположительно связан с регуляцией активности аденилатциклазы (АЦ), так как имеются данные о том, что Ксимедон снижает активность данной сигнальной молекулы в иммунокомпетентных клетках [14]. Если говорить о дальнейших последствиях активации или ингибирования АЦ, то стоит упомянуть, что существуют разные изоформы АЦ, регуляция которых опосредована G-белками [15]. Сама регуляция активности АЦ через субъединицы G-белка топоспецифична, то есть зависит от изоформы АЦ и типа клетки [15]. Активность АЦ связана с продуцированием в клетке циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) [16], который, в свою очередь, активирует в ней регуляторные процессы в зависимости от ее типа [17]. Например, имеются данные о том, что высокие концентрации цАМФ стимулируют пролиферацию эпителиальных клеток, гепатоцитов, адипоцитов и β -клеток поджелудочной железы [18]. Но в то же время высокая продукция цАМФ клетками фибробластов, гладкомышечных, неопластических В-клеток, наоборот, подавляет пролиферацию этих клеток [18].

После трехдневного курса введения CCl_4 у животных наблюдается картина острого токсического повреждения печени, выраженного в изменении активности ферментов АсАТ и АлАТ. Резкое повышение АсАТ после курса введения токсиканта может объясняться тем, что АсАТ, как и АлАТ, в клетках печени содержится в больших количествах [19]. Наибольшая его активность наблюдается в митохондриях периферической зоны ацинуса [20]. Следовательно, остротоксическое повреждение клеток этой зоны будет вызывать более резкое повышение активности именно сывороточной АсАТ, нежели АлАТ [21]. Увеличение некротических повреждений на 4-й день опыта привело к возникновению нарушений выведения билирубина из крови, что может являться признаком желтухи [22, 23].

Резкое снижение (значительно ниже референсных значений) в контрольной группе трансаминаз АсАТ и АлАТ, а также ЩФ, общего билирубина и его фракций на 7-й и 10-й день опыта связано с уменьшением функциональной активности гепатоцитов в результате токсического повреждения и/или с уменьшением количества функционирующих гепатоцитов. Установлено [21], что период полувыведения общего АсАТ из кровотока составляет около 17 ч и митохондриального – 87 ч. Применение соединений Ксимедона и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой привело к менее выраженным изменениям исследованных показателей, что свидетельствует о меньших некротических и других патологических повреждениях паренхимы печени, а также о повышении функциональной активности гепатоцитов.

Отмеченное в нашем эксперименте снижение концентраций общего белка и альбумина на фоне воздействия токсиканта вполне логично, так как при повреждениях паренхимы печени происходит снижение ее синтетической функции [24, 25]. Как следует из полученных нами данных, при использовании Ксимедона и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой наблюдается сохранение синтетической функции печени либо интенсификация таковых процессов у неповрежденных гепатоцитов. Получены также данные, свидетельствующие о нормализации концентрации глюкозы в крови под воздействием Ксимедона и его конъюгата с аскорбиновой кислотой на фоне повреждений, вызванных CCl_4 .

В ходе исследования маркеров раннего апоптоза нами выявлено, что Ксимедон (на 10-й день эксперимента) и его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой (на 7-й и 10-й день эксперимента) способствуют снижению MFI проапоптотического белка BAD. Этот белок, содержащий только ВНЗ, ингибирует антиапоптотические BCL-2 и BCL-xL и способствует активации BAX/BAK в ответ на апоптотические стимулы [26]. Это является свидетельством того, что данные соединения снижают инициацию апоптотических процессов в клетках, тем самым не только компенсируя воздействие CCl_4 , но и приводя к снижению экспрессии проапоптотического белка BAD ниже значений интактной группы животных. Однако в данном случае уменьшение MFI проапоптотического белка BAD не связано с MFI Akt, которая считается ингибитором апоптоза из-за ее способности инактивировать проапоптотические молекулы, включая каспазу-9 (CASP9) и белок BAD [27, 28]. Таким образом, снижение MFI BAD под воздействием Ксимедона и его конъюгата с *L*-аскорбиновой кислотой, скорее всего, связано не с его фосфорилированием Akt, а с уменьшением экспрессии в клетке этого белка. Нами также не выявлено достоверного увеличения MFI антиапоптотического белка BCL-2. Этот

белок предотвращает апоптоз либо путем секвестирования проформ каспаз, вызывающих гибель клетки, либо путем предотвращения высвобождения митохондриальных апоптогенных факторов, таких как цитохром С и АИФ (фактор, вызывающий апоптоз), в цитоплазму [29].

В проведенном эксперименте CCl_4 способствовал активации преимущественно внутреннего пути апоптоза клеток печени, связанного с активацией CASP9 [30]. Отмеченное снижение интенсивности флуоресценции как белка BAD, так и активированной каспазы-9 при введении Ксимедона на 10-й день эксперимента и конъюгата Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой на 7-й и 10-й день эксперимента может быть свидетельством меньших повреждений митохондриальных мембран и меньшего выхода цитохрома С, запускающего активацию апоптотических процессов [31].

Подобный антиапоптозный механизм действия молекулы Ксимедона предположительно может быть связан с регуляцией АЦ [14] и увеличением продукции цАМФ в гепатоцитах. Так, в имеющихся литературных данных представлены свидетельства того, что цАМФ в гепатоцитах является антиапоптотической молекулой [32].

Усиление антиапоптозных свойств конъюгата Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой, проявляющееся в том, что эффект снижения маркеров апоптоза наступает быстрее, во-первых, обусловлено высокой биодоступностью *L*-аскорбиновой кислоты для клеток, приводящей, вероятно, к повышению биодоступности и конъюгированной молекулы Ксимедона. Имеются исследования, показывающие, что поступление витамина С в организм опосредовано классом Na^+ -зависимых транспортеров, называемых SVCT (SVCT1 – в клетках кишечника, SVCT2 – в клетках других органов), а транспорт аскорбиновой кислоты – семейством GLUT переносчиков глюкозы [33]. Соответственно, конъюгация с витамином С является возможным инструментом для улучшения биодоступности и усвоения лекарств [34, 35]. Во-вторых, существуют данные о том, что *L*-аскорбиновая кислота может действовать синергично с другими веществами. Например, аскорбиновая кислота совместно с фенилэфрином и метапротеренолом может усиливать синтез и пролиферацию ДНК первичной культуры гепатоцитов [36], тогда как сами фенилэфрин и метапротеренол не ускоряют синтез и пролиферацию ДНК первичной культуры гепатоцитов [39]. Кроме того, показано, что *L*-аскорбиновая кислота сама по себе способна ускорять регенерацию ткани печени крыс [37].

Заключение

Показано, что Ксимедон и его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой на фоне повреждений, вызванных трехдневным введением CCl_4 , способствуют сохранению функций и повышению активности клеток печени, что проявляется в нормализации исследованных биохимических показателей: трансаминаз, щелочной фосфатазы, билирубина, белка, альбумина, в повышении уровня глюкозы.

Кроме того, Ксимедон и его конъюгат с *L*-аскорбиновой кислотой в условиях токсического повреждения печени CCl_4 проявляют антиапоптозный механизм действия, приводя к достоверному снижению в ткани печени крыс экспрессии проапоптотических маркеров BAD и CASP9.

Для конъюгата Ксимедона с *L*-аскорбиновой кислотой выявлено более быстрое проявление антиапоптозного эффекта по сравнению с Ксимедоном и воздействию на большее число маркеров раннего апоптоза (включая CASP9, BAX, p53), что указывает на более высокую эффективность конъюгата.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-315-90039) и частично по Госзаданию ФИЦ КазНЦ РАН (В.В. Зобов, В.Э. Семёнов, И.В. Галяметдинова).

Литература

1. *Arias I.M., Alter H.J., Boyer J.L., Cohen D.E., Shafritz D.A.* The Liver: Biology and Pathobiology. – Oxford: John Wiley & Sons, 2020. – 1144 p.
2. *Измайлов С.Г., Паршиков В.В. Измайлов С.Г., Паршиков В.В.* Ксимедон: настоящее и будущее // Нижегород. мед. журнал. – 2002. – № 3. – С. 81–87.
3. *Porfiriev A., Sharafutdinova D., Belyaev A., Parfenov A., Shubina V., Golubev A., Vyshtakaliuk A., Zobov V., Semenov V.* The influence of the Xymedon conjugate with L-methionine on the regeneration of *Schmidtea mediterranea* planarians // *BioNanoScience*. – 2020. – V. 10, No 2. – P. 397–402. – doi: 10.1007/s12668-020-00735-z.
4. *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., Shahyn M.S., Reznic 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.
5. *Vyshtakalyuk A., Parfenov A., Gumarova L., Nazarov N., Zobov V., Galyametdinova I., Semenov V.* Comparative evaluation of hepatoprotective activity of Xymedon preparation derivatives with ascorbic acid and methionine // *BioNanoScience*. – 2017. – V. 7, No 4. – P. 616–622. – doi: 10.1007/s12668-017-0461-8.
6. *Vyshtakalyuk A.B., Parfenov A.A., Gumarova L.F., Khasanshina L.R., Belyaev G.P., Nazarov N.G., Kondrashina D.A., Galyametdinova I.V., Semenov V.E., Zobov V.V.* Conjugate of pyrimidine derivative, the drug xymedon with succinic acid protects liver cells // *J. Biochem. Mol. Toxicol.* – 2020. – V. 35, No 3. – Art. e22660, P. 1–12. – doi: 10.1002/jbt.22660.
7. *Vyshtakalyuk A.B., Parfenov A.A., Nazarov N.G., Gumarova L.F., Cherepnev G.V., Galyametdinova I.V., Zobov V.V., Semenov V.E.* Hepato-, nephro- and pancreatoprotective effect of derivatives of drug Xymedon with biogenic acids under toxic influence of carbon tetrachloride in rats // *BioNanoScience*. – 2018. – V. 8, No 3. – P. 845–858. – doi: 10.1007/s12668-018-0526-3.
8. *Vyshtakalyuk 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.* Xymedon conjugate with biogenic acids. Antioxidant properties of a conjugate of Xymedon with L-ascorbic acid // *Russ. Chem. Bull.* – 2018. – V. 67, No 4. – P. 705–711. – doi: 10.1007/s11172-018-2126-3.
9. *Parfenov A.A., Vyshtakalyuk A.B., Gumarova L.F., Khasanshina L.R., Belyaev G.P., Nazarov N.G., Kondrashina D.A., Galyametdinova I.V., Zobov V.V., Semenov V.E.* Xymedone conjugate with *para*-aminobenzoic acid. Estimation of hepatoprotective properties // *Russ. Chem. Bull.* – 2019. – V. 68, No 12. – P. 2307–2315. – doi: 10.1007/s11172-019-2704-z.

10. *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.
11. *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.
12. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть вторая / Отв. ред. А.Н. Миронов. – М.: Гриф и К, 2012. – 536 с.
13. *Гржибовский А.М.* Анализ трех и более независимых групп количественных данных // *Экология человека.* – 2008. – № 3. – С. 50–58.
14. *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.
15. *Cooper D.M., Cooper D.M.F.* Regulation and organization of adenylyl cyclases and cAMP // *Biochem. J.* – 2003. – V. 375, No 3. – P. 517–529. – doi: 10.1042/BJ20031061.
16. *Wahler G.M., Sperelakis N.* regulation of cardiac ion channels by cyclic nucleotide-dependent phosphorylation // *Cell Physiology Sourcebook* / Ed. by N. Sperelakis. – Acad. Press, 2012. – P. 431–443. – doi: 10.1016/B978-0-12-387738-3.00023-8.
17. *Beavo J.A., Brunton L.L.* Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – V. 3, No 9. – P. 710–717. – doi: 10.1038/nrm911.
18. *Gillian B., Brian O.S., Stephen J.Y., 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.
19. *Wróblewski F.* The clinical significance of alterations in transaminase activities of serum and other body fluids // *Adv. Clin. Chem.* – 1958. – V. 1. – P. 313–351. – doi: 10.1016/S0065-2423(08)60362-5.
20. *Rej R.* Aminotransferases in disease // *Clin. Lab. Med.* – 1989. – V. 9, No 4. – P. 667–687. – doi: 10.1016/S0272-2712(18)30598-5.
21. *Dufour D.R., Lott J.A., Nolte F.S., Gretch D.R., Koff R.S.* Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests // *Clin. Chem.* – 2000. – V. 46, No 12. – P. 2027–2049. – doi: 10.1093/clinchem/46.12.2027.
22. *Kaplan M., Hammerman C.* Understanding severe hyperbilirubinemia and preventing kernicterus: Adjuncts in the interpretation of neonatal serum bilirubin // *Clin. Chim. Acta.* – 2005. – V. 356, No 1–2. – P. 9–21. – doi: 10.1016/j.cccn.2005.01.008.
23. *Vitek L., Ostrow J.D.* Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects // *Curr. Pharm. Des.* – 2009. – V. 15, No 25. – P. 2869–2883. – doi: 10.2174/138161209789058237.
24. *Woreta T.A., Alqahtani S.A.* Evaluation of abnormal liver tests // *Med. Clin. North Am.* – 2014. – V. 98, No 1. – P. 1–16. – doi: 10.1016/j.mcna.2013.09.005.
25. *Spinella R., Sawhney R., Jalan R.* Albumin in chronic liver disease: Structure, functions and therapeutic implications // *Hepatol. Int.* – 2016. – V. 10, No 1. – P. 124–132. – doi: 10.1007/s12072-015-9665-6.
26. *Matsuura K., Canfield K., Feng W., Kurokawa M.* Metabolic regulation of apoptosis in cancer // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* – 2016. – V. 327. – P. 43–87. – doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.06.006.
27. *Manning B.D., Cantley L.C.* AKT/PKB signaling: Navigating downstream // *Cell.* – 2007. – V. 129, No 7. – P. 1261–1274. – doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009.

28. *Plas D.R., Thompson C.B.* Akt-dependent transformation: There is more to growth than just surviving // *Oncogene*. – 2005. – V. 24, No 50. – P. 7435–7442. – doi: 10.1038/sj.onc.1209097.
29. *Tsujimoto Y.* Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: Apoptosomes or mitochondria? // *Genes Cell*. – 1998. – V. 3, No 11. – P. 697–707. – doi: 10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x.
30. *Kuida K.* Caspase-9 // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2000. – V. 32, No 2. – P. 121–124. – doi: 10.1016/s1357-2725(99)00024-2.
31. *Liu X., Zou H., Widlak P., Garrard W., Wang X.* Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease): Oligomerization and direct interaction with histone H1 // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274, No 20. – P. 13836–13840. – doi: 10.1074/jbc.274.17.11549.
32. *Insel P.A., Zhang L., Murray F., Yokouchi H., Zamboni A.C.* Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger // *Acta Physiol.* – 2012. – V. 204, No 2. – P. 277–287. – doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02273.x.
33. *Harrison F.E., May J.M.* Vitamin C function in the brain: Vital role of the ascorbate transporter SVCT2 // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – V. 46, No 6. – P. 719–730. – doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.018.
34. *Manfredini S., Pavan B., Vertuani S., Scaglianti M., Compagnone D., Biondi C., Scatturin A., Tanganelli S., Ferraro L., Prasad P., Dalpiaz A.* Design, synthesis and activity of ascorbic acid prodrugs of nipecotic, kynurenic and diclophenamic acids, liable to increase neurotropic activity // *J. Med. Chem.* – 2002. – V. 45, No 3. – P. 559–562. – doi: 10.1021/jm015556r.
35. *Manfredini S., Vertuani S., Pavan B., Vitali F., Scaglianti M., Bortolotti F., Biondi C., Scatturin A., Prasad P., Dalpiaz A.* Design, synthesis and in vitro evaluation on HRPE cells of ascorbic and 6-bromoascorbic acid conjugates with neuroactive molecules // *Bioorg. Med. Chem.* – 2004. – V. 12, No 20. – P. 5453–5463. – doi: 10.1016/j.bmc.2004.07.043.
36. *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.
37. *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.

Поступила в редакцию
28.02.2022

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. Ак. Арбузова, д. 8, г. Казань, 420088, Россия
E-mail: aimt66@gmail.com

Выштакалюк Александра Борисовна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории химико-биологических исследований; профессор кафедры зоологии и общей биологии

Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова ФИЦ Казанский научный центр РАН
ул. Ак. Арбузова, д. 8, г. Казань, 420088, Россия
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: alex.vysh@mail.ru

Галяметдинова Ирина Владимировна, научный сотрудник лаборатории химии нуклеотидных оснований

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

ул. Ак. Арбузова, д. 8, г. Казань, 420088, Россия

E-mail: *iragal2009@yahoo.com*

Семёнов Вячеслав Энгельсович, доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией химии нуклеотидных оснований; профессор кафедры физической и коллоидной химии

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

ул. Ак. Арбузова, д. 8, г. Казань, 420088, Россия

Казанский национальный исследовательский технологический университет

ул. Карла Маркса, д. 68, г. Казань, 420015, Россия

E-mail: *sve@iopc.ru*

Зобов Владимир Васильевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией химико-биологических исследований; профессор кафедры прикладной экологии

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

ул. Ак. Арбузова, д. 8, г. Казань, 420088, Россия

Казанский (Приволжский) федеральный университет

ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, 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)

2022, vol. 164, no. 2, pp. 231–248

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.231-248

**Anti-Apoptosis Mechanism of the Hepatoprotective Effect
of Pyrimidine Derivatives in *In Vivo* Studies**

A.A. Parfenov^{a*}, A.B. Vyshtakalyuk^{a,b**}, I.V. Galyametdinova^{a***},
V.E. Semenov^{a,c****}, V.V. Zobov^{a,b*****}

^aArbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, FRC Kazan Scientific Center,
Russian Academy of Sciences, Kazan, 420088 Russia

^bKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

^cKazan National Research Technological University, Kazan, 420015 Russia

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

*****sve@iopc.ru*, ******vz30608@mail.ru*

Received February 28, 2022

Abstract

This study investigates the effect of pyrimidine derivatives (Xymedon and its conjugate with *L*-ascorbic acid, both exhibiting hepatoprotective activity) on the apoptosis of rat liver cells against the background of exposure to carbon tetrachloride as a hepatotoxic agent. The characteristic markers of apoptosis affected by the considered compounds were identified. Modern multiplex analysis of the early apoptosis markers Akt, BAD, BCL-2, p53, Active Caspase-8, and Active Caspase-9 in rat liver homogenates using the MagPix

system (MerckMillipore, USA) was selected as the main research method. The results obtained show that Xymedon and its derivative with *L*-ascorbic acid exert an anti-apoptotic effect by causing a significant decrease in the number of the early apoptosis markers BAD and Active Caspase-9. The derivative with *L*-ascorbic acid was also found to reduce p53 expression. Moreover, it was revealed that the studied pyrimidine derivatives normalize the biochemical markers of liver damage (transaminases, alkaline phosphatase, bilirubin, total protein, and albumin) and increase the level of glucose in the blood serum of rats against the background of acute toxic damage to the liver by carbon tetrachloride. Our findings are of the utmost theoretical and practical relevance for better understanding the mechanisms of the action of pyrimidine derivatives and for developing a highly effective hepatoprotective drug.

Keywords: pyrimidine derivatives, Xymedon, apoptosis, carbon tetrachloride, toxic liver damage

Acknowledgments. This study was funded by the Russian Foundation for Basic Research (project no. 20-315-90039). The work by A. Vyshtakalyuk, I. Galyametdimova, V. Semenov, and V. Zobov was supported in part by the state assignment to the FRC Kazan Scientific Center of the Russian Academy of Sciences.

Figure Captions

- Fig. 1. Structural formula of the studied compounds: 1 – Xymedon; 2 – conjugate of Xymedon with *L*-ascorbic acid.
- Fig. 2. Microphotographs of the rat liver sections after a three-day exposure to CCl_4 : *a* – hematoxylin and eosin staining (1 – hydropic degeneration, 2 – Councilman body, 3 – macrovesicular adipose degeneration, 4 – balloon degeneration, 5 – microvesicular adipose degeneration); *b*) Sudan IV staining (orange drops are lipids).
- Fig. 3. Effect of compounds 1 and 2 on the markers of cell cytolysis: *a*) aspartate aminotransferase (AST) activity; *b*) alanine aminotransferase (ALT) activity. 1 – differences from the intact group; 2 – differences from the control group on the same day. Levels of significance p determined using Tukey's HDS and Games-Howell tests.
- Fig. 4. Effect of compounds 1 and 2 on the bile and bilirubin excretion markers: *a*) alkaline phosphatase (AP) activity; *b*) concentration of total bilirubin; *c*) concentration of unconjugated bilirubin; *d*) concentration of conjugated bilirubin. 1 – differences from the intact group; 2 – differences from the control group on the same day; 3 – differences between the control group on day 4 and the control group on day 10. Levels of significance p determined using Tukey's HDS and Games-Howell tests.
- Fig. 5. Effect of compounds 1 and 2 on the markers of protein metabolism and glucose: *a*) albumin concentration; *b*) total protein concentration; *c*) glucose concentration. 1 – differences from the intact group; 2 – differences from the control group on the same day. Levels of significance p determined using Tukey's HDS and Games-Howell tests.
- Fig. 6. The effect of compounds 1 and 2 on the mean fluorescence intensity (MFI) of the markers of early apoptosis: *a*) MFI BAD; *b*) MFI BCL-2; *c*) MFI Akt. 1 – differences from the intact group; 2 – differences from the control group on the same day. Levels of significance p determined using Mann-Whitney test; critical level of significance $p^* = 0.002$.
- Fig. 7. Effect of compounds 1 and 2 on the mean fluorescence intensity (MFI) of activated caspases 9 and 8: *a*) MFI-activated caspase 9 (CASP9); *b*) MFI-activated caspase 8 (CASP8). 1 – differences from the intact group, 2 – differences from the control group on the same day. Levels of significance p determined using Mann-Whitney test; critical level of significance $p^* = 0.002$.
- Fig. 8. Effect of compounds 1 and 2 on the mean fluorescence intensity (MFI) of p53. 1 – differences from the intact group, 2 – differences from the control group on the same day. Levels of significance p determined using Mann-Whitney test; critical level of significance $p^* = 0.002$.

References

1. Arias I.M., Alter H.J., Boyer J.L., Cohen D.E., Shafritz D.A. *The Liver: Biology and Pathobiology*. Oxford, John Wiley & Sons, 2020. 1144 p.

2. Izmailov S.G., Parshikov V.V. Izmailov S.G., Parshikov V.V. Xymedon: Mapping its present and future. *Nizhegorod. Med. Zh.*, 2002, no. 3, pp. 81–87. (In Russian)
3. Porfiriev A., Sharafutdinova D., Belyaev A., Parfenov A., Shubina V., Golubev A., Vyshtakaliuk A., Zobov V., Semenov V. The influence of the Xymedon conjugate with L-methionine on the regeneration of *Schmidtea mediterranea* planarians. *BioNanoScience*, 2020, vol. 10, no. 2, pp. 397–402. doi: 10.1007/s12668-020-00735-z.
4. 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., Shahyn M.S., Reznic 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.
5. Vyshtakalyuk A., Parfenov A., Gumarova L., Nazarov N., Zobov V., Galyametdinova I., Semenov V. Comparative evaluation of hepatoprotective activity of Xymedon preparation derivatives with ascorbic acid and methionine. *BioNanoScience*, 2017, vol. 7, no. 4, pp. 616–622. doi: 10.1007/s12668-017-0461-8.
6. Vyshtakalyuk A.B., Parfenov A.A., Gumarova L.F., Khasanshina L.R., Belyaev G.P., Nazarov N.G., Kondrashina D.A., Galyametdinova I.V., Semenov V.E., Zobov V.V. Conjugate of pyrimidine derivative, the drug xymedon with succinic acid protects liver cells. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, 2020, vol. 35, no. 3, art. e22660, pp. 1–12. doi: 10.1002/jbt.22660.
7. Vyshtakalyuk A.B., Parfenov A.A., Nazarov N.G., Gumarova L.F., Cherepnev G.V., Galyametdinova I.V., Zobov V.V., Semenov V.E. Hepato-, nephro- and pancreatoprotective effect of derivatives of drug Xymedon with biogenic acids under toxic influence of carbon tetrachloride in rats. *BioNanoScience*, 2018, vol. 8, no. 3, pp. 845–858. doi: 10.1007/s12668-018-0526-3.
8. Vyshtakalyuk 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. Xymedon conjugate with biogenic acids. Antioxidant properties of a conjugate of Xymedon with L-ascorbic acid. *Russ. Chem. Bull.*, 2018, vol. 67, no. 4, pp. 705–711. doi: 10.1007/s11172-018-2126-3.
9. Parfenov A.A., Vyshtakalyuk A.B., Gumarova L.F., Khasanshina L.R., Belyaev G.P., Nazarov N.G., Kondrashina D.A., Galyametdinova I.V., Zobov V.V., Semenov V.E. Xymedone conjugate with *para*-aminobenzoic acid. Estimation of hepatoprotective properties. *Russ. Chem. Bull.*, 2019, vol. 68, no. 12, pp. 2307–2315. doi: 10.1007/s11172-019-2704-z.
10. 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.
11. 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.
12. Mironov A.N. (Ed.) *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* [A Guide to Preclinical Drug Research]. Moscow, Grif i K, 2012. 536 p. (In Russian)
13. Grjibovski A.M. Analysis of quantitative data in three or more independent groups. *Ekol. Chel.*, 2008, no. 3, pp. 50–58 (In Russian)
14. 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.
15. Cooper D.M., Cooper D.M.F. Regulation and organization of adenylate cyclases and cAMP. *Biochem. J.*, 2003, vol. 375, no. 3, pp. 517–529. doi: 10.1042/BJ20031061.
16. Wahler G.M., Sperelakis N. Regulation of cardiac ion channels by cyclic nucleotide-dependent phosphorylation. In: Sperelakis N. (Ed.) *Cell Physiology Sourcebook*. Acad. Press, 2012, pp. 431–443. doi: 10.1016/B978-0-12-387738-3.00023-8.
17. Beavo J.A., Brunton L.L. Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002, vol. 3, no. 9, pp. 710–717. doi: 10.1038/nrm911.

18. Gillian B., Brian O.S., Stephen J.Y. 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.
19. Wróblewski F. The clinical significance of alterations in transaminase activities of serum and other body fluids. *Adv. Clin. Chem.*, 1958, vol. 1, pp. 313–351. doi: 10.1016/S0065-2423(08)60362-5.
20. Rej R. Aminotransferases in disease. *Clin. Lab. Med.*, 1989, vol. 9, no. 4, pp. 667–687. doi: 10.1016/S0272-2712(18)30598-5.
21. Dufour D.R., Lott J.A., Nolte F.S., Gretch D.R., Koff R.S. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin. Chem.*, 2000, vol. 46, no. 12, pp. 2027–2049. doi: 10.1093/clinchem/46.12.2027.
22. Kaplan M., Hammerman C. Understanding severe hyperbilirubinemia and preventing kernicterus: Adjuncts in the interpretation of neonatal serum bilirubin. *Clin. Chim. Acta*, 2005, vol. 356, nos. 1–2, pp. 9–21. doi: 10.1016/j.cccn.2005.01.008.
23. Vitek L., Ostrow J.D. Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects. *Curr. Pharm. Des.*, 2009, vol. 15, no. 25, pp. 2869–2883. doi: 10.2174/138161209789058237.
24. Woreta T.A., Alqahtani S.A. Evaluation of abnormal liver tests. *Med. Clin. North Am.*, 2014, vol. 98, no. 1, pp. 1–16. doi: 10.1016/j.mcna.2013.09.005.
25. Spinella R., Sawhney R., Jalan R. Albumin in chronic liver disease: Structure, functions and therapeutic implications. *Hepatol. Int.*, 2016, vol. 10, no. 1, pp. 124–132. doi: 10.1007/s12072-015-9665-6.
26. Matsuura K., Canfield K., Feng W., Kurokawa M. Metabolic regulation of apoptosis in cancer. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 2016, vol. 327, pp. 43–87. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.06.006.
27. Manning B.D., Cantley L.C. AKT/PKB signaling: Navigating downstream. *Cell*, 2007, vol. 129, no. 7, pp. 1261–1274. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
28. Plas D.R., Thompson C.B. Akt-dependent transformation: There is more to growth than just surviving. *Oncogene*, 2005, vol. 24, no. 50, pp. 7435–7442. doi: 10.1038/sj.onc.1209097.
29. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: Apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, 1998, vol. 3, no. 11, pp. 697–707. doi: 10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x.
30. Kuida K. Caspase-9. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2000, vol. 32, no. 2, pp. 121–124. doi: 10.1016/s1357-2725(99)00024-2.
31. Liu X., Zou H., Widlak P., Garrard W., Wang X. Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease): Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, no. 20, pp. 13836–13840. doi: 10.1074/jbc.274.17.11549.
32. Insel P.A., Zhang L., Murray F., Yokouchi H., Zambon A.C. Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol.*, 2012, vol. 204, no. 2, pp. 277–287. doi: 10.1111/j.1748-1716.2011.02273.x.
33. Harrison F.E., May J.M. Vitamin C function in the brain: Vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radicals Biol. Med.*, 2009, vol. 46, no. 6, pp. 719–730. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.12.018.
34. Manfredini S., Pavan B., Vertuani S., Scaglianti M., Compagnone D., Biondi C., Scatturin A., Tanganelli S., Ferraro L., Prasad P., Dalpiaz A. Design, synthesis and activity of ascorbic acid prodrugs of nipecotic, kynurenic and diclophenamic acids, liable to increase neurotropic activity. *J. Med. Chem.*, 2002, vol. 45, no. 3, pp. 559–562. doi: 10.1021/jm015556r.
35. Manfredini S., Vertuani S., Pavan B., Vitali F., Scaglianti M., Bortolotti F., Biondi C., Scatturin A., Prasad P., Dalpiaz A. Design, synthesis and in vitro evaluation on HRPE cells of ascorbic and 6-bromoascorbic acid conjugates with neuroactive molecules. *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, vol. 12, no. 20, pp. 5453–5463. doi: 10.1016/j.bmc.2004.07.043.
36. 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.

37. 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.

Для цитирования: Парфенов А.А., Выштакалюк А.Б., Галяметдинова И.В., Семёнов В.Э., Зобов В.В. Антиапоптозный механизм реализации гепатопротекторного эффекта производных пиримидина в исследованиях *in vivo* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2022. – Т. 164, кн. 2. – С. 231–248. – doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.231-248.

For citation: Parfenov A.A., Vyshtakalyuk A.B., Galyametdinova I.V., Semenov V.E., Zobov V.V. Anti-apoptosis mechanism of the hepatoprotective effect of pyrimidine derivatives in *in vivo* studies. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 2, pp. 231–248. doi: 10.26907/2542-064X.2022.2.231-248. (In Russian)