

УДК 616.36-002:615.276-085:544.127:547.854.9:577.164.1

DOI: 10.37482/2687-1491-Z074

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ ТАУТОМЕРОВ ОРОТАТ-АНИОНА В КОРРЕКЦИИ ЛЕКАРСТВЕННО-ОБУСЛОВЛЕННОГО ГЕПАТИТА У КРЫС

К.А. Пазиненко* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3390-4343>

Н.Н. Чучкова* ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7777-6825>

М.В. Сметанина* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1801-5353>

*Ижевская государственная медицинская академия
(Удмуртская Республика, г. Ижевск)

Цель работы – сравнительное экспериментальное исследование противовоспалительных эффектов таутомерных форм оротовой кислоты в коррекции лекарственно-обусловленного гепатита у крыс. **Материалы и методы.** Крысы (*Rattus norvegicus* Berk.) были разделены на 5 групп: интактные ($n = 10$); животные с лекарственно-обусловленным гепатитом ($n = 15$); животные, которым для коррекции лекарственно-обусловленного гепатита вводили таутомеры оротовой кислоты: исходную оксоформу ($n = 5$), гидроксиформу ($n = 5$) и дигидроксиформу ($n = 5$) – в дозе 0,5 г на 1 кг массы тела в сутки в течение 14 дней. Таутомеры оротовой кислоты были получены методом механоактивации в шаровой планетарной мельнице АГО-2С в течение 1 ч (гидроксиформа) и 6 ч (дигидроксиформа). В крови животных всех экспериментальных групп определяли содержание лейкоцитов, гранулоцитов, лимфоцитов, моноцитов. Срезы печени крыс окрашивали гематоксилином и эозином для оценки гисто- и цитоструктуры ткани и иммуногистохимически с помощью набора моноклональных антител – для выявления экспрессии маркера CD68+ макрофагов. **Результаты.** Установлено, что при коррекции лекарственно-обусловленного гепатита гидроксиформой оротовой кислоты в крови крыс снижалась выраженность лейко- и моноцитоза, восстанавливалось количество лимфоцитов. Количество CD68+ макрофагов, обладающих провоспалительным фенотипом, уменьшалось в печени крыс, получавших гидроксиформу оротовой кислоты (в 1,32 раза; $p = 0,019$), но не менялось при введении оксо- и дигидроксиформ. Интенсивность экспрессии продукта реакции снижалась в 1,5 раза в группе с введением исходного препарата и в 1,9 раза – у животных с введением механоактивированных препаратов ($p = 0,0001$). Таким образом, полученные данные указывают на выраженную противовоспалительную активность механоактивированной формы оротовой кислоты – гидрокситаутомера, что может послужить обоснованием для его клинической апробации в качестве гепатопротекторного средства.

Ключевые слова: таутомеры оротовой кислоты, лекарственно-обусловленный гепатит, клетки крови, клетки Купфера, CD68+ макрофаги печени, гепатоциты.

Ответственный за переписку: Чучкова Наталья Николаевна, адрес: 426056, Удмуртская Республика, г. Ижевск, ул. Коммунаров, д. 281; e-mail: mig05@inbox.ru

Для цитирования: Пазиненко К.А., Чучкова Н.Н., Сметанина М.В. Противовоспалительный эффект таутомеров оротат-аниона в коррекции лекарственно-обусловленного гепатита у крыс // Журн. мед.-биол. исследований. 2021. Т. 9, № 4. С. 366–373. DOI: 10.37482/2687-1491-Z074

Оротовая кислота (ОК) оказывает разнообразное лекарственное действие, в т. ч. гепатопротекторный эффект, за счет оротат-аниона [1], входящего в состав препаратов. Оротат-анион способен находиться в трех изомерных вариантах – оксо-, гидроксид- и дигидроксиформе – в зависимости от ряда условий, например pH раствора. В препарате «Калия оротат» действующее вещество (оротовая кислота) находится в оксоформе. Получение метастабильных устойчивых таутомерных гидроксид- и дигидроксиформ в сухом виде возможно с помощью метода механоактивации [2]. В ряде работ показано активное биологическое действие механоактивированных таутомерных форм препаратов, в т. ч. иммуномодулирующее [3–6].

Иммунные клетки печени – клетки Купфера – являются обязательными участниками воспалительного процесса, обеспечивая клеточно-тканевый гомеостаз в органе. Макрофаги занимают критическое положение в патогенезе повреждения печени, при котором инфильтрация ими рассматривается как основной признак как острых, так и хронических заболеваний железы. В последние годы была выявлена значительная гетерогенность печеночных макрофагов, выполняющих различные функции [7–10]. Известное разделение клеток Купфера на фенотипы M1 или M2 в зависимости от высокого разнообразия высвобождения ими цитокинов, присутствия маркеров клеточной поверхности, различия транскрипционных профилей [11, 12] предполагает их адаптацию к изменившемуся местному микроокружению во время прогрессирования заболевания. В большинстве случаев в процессе повреждения печени макрофагам M1 отводят провоспалительную роль, в то время как макрофагам M2 – противовоспалительную, а также профибротическую. Динамические взаимодействия между клеточными популяциями в печени являются основой поддержания гомеостаза в органе и организме в целом [13].

Целью данного исследования стало исследование противовоспалительных свойств

таутомеров ОК в коррекции лекарственно-обусловленного гепатита (ЛОГ).

Материалы и методы. Работа выполнена на крысах *Rattus norvegicus* Berk. ($n = 25$) с массой тела 220 ± 20 г в осенне-зимний период. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава РФ (протокол № 656 от 23.04.2019 г.). Первоначально крысы были разделены на две экспериментальные группы: животные интактного контроля ($n = 10$), которые содержались в условиях вивария на стандартном рационе питания (экструдированный корм, свободный доступ к воде); группа сравнения ($n = 30$), животным из которой формировали ЛОГ введением метионина (DL-метионин кормовой, Бельгия) с пищей (0,15 г на 100 г массы животного) в течение 30 дней. Впоследствии 15 животных из группы сравнения оставались без введения препарата, а 15 животным вводили перорально порошок калия оротата в дозе 0,5 г на 1 кг массы тела в течение 2 недель, формировали три подгруппы по 5 животных, получавших исходную оксоформу калия оротата, гидроксидформу, дигидроксиформу ОК. Таутомерные формы – гидроксид- и дигидроксиформы – получали методом механоактивации исходного (оксоформа) препарата «Калия оротат» (ОАО АВВА РУС, Россия) в шаровой планетарной мельнице АГО-2С в течение 1 и 6 ч соответственно.

Взятие материала и выведение животных из эксперимента осуществляли согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ Минвуза СССР от 13.11.1984 г. № 742) и ГОСТ 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур». Кровь для клинического анализа забирали под эфирным наркозом путем транскардиальной пункции, оценивали содержание лейкоцитов, гранулоцитов, лимфоцитов, моноцитов. Исследование проводили с использованием анализаторов Olympus AU-48 и Alifax Roller 10 Plus.

После эвтаназии эфирным наркозом у животного забирали печень для последующего гистологического исследования. Осуществляли заливку печени в парафиновую среду Histomix (BioVitrum), с блоков готовили серийные срезы, каждый 5-й срез брали для последующего изучения. Часть гистологических препаратов окрашивали гематоксилином и эозином для оценки гисто- и цитоструктуры ткани, другую часть – окрашивали иммуногистохимически с помощью набора антител для выявления экспрессии маркера макрофагов CD68 (мышинные IgG, 1:200; Cell Marque Corporation, США). После использования первых антител срезы докрашивали антителами, ассоциированными с Alexa Fluor 647 (антимышинные IgG, 1:300; Abscam, США). На единицу площади ткани печени в 100 мкм² рассчитывали количество гепатоцитов и клеток Купфера при окраске гематоксилином и эозином. Количество CD68-позитивных макрофагов оценивали в поле зрения микроскопа при 400-кратном увеличении (в 10 случайных полях зрения на каждом 5-м срезе препарата); измерение интенсивности свечения иммунореактивного продукта (в условных единицах) проводили на фронтальных срезах при помощи морфометрических программ Image ProInsite 8.0, Image ProPlus 6.0 (Media Cybernetics, США). Срезы изучали с использованием люминесцентного микроскопа Nikon ECLIPSE E200.

Статистическую обработку данных осуществляли при помощи пакета программ Statistica 10.0 с определением средней арифметической (M) и ее ошибки (m). Результаты исследования были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка. Данные двух групп из совокупностей сравнивали при помощи двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с использованием программного обеспечения SPSS. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. У экспериментальных животных с ЛОГ в крови повысилось количество лейкоцитов и моноцитов, на 19,2 % снизилось число лимфоцитов ($p = 0,008$), обнаружива-

лась тенденция к росту общего белка крови – превышение показателя составило 20,18 % ($p = 0,05$; см. таблицу).

Динамика воспалительных проявлений в крови после коррекции ЛОГ препаратами ОК, в состав которых входили различные таутомерные формы оротат-аниона, была различной. Выявлено, что принадлежность к группе оказывала статистически значимое влияние на уровень лейкоцитов (анализ ANOVA: $F(3, 32) = 5,798$, $p = 0,021$; частичная эта-квадрат равна 0,537) и гранулоцитов ($F(3, 32) = 2,899$, $p = 0,001$; частичная эта-квадрат равна 0,421). Так, количество лейкоцитов снизилось до уровня интактного контроля только у крыс, которым вводилась гидроксиформа, тогда как у крыс с введением оксо- и дигидроксиформ данный показатель повысился на 20,9 и 32,7 % соответственно. В группе с введением гидрокситаутомера уменьшилась выраженность грануло- и лимфоцитоза.

Количество моноцитов в крови животных с ЛОГ после коррекции оксоформой повысилось в 1,56 раза ($p < 0,05$ при сравнении с группой с ЛОГ), не изменялось при введении дигидроксиформы и обнаруживало тенденцию к снижению (на 11,5 %) при введении гидроксиформы ОК. Концентрация С-реактивного белка восстановилась до уровня интактного контроля у животных всех экспериментальных групп с введением таутомеров оротат-аниона.

Таким образом, воспалительные явления, вызванные ЛОГ и регистрируемые по данным клинического анализа крови, после коррекции препаратами, содержащими различные формы таутомеров ОК, купируются при использовании гидроксиформы препарата (механоактивация в течение 1 ч), но сохраняются при использовании оксоформы (исходный препарат) либо дигидроксиформы (механоактивация в течение 6 ч) ОК.

ЛОГ сопровождался также морфологическими изменениями в печени крыс (см. таблицу). Так, отмечалось появление лейко-лимфоцитарных скоплений различной величины вокруг порталных трактов, дистрофически из-

ДАнные КЛИНИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КРОВИ
И ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕЧЕНИ КРЫС,
УЧАСТВОВАВШИХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ, $M \pm m$ (min–max)

DATA OF COMPLETE BLOOD COUNT AND HISTOLOGICAL EXAMINATION OF LIVER
OF RATS INCLUDED IN THE EXPERIMENT, $M \pm m$ (min–max)

Показатель	Интактная группа (n = 10)	Группа с ЛОГ (n = 15)	Группы с ЛОГ и введением таутомерных форм оротат-аниона		
			оксоформы (n = 5)	гидроксиформы (n = 5)	дигидроксиформы (n = 5)
<i>Клинический анализ крови</i>					
Количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л	10,79±2,24 (2,2–18,3)	13,75±1,76# (7,8–19,8)	16,62±2,3* (11,9–21,2)	10,02±1,09* (9,0–13,8)	18,25±2,62* (9,4–22,1)
Количество гранулоцитов, 10 ⁹ /л	3,79±0,42 (2,15–4,62)	5,22±1,03# (3,5–7,2)	7,8±2,03* (2,7–8,8)	2,54±0,39* (1,5–4,0)	4,82±1,34* (1,8–8,6)
Количество лимфоцитов, 10 ⁹ /л	6,51±0,90 (3,75–7,21)	5,26±0,69 (4,2–5,9)	6,96±0,98 (6,3–10,1)	6,8±1,04 (4,5–9,2)	11,9±2,08*# (6,5–17,4)
Количество моноцитов, 10 ⁹ /л	0,63±0,23 (0,54–1,26)	1,92±0,24# (1,2–3,1)	2,99±0,99* (1,3–8,8)	1,7±0,36 (0,6–2,8)	2,01±0,51 (1,3–4,3)
С-реактивный белок, г/л	64,82±2,52 (55,4–70,1)	77,90±2,19# (66,56–84,6)	68,7±3,09* (64,9–78,8)	64,5±2,45* (59,9–72,6)	65,9±3,28* (62,4–73,3)
<i>Гистологическое исследование печени</i>					
Количество гепатоцитов, шт.	448,1±9,2 (381–490)	256,2±4,0# (233–276)	304,9±10,1*# (257–366)	378,6±8,4*# (346–410)	389,0±17,2*# (341–465)
Количество клеток Купфера, шт.	130,32±1,4 (115–139)	159,48±4,18# (132–190)	155,7±2,6# (129–199)	164,34±4,2# (115–222)	148,68±2,4*# (129–175)
Количество CD68+ клеток, шт.	103,4±13,13 (63–156)	140,3±11,5# (87–253)	149,17±31,31# (72–251)	106,0±12,47* (52–175)	115,0±2,22* (107–125)
Общая интенсивность свечения CD68+ клеток, у. е.	35,44±0,39 (15,8–96,2)	49,40±0,54# (16,19–93,63)	31,71±0,26* (13,72–61,86)	24,54±0,36*# (11,31–66,88)	25,68±1,25*# (19,99–96,2)

Примечание. Различия статистически значимы ($p < 0,05$): * – в сравнении с группой с ЛОГ; # – в сравнении с интактной группой.

мененных гепатоцитов. Количество гепатоцитов при ЛОГ снизилось на 42,83 % ($p = 0,0001$), клеток Купфера – повысилось на 22,38 % ($p = 0,044$). Объем популяции клеток CD68+, выявляемых иммуногистохимически, увеличился на 34,91 % ($p = 0,049$), интенсивность свечения продукта реакции повысилась в 1,4 раза ($p = 0,0001$). Введение таутомерных форм ОК животным с ЛОГ сопровождалось улучшением морфометрических показателей, но степень выраженности изменений в различных группах была неодинакова. Так, по сравнению с крысами с ЛОГ, количество гепатоцитов повысилось

на 19 % в группе с введением исходной формы ОК, на 47,8 и 51,8 % – в группах животных, получавших гидрокси- и дигидроксиформы соответственно. Количество клеток Купфера, выявляемых при общей гистологической окраске гематоксилином и эозином, у крыс, получавших препараты, практически не изменилось в сравнении с группой ЛОГ, незначительное его снижение (на 6,8 %; $p = 0,046$) отмечалось только при введении дигидроксиформы ОК.

Наиболее показательна была динамика количества CD68-позитивных клеток в печени крыс при коррекции ЛОГ таутомерами ОК.

Изменения характеризовались разнонаправленностью в зависимости от экспериментальной группы. Количество провоспалительных макрофагов с фенотипом M1 снизилось в 1,32 раза в группе животных, получавших гидроксиформу ОК, в 1,22 раза – в группе с введением дигидроксиформы ($p = 0,019$), не менялось при использовании оксоформы ОК. Интенсивность свечения продукта реакции снизилась в 1,5 раза в группе с введением исходного препарата и в 1,9 раз – у животных, получавших механоактивированные препараты ($p = 0,0001$). У животных, которым с целью коррекции ЛОГ вводились таутомеры ОК, наблюдались статистически значимые различия в количественном представительстве макрофагов CD68+ согласно анализу ANOVA ($F(4, 4019) = 462,81$; $p = 0,0001$).

Обсуждение. В основе эффективности любого лекарственного средства лежат его физическо-химические свойства (например, дисперсность, вязкость, растворимость), расположение атомов в молекуле, что обуславливает его взаимодействие с клеточной мембраной, возможность активного поступления внутрь клетки и включение в метаболические реакции организма. Так, известны различия фармакологического действия препаратов в зависимости от их стереоспецифичности [14–16], изменения фармакофорной части и функционально-активных групп молекул [17–19].

Полученные нами результаты демонстрируют различия в клиническом анализе крови и составе макрофагальной популяции клеток печени с фенотипом CD68+ в процессе купирования ЛОГ, что свидетельствует о разном биологическом эффекте действия таутомеров ОК. Наиболее значимая коррекция воспали-

тельных изменений у животных с ЛОГ препаратом, содержащим гидроксиформу ОК, полученную механоактивацией исходного порошка в течение 1 ч, демонстрирует преимущество данного варианта. Более ранние исследования механоактивированных препаратов ОК (магния оротат), проведенные на изолированных клетках (эритроциты, буккальные эпителиоциты), показали аналогичный эффект [20]. Преимущество в действии механоактивированных препаратов (главным образом, гидроксиформы) можно объяснить изменившимися в результате механоактивации физико-химическими свойствами таутомеров. Так, таутомеры гидроксид- и дигидроксидформ магния оротата характеризуются повышением дисперсности препарата (особенно гидроксиформы), что обуславливает более высокую скорость растворения и растворимость в воде и водных растворах [3]; методами рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии и NEXAFS (near edge X-ray absorption fine structure) выявлено увеличение числа активных функциональных группировок, присутствующих в гидроксиформе таутомера [2, 3].

Таким образом, продемонстрированные эффекты (снижение лейко- и моноцитоза, нормализация количества лимфоцитов и С-реактивного белка, уменьшение объема популяции CD68+ макрофагов печени, интенсивности их свечения) указывают на выраженную противовоспалительную активность механоактивированной формы ОК – гидрокситаутомера, что может послужить обоснованием для его клинической апробации в качестве гепатопротекторного средства.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Громова О.А., Торшин И.Ю., Калачева А.Г. Метаболомный компендиум по магния оротату // Эффектив. фармакотерапия. 2015. № 44. С. 14–26.
2. Патент № 2 541 806 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/4166. Способ получения препарата, содержащего аморфно-кристаллические соли оротовой кислоты: № 2013146164/15; заявл. 16.10.2013; опубл. 20.02.2015 / Аксенова В.В., Михайлова С.С., Собенникова М.В., Мухгалин В.В., Ладьянов В.И., Канунников М.М., Чучкова Н.Н., Соловьев А.А., Пермяков А.А., Сметанина М.В. 12 с.

3. Канунникова О.М., Карбань О.В., Чучкова Н.Н., Мухгалин В.В., Комиссаров В.Б., Гильмутдинов Ф.З. Получение, физико-химические и биологические свойства таутомерных наноформ препарата «Магнерот» // Нанотехнологии: наука и производство. 2014. № 4. С. 80–88.
4. de Cássia Zaghi Compri J., Andres Felli V.M., Lourenço F.R., Takatsuka T., Fotaki N., Löbenberg R., Bou-Chacra N.A., Barros de Araujo G.L. Highly Water-Soluble Orotic Acid Nanocrystals Produced by High-Energy Milling // *J. Pharm. Sci.* 2019. Vol. 108, № 5. P. 1848–1856. DOI: [10.1016/j.xphs.2018.12.015](https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.12.015)
5. Hassani A., Hussain S.A., Abdullah N., Kamarudin S., Rosli R. Antioxidant Potential and Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity of Orotic Acid-Loaded Gum Arabic Nanoparticles // *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 2019. Vol. 20, № 2. Art. № 53. DOI: [10.1208/s12249-018-1238-2](https://doi.org/10.1208/s12249-018-1238-2)
6. Чучкова Н.Н., Тукмачева К.А., Сметанина М.В., Канунникова О.М., Сергеев В.Г., Чучков В.М., Кормилина Н.В. Характеристика популяции CD68+ клеток тимуса крыс при введении таутомерных форм магния оротата на фоне моделируемого дефицита магния // *Журн. анатомии и гистопатологии.* 2019. Т. 8, № 1. С. 82–88. DOI: [10.18499/2225-7357-2019-8-1-82-88](https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-1-82-88)
7. Ju C., Tacke F. Hepatic Macrophages in Homeostasis and Liver Diseases: From Pathogenesis to Novel Therapeutic Strategies // *Cell. Mol. Immunol.* 2016. Vol. 13, № 3. P. 316–327. DOI: [10.1038/cmi.2015.104](https://doi.org/10.1038/cmi.2015.104)
8. Li P., He K., Li J., Liu Z., Gong J. The Role of Kupffer Cells in Hepatic Diseases // *Mol. Immunol.* 2017. Vol. 85. P. 222–229. DOI: [10.1016/j.molimm.2017.02.018](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.018)
9. Sato K., Hall C., Glaser S., Francis H., Meng F., Alpini G. Pathogenesis of Kupffer Cells in Cholestatic Liver Injury // *Am. J. Pathol.* 2016. Vol. 186, № 9. P. 2238–2247. DOI: [10.1016/j.ajpath.2016.06.003](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.003)
10. van der Heide D., Weiskirchen R., Bansal R. Therapeutic Targeting of Hepatic Macrophages for the Treatment of Liver Diseases // *Front. Immunol.* 2019. Vol. 10. Art. № 2852. DOI: [10.3389/fimmu.2019.02852](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02852)
11. Tian S., Chen S.Y. Macrophage Polarization in Kidney Diseases // *Macrophage (Houst.)*. 2015. Vol. 2, № 1. Art. № e679. DOI: [10.14800/macrophage.679](https://doi.org/10.14800/macrophage.679)
12. You Q., Holt M., Yin H., Li G., Hu C.-J., Ju C. Role of Hepatic Resident and Infiltrating Macrophages in Liver Repair After Acute Injury // *Biochem. Pharmacol.* 2013. Vol. 86. P. 836–843. DOI: [10.1016/j.bcp.2013.07.006](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.006)
13. Kubers P., Jenne C. Immune Responses in the Liver // *Annu. Rev. Immunol.* 2018. Vol. 36. P. 247–277. DOI: [10.1146/annurev-immunol-051116-052415](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052415)
14. Brocks D.R., Mehvar R. Stereoselectivity in the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of the Chiral Antimalarial Drugs // *Clin. Pharmacokinet.* 2003. Vol. 42, № 15. P. 1359–1382. DOI: [10.2165/00003088-200342150-00004](https://doi.org/10.2165/00003088-200342150-00004)
15. Gregg R.A., Baumann M.H., Partilla J.S., Bonano J.S., Vouga A., Tallarida C.S., Velvadapu V., Smith G.R., Peet M.M., Reitz A.B., Negus S.S., Rawls S.M. Stereochemistry of Mephedrone Neuropharmacology: Enantiomer-Specific Behavioural and Neurochemical Effects in Rats // *Br. J. Pharmacol.* 2015. Vol. 172, № 3. P. 883–894. DOI: [10.1111/bph.12951](https://doi.org/10.1111/bph.12951)
16. Ohkura K., Tabata A., Uto Y., Hori H. Correlation Between Radiosensitizing Activity and the Stereo-Structure of the TX-2036 Series of Molecules // *Anticancer Res.* 2019. Vol. 39, № 8. P. 4479–4483. DOI: [10.21873/anticancerres.13622](https://doi.org/10.21873/anticancerres.13622)
17. Martins M.L., Ignazzi R., Eckert J., Watts B., Kaneno R., Zambuzzi W.F., Daemen L., Saeki M.J., Bordallo H.N. Restricted Mobility of Specific Functional Groups Reduces Anti-Cancer Drug Activity in Healthy Cells // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. Art. № 22478. DOI: [10.1038/srep22478](https://doi.org/10.1038/srep22478)
18. Ravishankar D., Salamah M., Akimbaev A., Williams H.F., Albadawi D.A.I., Vaiyapuri R., Greco F., Osborn H.M.I., Vaiyapuri S. Impact of Specific Functional Groups in Flavonoids on the Modulation of Platelet Activation // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. Art. № 9528. DOI: [10.1038/s41598-018-27809-z](https://doi.org/10.1038/s41598-018-27809-z)
19. Ramadan W.S., Saleh E.M., Menon V., Vazhappilly C.G., Abdu-Allah H.H.M., El-Shorbaji A.A., Mansour W., El-Awady R. Induction of DNA Damage, Apoptosis and Cell Cycle Perturbation Mediate Cytotoxic Activity of New 5-Aminosalicylate-4-Thiazolinone Hybrid Derivatives // *Biomed. Pharmacother.* 2020. Vol. 131. Art. № 110571. DOI: [10.1016/j.biopha.2020.110571](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110571)
20. Чучкова Н.Н., Канунников М.М., Сметанина М.В., Комиссаров В.Б., Соловьев А.А. Сравнительное исследование эффективности применения таутомеров оротата магния для компенсации дефицита магния. Ч. I. Влияние таутомеров оротата магния на изолированные клетки лабораторных животных и человека // *Урал. мед. журн.* 2018. № 4(159). С. 141–146.

References

1. Gromova O.A., Torshin I.Yu., Kalacheva A.G. Metabolomnyy kompendium po magniya orotatu [Metabolome Compendium on Magnesium Orotate]. *Effektivnaya farmakoterapiya*, 2015, no. 44, pp. 14–26.
2. Aksenova V.V., Mikhaylova S.S., Sobennikova M.V., Mukhgalin V.V., Lad'yanov V.I., Kanunnikov M.M., Chuchkova N.N., Solov'ev A.A., Permyakov A.A., Smetanina M.V. *Method of Obtaining Preparation, Which Contains Amorphous-Crystalline Salts of Orotic Acid*. Patent RF no. 2541806, 2015 (in Russ.).
3. Kanunnikova O.M., Karban' O.V., Chuchkova N.N., Mukhgalin V.V., Komissarov V.B., Gil'mutdinov F.Z. Poluchenie, fiziko-khimicheskie i biologicheskie svoystva tautomernykh nanoform preparata "Magnerot" [Preparation, Physical-Chemical and Biological Properties of Tautomeric Nanofoms of the Preparation "Magnerot"]. *Nanotekhnologii: nauka i proizvodstvo*, 2014, no. 4, pp. 80–88.
4. de Cássia Zaghi Compri J., Andres Felli V.M., Lourenço F.R., Takatsuka T., Fotaki N., Löbenberg R., Bou-Chacra N.A., Barros de Araujo G.L. Highly Water-Soluble Orotic Acid Nanocrystals Produced by High-Energy Milling. *J. Pharm. Sci.*, 2019, vol. 108, no. 5, pp. 1848–1856. DOI: [10.1016/j.xphs.2018.12.015](https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.12.015)
5. Hassani A., Hussain S.A., Abdullah N., Kamarudin S., Rosli R. Antioxidant Potential and Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity of Orotic Acid-Loaded Gum Arabic Nanoparticles. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 2019, vol. 20, no. 2. Art. no. 53. DOI: [10.1208/s12249-018-1238-2](https://doi.org/10.1208/s12249-018-1238-2)
6. Chuchkova N.N., Tukmachova K.A., Smetanina M.V., Kanunnikova O.M., Sergeev V.G., Chuchkov V.M., Kormilina N.V. Characteristics of the Population of the Rat Thymus CD68+ Cells in Response to Tautomeric Forms of Magnesium Orotate Introduction Under Simulated Magnesium Deficiency. *J. Anat. Histopathol.*, 2019, vol. 8, no. 1, pp. 82–88 (in Russ.). DOI: [10.18499/2225-7357-2019-8-1-82-88](https://doi.org/10.18499/2225-7357-2019-8-1-82-88)
7. Ju C., Tacke F. Hepatic Macrophages in Homeostasis and Liver Diseases: From Pathogenesis to Novel Therapeutic Strategies. *Cell. Mol. Immunol.*, 2016, vol. 13, no. 3, pp. 316–327. DOI: [10.1038/cmi.2015.104](https://doi.org/10.1038/cmi.2015.104)
8. Li P., He K., Li J., Liu Z., Gong J. The Role of Kupffer Cells in Hepatic Diseases. *Mol. Immunol.*, 2017, vol. 85, pp. 222–229. DOI: [10.1016/j.molimm.2017.02.018](https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.018)
9. Sato K., Hall C., Glaser S., Francis H., Meng F., Alpini G. Pathogenesis of Kupffer Cells in Cholestatic Liver Injury. *Am. J. Pathol.*, 2016, vol. 186, no. 9, pp. 2238–2247. DOI: [10.1016/j.ajpath.2016.06.003](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.06.003)
10. van der Heide D., Weiskirchen R., Bansal R. Therapeutic Targeting of Hepatic Macrophages for the Treatment of Liver Diseases. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10. Art. no. 2852. DOI: [10.3389/fimmu.2019.02852](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02852)
11. Tian S., Chen S.Y. Macrophage Polarization in Kidney Diseases. *Macrophage (Houst.)*, 2015, vol. 2, no. 1. Art. no. e679. DOI: [10.14800/macrophage.679](https://doi.org/10.14800/macrophage.679)
12. You Q., Holt M., Yin H., Li G., Hu C.-J., Ju C. Role of Hepatic Resident and Infiltrating Macrophages in Liver Repair After Acute Injury. *Biochem. Pharmacol.*, 2013, vol. 86, no. 6, pp. 836–843. DOI: [10.1016/j.bcp.2013.07.006](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.07.006)
13. Kubers P., Jenne C. Immune Responses in the Liver. *Annu. Rev. Immunol.*, 2018, vol. 36, pp. 247–277. DOI: [10.1146/annurev-immunol-051116-052415](https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052415)
14. Brocks D.R., Mehvar R. Stereoselectivity in the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of the Chiral Antimalarial Drugs. *Clin. Pharmacokinet.*, 2003, vol. 42, no. 15, pp. 1359–1382. DOI: [10.2165/00003088-200342150-00004](https://doi.org/10.2165/00003088-200342150-00004)
15. Gregg R.A., Baumann M.H., Partilla J.S., Bonano J.S., Vouga A., Tallarida C.S., Velvadapu V., Smith G.R., Peet M.M., Reitz A.B., Negus S.S., Rawls S.M. Stereochemistry of Mephedrone Neuropharmacology: Enantiomer-Specific Behavioural and Neurochemical Effects in Rats. *Br. J. Pharmacol.*, 2015, vol. 172, no. 3, pp. 883–894. DOI: [10.1111/bph.12951](https://doi.org/10.1111/bph.12951)
16. Ohkura K., Tabata A., Uto Y., Hori H. Correlation Between Radiosensitizing Activity and the Stereo-Structure of the TX-2036 Series of Molecules. *Anticancer Res.*, 2019, vol. 39, no. 8, pp. 4479–4483. DOI: [10.21873/anticancer.13622](https://doi.org/10.21873/anticancer.13622)
17. Martins M.L., Ignazzi R., Eckert J., Watts B., Kaneno R., Zambuzzi W.F., Daemen L., Saeki M.J., Bordallo H.N. Restricted Mobility of Specific Functional Groups Reduces Anti-Cancer Drug Activity in Healthy Cells. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6. Art. no. 22478. DOI: [10.1038/srep22478](https://doi.org/10.1038/srep22478)
18. Ravishankar D., Salamah M., Akimbaev A., Williams H.F., Albadawi D.A.I., Vaiyapuri R., Greco F., Osborn H.M.I., Vaiyapuri S. Impact of Specific Functional Groups in Flavonoids on the Modulation of Platelet Activation. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1. Art. no. 9528. DOI: [10.1038/s41598-018-27809-z](https://doi.org/10.1038/s41598-018-27809-z)
19. Ramadan W. S., Saleh E.M., Menon V., Vazhappilly C.G., Abdu-Allah H.H.M., El-Shorbaji A.A., Mansour W., El-Awady R. Induction of DNA Damage, Apoptosis and Cell Cycle Perturbation Mediate Cytotoxic Activity of New 5-Aminosalicylate-4-Thiazolinone Hybrid Derivatives. *Biomed. Pharmacother.*, 2020, vol. 131. Art. no. 110571. DOI: [10.1016/j.biopha.2020.110571](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110571)

20. Chuchkova N.N., Kanunnikov M.M., Smetanina M.V., Komissarov V.B., Solov'ev A.A. Sravnitel'noe issledovanie effektivnosti primeneniya tautomerov orotata magniya dlya kompensatsii defitsita magniya. Ch. I. Vliyaniye tautomerov orotata magniya na izolirovannyye kletki laboratornykh zhivotnykh i cheloveka [Comparative Study of the Effectiveness of Using Magnesium Orotate Tautomers to Compensate for Magnesium Deficiency. Pt. 1. Effect of Magnesium Orotate Tautomers on Isolated Cells of Laboratory Animals and Humans]. *Ural'skiy meditsinskiy zhurnal*, 2018, no. 4, pp. 141–146.

DOI: 10.37482/2687-1491-Z074

*Kseniya A. Pazinenko** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3390-4343>
*Natal'ya N. Chuchkova** ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7777-6825>
*Marina V. Smetanina** ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1801-5353>

*Izhevsk State Medical Academy
(Izhevsk, Udmurt Republic, Russian Federation)

TAUTOMERS OF THE OROTATE ANION HAVE ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS IN THE CORRECTION OF DRUG-INDUCED HEPATITIS IN RATS

The **purpose** of this paper was to conduct a comparative experimental study of the anti-inflammatory effects of tautomeric forms of orotic acid in the correction of drug-induced hepatitis in rats. **Materials and Methods.** A total of 40 rats (*Rattus norvegicus* Berk.) were randomly divided into 5 groups: control group ($n = 10$); intervention group with drug-induced hepatitis ($n = 15$); animals with drug-induced hepatitis who were injected with orotic acid (OA) tautomers: initial oxo-form ($n = 5$), hydroxy-form ($n = 5$) and dihydroxy-form ($n = 5$) at a dose of 0.5 g/kg body weight a day in the course of 14 days. The tautomers were obtained by mechanical activation in a planetary ball mill AGO-2C for 1 (hydroxy-form) and 6 (dihydroxy-form) hours. In the blood of animals of all experimental groups, the content of leukocytes, granulocytes, lymphocytes, and monocytes was determined. Liver sections were stained with hematoxylin and eosin to assess the histo- and cytostructure of the tissues, and immunohistochemically using a set of monoclonal antibodies to detect the expression of the CD68+ macrophage marker. **Results.** It was found that when correcting drug-induced hepatitis with the hydroxy-form of OA, the severity of leuko- and monocytosis decreased and the number of lymphocytes was restored. The number of CD68+ macrophages with a pro-inflammatory phenotype decreased in the group receiving the hydroxy-form of OA (by a factor of 1.32; $p = 0.019$), but remained unchanged at the administration of oxo- and dihydroxy-forms of OA. The intensity of reaction product expression decreased by a factor of 1.5 in the group administered with the initial drug and by a factor of 1.9 in animals administered with mechanically activated drugs ($p = 0.0001$). Thus, the obtained data indicate a pronounced anti-inflammatory activity of the hydroxy-form of OA, which can substantiate its use as a hepatoprotective agent.

Keywords: tautomeric forms of orotic acid, drug-induced hepatitis, blood cells, Kupffer cells, CD68+ liver macrophages, hepatocytes.

Поступила 11.05.2021

Принята 01.09.2021

Received 11 May 2021

Accepted 1 September 2021

Corresponding author: Natal'ya Chuchkova, address: ul. Kommunarov 281, Izhevsk, 426056, Udmurtskaya Respublika, Russian Federation; e-mail: mig05@inbox.ru

For citation: Pazinenko K.A., Chuchkova N.N., Smetanina M.V. Tautomers of the Orotate Anion Have Anti-Inflammatory Effects in the Correction of Drug-Induced Hepatitis in Rats. *Journal of Medical and Biological Research*, 2021, vol. 9, no. 4, pp. 366–373. DOI: 10.37482/2687-1491-Z074