

© Коллектив авторов, 2018

УДК 615.9:616.36-002-085.27:547.476.4]-092.9

Габдрахманова И.Д.², Мышкин В.А.¹, Еникеев Д.А.², Гимадиева А.Р.³

Влияние сукцината 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацила на антиоксидантную систему и свободнорадикальные процессы в печени взрослых и старых крыс при воздействии тетрахлорметана

¹ ФБУН «Уфимский научно-исследовательский институт медицины труда и экологии человека», 450106, г. Уфа, Россия, ул. Ст. Кувькина, д. 94² ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, 450008, г. Уфа, Россия, ул. Ленина, д. 3³ ФНБун «Уфимский институт химии» РАН, 450054, г. Уфа, Россия, ул. Проспект Октября, д. 71

Цель исследования: изучение влияния сукцината 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацила на антиоксидантную систему и свободнорадикальные процессы в печени взрослых и старых крыс при воздействии тетрахлорметана. **Методика.** В эксперименте использованы половозрелые животные 12-месячного возраста со средней массой 250 г и старые животные 24-месячного возраста, средней массой 395 г по 30 особей в каждой возрастной группе. Токсическое поражение печени вызывали подкожным введением 50%-ного масляного раствора тетрахлорметана (ТХМ, 2 г/кг) в течение 4 сут. Одновременно с токсикантом опытным животным внутрибрюшинно вводили водный раствор комплексного соединения сукцинат-1,3,6-триметил-5-гидроксиурацила (2,5 мг/100 г) 3 раза в сут. в течение первых 4 сут. и в течение последующих 3 сут. 1 раз в сут. Контролем служили опытные животные, которым вводили физиологический раствор в том же объеме. Изучали окислительную модификацию белков, перекисное окисление липидов (по содержанию ТБК-реагирующих продуктов, уровню гидроперекисей липидов и содержанию диеновых конъюгатов). Состояние антиоксидантной системы оценивали по активности ферментов супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы, определяемых биохимическими методами. Антирадикальную активность комплексного соединения и его составляющих субстанций исследовали в модельной системе «этилбензол-ледяная уксусная кислота» с вычислением константы K_7 — скорости взаимодействия перекисных радикалов с молекулами изучаемого соединения в сравнении с эталонным антиоксидантом-ионолом с витамином Е. **Результаты.** Сукцинат + 1,3,6-триметил-5-гидрокси-урацила существенно снижает токсическое действие ТХМ на печень взрослых и старых крыс, устраняет дисбаланс в системах свободнорадикального окисления белков у старых крыс, статистически значимо улучшает показатели свободнорадикального окисления (СРО) липидов в печени взрослых и старых крыс: снижает уровень продуктов ПОЛ — гидроперекисей, диеновых конъюгатов, ТБК-реагирующих продуктов, а также улучшает работу антиоксидантной системы (АОС), повышая активность каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. Установлена высокая антирадикальная активность изучаемого препарата сопоставимая с активностью эталонного антиоксиданта ионола. **Заключение.** Сукцинат и его производные способны выступать как индивидуальные вещества с непосредственным антирадикальным механизмом действия, а не только как стимуляторы ферментативных систем антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: острый токсический гепатит; перекисное окисление липидов; окислительная модификация белков; возраст; печень; свободные радикалы; старение; комплексное соединение «сукцинат + 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацил»; тетрахлорметан.

Для цитирования: Габдрахманова И.Д., Мышкин В.А., Еникеев Д.А., Гимадиева А.Р. Влияние сукцината 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацила на антиоксидантную систему и свободнорадикальные процессы в печени взрослых и старых крыс при воздействии тетрахлорметана. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(3): 55—59.

DOI: 10.25557/0031-2991.2018.03.55-59

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Еникеев Дамир Ахметович, доктор мед. наук, проф., зав каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: enikeyev@mail.ru

Поступила 20.01.2018

Gabdrakhmanova I.D.², Myshkin V.A.¹, Enikeyev D.A.², Gimadieva A.R.³

Effect of 1,3,6-trimethyl-5-hydroxyuracil succinate on the antioxidant system and free-radical processes in the liver of adult and old rats treated with carbon tetrachloride

¹ Ufa Scientific Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Kuvykina Str. 94, Ufa 450106, Russia² Bashkir State Medical University, 3, Lenin Str., 450008, Ufa, Russia³ Ufa Institute of Chemistry, 71, Prospekt Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia

Aim. To study the effect of a complex compound, 1,3,6-trimethyl-5-hydroxyuracil succinate, on the antioxidant system and free radical processes induced by carbon tetrachloride in the liver of adult and old rats. **Methods.** The study used sexually mature animals aged 12 months and weighing 250 g and old animals aged 24 months weighing 395 g (total n= 60, 30 rats in each age group). Toxic damage of liver was induced by subcutaneous injections of a 50% oil solution of carbon tetrachloride (CTC) at 2 g/kg for 4 days. Together with the toxicant, experimental animals were injected with a water solution of a complex compound, succinate 1,3,6-trimethyl-5-hydroxyuracil, at a dose of 2.5 mg/100 g, i.p., 3 times per day for the first 4 days and once daily for the following 3 days. Experimental animals were used as controls, which were administered saline in the same volume. Oxidative modifications of proteins, lipid peroxidation (by levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), lipid hydroperoxides, and conjugated dienes) were studied. Condition of the antioxidant system was evaluated by activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase using biochemical methods. Antiradical activity of the complex compound and its components was studied in a model system of ethylbenzene-glacial acetic acid; the K7 constant of the rate of peroxide radical interaction with molecules of the studied compound was compared with the reference antioxidant ionol with vitamin E. **Results.** Succinate +1,3,6-trimethyl-5-hydroxyuracil, considerably reduced TXM hepatotoxicity in adult and old rats; removed the disbalance in free radical systems of protein oxidation in old rats; significantly improved indexes of free-radical oxidation (FRO) of hepatic lipids in adult and old rats; decreased levels of LP products, hydroperoxides, conjugated dienes, and TBARS, and enhanced performance of the antioxidant system (AOS) by increasing activities of catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase. The study demonstrated a high antiradical activity of the study drug comparable with the activity of the reference antioxidant, ionol. **Conclusion.** Succinate and its derivatives can perform as individual substances with a direct antiradical mechanism of action rather than as stimulators of enzymic systems of antioxidant defence.

Keywords: acute toxic hepatitis; lipid peroxidation; oxidative protein modification; age; liver; free radical; ageing; complex compound, succinate 1,3,6-trimethyl-5-hydroxyuracil; tetrachloromethane.

For citation: Gabdrakhmanova I.D., Myshkin V.A., Enikeyev D.A., Gimadieva A.R. The effect of 1,3,6-trimethyl-5-hydroxyuracil succinate on the antioxidant system and free-radical processes in the liver of adults and old rats exposed to carbon tetrachloride. *Patologicheskaya Fiziologiya I Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(3): 55—59. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2018.03.55-59

For correspondence: Enikeyev D.A., Doctor of Medical Sciences, Professor, head of the Department of Pathophysiology FSBEI HE «Bashkir State Medical University» MH RF, e-mail: enikeyev@mail.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Information about authors:

Myshkin V.A., <https://orcid.org/0000-0001-9582-5205>Enikeyev D.A., <https://orcid.org/0000-0001-6270-583X>Gabdrakhmanova I.D., <https://orcid.org/0000-0001-7696-7443>Gimadieva A.R., <https://orcid.org/0000-0002-2995-310X>

Received 20.01.2018

Введение

В последние годы в литературе особое внимание уделяется изучению проблем гепатотоксического действия (гепатотоксичности) ксенобиотиков в основе возникновения и развития которых ведущая роль принадлежит окислительным реакциям, приводящим к увеличению концентрации активных форм кислоро-

да (АФК), токсичных метаболитов и других патогенов, стимулирующих процессы свободнорадикального окисления биомолекул [7, 10]. Патологическое действие, усиление перекисных процессов связано с образованием межмолекулярных сшивок, что приводит к изменению физико-химического состояния клеточных мембран [10]. Некоторые исследователи полагают, что гепатотоксичность при действии тетрахло-

тана связана в большей степени с повреждением белков клеточных мембран, а не липидов. В то же время, процессы свободнорадикального окисления белков изучены недостаточно, практически отсутствуют данные о возрастных и тканеспецифических особенностях свободнорадикальных процессов, индуцированных различными токсическими агентами и как следствие, по-прежнему актуальной остается проблема поиска малотоксичных препаратов с высокой терапевтической активностью [8, 9].

В настоящей работе представлены экспериментальные данные изучения препарата 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацила и янтарной кислоты, соединенных в единый комплекс методом клатрирования (комплексообразования) [9] — антиоксиданта с выраженными радикалакцептирующими свойствами. Известно, что препараты янтарной кислоты могут применяться в различном возрасте — у детей и пожилых, так как являются нетоксичными, не вызывают аллергических реакций, их действие наиболее выражено при патологических состояниях, при которых они наиболее быстро оптимизируют работу организма [5]. В то же время, несмотря на известность положительных эффектов янтарной кислоты на организм как стимулятора ферментативных антиоксидантных систем, практически отсутствуют данные о собственном антиоксидантном потенциале янтарной кислоты и её солей.

Методика

В эксперименте использованы половозрелые животные 12-месячного возраста со средней массой 250 г и старые животные 24-месячного возраста, средней массой 395 г по 30 особей в каждой возрастной группе. Токсическое поражение печени вызывали подкожным введением 50%-го масляного раствора тетрахлорметана (ТХМ, 2 г/кг) в течение 4 сут. Одновременно с токсикантом опытным животным внутрибрюшинно вводили водный раствор комплексного соединения сукцинат + 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацила (2,5 мг/100 г) 3 раза в сут. в течение первых 4 сут. и в течение последующих 3 сут. 1 раз в сут. Контролем служили здоровые крысы, которым вводили дистиллированную воду в том же объеме. Окислительную модификацию белков (ПОБ) в ткани печени изучали с использованием методики основанной на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков белков с 2,4-динитрофенилгидразаном. Оптическую плотность образовавшихся продуктов (динитрофенилгидразинов, КДНФГ) измеряли при длине волны 540 нм. Перекисное окисление липидов в гомогенате ткани печени оценивали по содержанию ТБК-реагирующих продуктов (ТБК-РП) с помощью набора реагентов «ТБК-АГАТ» фирмы

«АГАТ-МЕД», по уровню гидроперекисей липидов (ГПЛ) и содержанию диеновых конъюгатов (ДК) в гептан-изопропанольных экстрактах при длине волны 232 нм. Антирадикальную активность комплексного соединения и его составляющих субстанций исследовали в модельной системе «этилбензол-ледяная уксусная кислота» с вычислением константы K^7 — скорости взаимодействия перекисных радикалов с молекулами изучаемого соединения в сравнении с эталонным антиоксидантом-ионолом с витамином Е. Состояние антиоксидантной системы оценивали по активности ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы (Кат) и глутатионпероксидазы (ГПО), определяемых биохимическими методами.

Результаты и обсуждение

Сукцинат + 1,3,6-триметил-5-гидрокси-урацила существенно снижает токсическое действие ТХМ на печень взрослых и старых крыс, устраняет дисбаланс в системах свободнорадикального окисления белков у старых крыс, статистически значимо улучшает показатели свободнорадикального окисления (СРО) липидов в печени взрослых и старых крыс: снижает уровень продуктов ПОЛ — гидроперекисей, диеновых конъюгатов, ТБК-реагирующих продуктов, а также улучшает работу антиоксидантной системы (АОС), повышая активность каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. Экспериментальные данные суммированы в табл. 1—3.

Как видно из данных табл. 1, повреждение печени тетрахлорметаном сопровождается также и нарушениями в ферментативном звене АОС: активность ферментов каталазы и супероксиддисмутазы находится в обратной зависимости от интенсивности процессов ПОЛ у животных в обеих возрастных группах крыс. Выявляется значительное снижение активности супероксиддисмутазы у взрослых особей более чем на порядок, у старых — в 2,5 раза, каталазы — в 2,23 раза у взрослых и в 2 раза у старых соответственно, что свидетельствует об истощении ферментативного звена АОС печени взрослых и старых крыс в результате гиперактивации процессов ПОЛ.

Введение крысам исследуемого комплексного соединения приводило к статистически значимому улучшению показателей АОС (табл. 2). Возрастала активность каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в печени взрослых и старых крыс.

В дальнейших исследованиях была предпринята попытка определить антирадикальную активность комплексного соединения и его составляющих в модельной системе методом хемилюминесценции на специальной установке [12]. Вычисляли константу K_7 скорости взаимодействия перекисных радикалов с молекулами

изучаемого соединения в сравнении с эталонным анти-оксидантом ионолом с витамином Е.

Значение константы вычисляли по формуле:

$$K_7 = \left(\sqrt{\frac{J_0}{J}} - 1 \right) \sqrt{\frac{W_1 K_6}{\ln H}}, \text{ где}$$

- J_0 — интенсивность хемилюминесценции (ХЛ) до введения ингибитора;
 - J — интенсивность ХЛ после введения ингибитора;
 - W_1 — скорость инициирования реакции;
 - K_6 — константа скорости реакции рекомбинации перекисных радикалов;
 - $[\ln H]$ — концентрация ингибитора.
- Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 1

Влияние сукцината — 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацила на перекисное окисление липидов и белков в печени разновозрастных крыс с острым токсическим гепатитом ($M \pm m$)

Возраст крыс, группа		ПОБ, КДНФГ, мм/г белка	ПОЛ		
			ГПЛ, отн. ед. $\lambda = 480$ нм	ДК, отн. ед., $\lambda = 232$ нм	ТБК — РП, нмоль/г ткани
12 мес.	Контроль	0,0100 ± 0,0002	1,20 ± 0,01	0,40 ± 0,03	1,70 ± 0,05
	ТХМ	0,0110 ± 0,0003 *	2,60 ± 0,01 *	0,51 ± 0,04*	3,80 ± 0,02*
	АО + ТХМ	0,0110 ± 0,0002 *	1,40 ± 0,02**	0,41 ± 0,03**	2,70 ± 0,06*. **
24 мес.	Контроль	0,0120 ± 0,0003 #	2,20 ± 0,03	0,45 ± 0,02 #	2,80 ± 0,14 #
	ТХМ	0,0317 ± 0,0001 *	3,00 ± 0,01*	0,65 ± 0,02 * #	4,11 ± 0,13*
	АО + ТХМ	0,0125 ± 0,0001 ** #	2,60 ± 0,01**	0,52 ± 0,03*, **	3,30 ± 0,19**

Примечание. Здесь и в табл. 2 — * — $p < 0,05$ к контролю; ** — $p < 0,05$ к ТХМ; # — $p < 0,05$ между возрастными группами; АО — комплексный препарат сукцинат-1,3,6-триметил-5-гидроксиурацил.

Таблица 2

Активность печеночной супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы у крыс разных возрастных групп при воздействии тетрахлорметана на фоне сукцината — 1, 3, 6-триметил-5-гидроксиурацила ($M \pm m$)

Возраст крыс, группа		Показатели		
		СОД, ЕД/г	Кат, мкат/г	ГПО, ЕД/г
12 мес.	Контроль	0,97 ± 0,02	7,82 ± 0,01	27,82 ± 0,10
	ТХМ	0,08 ± 0,03*	3,53 ± 0,06*	13,53 ± 0,16*
	Сукц. ТМУ + АО + ТХМ	0,89 ± 0,02**	5,12 ± 0,18* **	21,52 ± 0,18* **
24 мес.	Контроль	0,55 ± 0,010	4,13 ± 0,05#	24,13 ± 0,50
	ТХМ	0,22 ± 0,04*	2,05 ± 0,02* #	12,05 ± 0,20*
	Сукц. ТХМ + АО + ТХМ	0,39 ± 0,012** #	3,88 ± 0,013** #	23,80 ± 0,13**

Примечание. * — $p < 0,05$ к контролю; ** — $p < 0,05$ к ТХМ; # — $p < 0,05$ между возрастными группами.

Таблица 3

Константа скорости K_7 взаимодействия перекисных радикалов с метилпроизводными — 5-оксиурацила и производными янтарной кислоты

Соединение	Константа K_7 (л/моль × с)	K_7 соединения / K_7 ионола
6-метил-5-оксиурацил (оксиметилурацил)	$(2,6 \pm 0,3) \times 10^4$	1,13
3,6-диметил-5-оксиурацил	$1,07 \times 10^4$	0,73
1,3,6-триметил-5-гидроксиурацил	$6,78 \times 10^4$	2,9
Сукцинат натрия	$(1,03 \pm 0,3) \times 10^3$	$4,3 \times 10^{-2}$
Мексидол	$2,9 \times 10^3$	$1,26 \times 10^{-1}$
Токоферол (хинон)	$(6,4 \pm 0,5) \times 10^3$	$2,7 \times 10^1$
4-метил-2,6-дитрет-бутилфенол (ионол)	$(2,3 \pm 0,6) \times 10^4$	1

Значения константы K_7 изучаемых соединений сравнивали с константой K_7 референтных антиоксидантов — ионола (4-метил-2,6-дитрет-бутилфенола) и витамина Е. Установлено, что более высокие значения константы K_7 имеют метилпроизводные — 5-гидроксиурацила, содержащие метильную группу в 1,3 и 6-положениях пиримидинового кольца, образуя убывающий ряд: 1,3,6-триметил-5-гидроксиурацил > 6-метил-5-гидроксиурацил > 3,6-диметил-5-гидроксиурацил. Сукцинат натрия и мексидол имеют меньшие значения константы K_7 , что может свидетельствовать о более низкой антирадикальной активности сукцинатов по сравнению с метилпроизводными урацила и ионолом, но сопоставимой с активностью токоферол-хинона.

Заключение

В механизме антиоксидантного действия исследуемого комплексного соединения присутствуют 2 составляющие: прямое радикалакцентирующее действие метилпроизводного урацила и стимулирующее влияние на активность ферментативного звена антиоксидантной системы. Сукцинат и его производные способны выступать как индивидуальные вещества с непосредственным антирадикальным механизмом действия, а не только как стимуляторы ферментативных систем антиоксидантной защиты.

References

1. Volchegorskiy I.A., Nalimov A.G., Yarovickiy B.G., Lifshc R.I. Comparison of various approaches to the definition of products of lipid peroxidation in heptane — isopropanol extracts blood. *Voprosy meditsinskoy khimii*. 1989; 35(1): 127-31. (in Russian)
2. Gavrilov V.B., Mishkorudnaya B.S. Spectrophotometric determination of lipid hydroperoxides in blood plasma. *Laboratornoe delo*. 1987; 3: 33-6. (in Russian)

3. Gonskiy D.Ja. I., Korda M.M., Klissh I.N. The effect of acetylcysteine on the antioxidant system in experimental toxic liver damage. *Pharmacology and toxicology. Farmakologiya i toksikologiya*. 1991; 54(5): 44-8. (in Russian)

4. Dubinina E.E. Products of oxygen meta-bolism in functional activity of cells. *Life and Death. Creation and destruction*.

[Produkty metabolizma kisloroda v funktsional'noy aktivnosti kletok. Zhizn' i Smert'. Sozidanie i razrushenie]. Saint-Petersburg: *Meditsinskaya pressa*; 2006. (in Russian)

5. Ivnitkiy Yu.Yu., Golovko A.I., Sofronov G.A. *Succinic acid in the system of metabolic correction of the functional state and the body's resistance. [Yantarnaya kislota v sisteme sredstv metabolicheskoy korrektsii funktsional'nogo sostoyaniya i rezistentnosti organizma]*. Saint-Petersburg; 1998. (in Russian)

6. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G. Determination of catalase activity. *Laboratornoe delo*. 1988; 1: 16-9. (in Russian)

7. Livanov G. A. *The role of impaired antioxidant defense system in the formation of critical conditions in patients with acute poisoning and their correction drug Reamberin. Reamberin, reality and prospects. [Rol' narusheniy sistemy antioksidantnoy zashchity v formirovaniy kriticheskikh sostoyaniy u patientsov s ostrymi otravleniyami i vozmozhnosti ikh korrektsii preparatom reambirinom. Reambirin, real'nost' i perspektivy]*. Saint -Petersburg. 2002. (in Russian)

8. Myshkin V.A., Enikeev D.A., Gabdrahmanova I.D., Srubilin D.V., Gimadieva A.R., Repina Ye.F. The effect of complex compounds of 5 — hydroxyuracil methyl derivatives with succinic acid on the antioxidant system and morphological and functional state of the liver of old rats under the influence of tet-rachloromethane. *Patogenez*. 2017; 15: 52-6. (in Russian)

9. Tolstikova T. G., Tolstikov A.G., Tolstikov G.A. On the way to low-dose drugs. *Vestnik Rossiyskoy akademii nauk*. 2007; 77(10): 867-74. (in Russian)

10. Todorov I.N., Todorov G.I. *Stress, aging and their biochemical correction. [Stress, starenie I ikh biokhimicheskaya korrektsiya]*. Moscow: Nauka. 2003. (in Russian)

11. Chevri S. Role of superoxidizedismutase in the oxidation processes of cell and the method of its determination in biological materials. *Laboratornoe delo*. 1985; 11: 678 — 81.

12. Shlyapintokh V.Ya., Karpukhin O.N., Postnikov L.M. *Chemiluminescent methods for the study of slow chemical processes. [Hemiluminestentnye metody issledovaniya medlennykh himicheskikh protsessov]*. Moscow: Nauka. 1966. (in Russian)

Сведения об авторах:

Габдрахманова И.Д., очный аспирант каф. патологической физиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Мышкин В.А., доктор мед. наук, проф., вед. науч. сотр. отд-ния токсикологии ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека»

Еникеев Д.А., доктор мед. наук, проф., зав. каф. патофизиологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Гимадиева А.Р., канд. хим. наук, ст. науч. сотр. лаб. фармакофорных циклических систем УФИХ РАН