

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ОКСИМЕТИЛУРАЦИЛА С ОРГАНИЧЕСКИМИ КИСЛОТАМИ И СИЛИМАРИНОМ НА МОДЕЛИ ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

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

¹Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека Роспотребнадзора, Уфа, e-mail: srubilin66@mail.ru;

²Уфимский институт химии РАН, Уфа;

³Башкирский государственный медицинский университет, Уфа

Совтол-1 обладает иммунотоксическим, тератогенным действием, нарушает репродуктивную, пищеварительную функции, в том числе поражает печень. Поэтому цель исследования состояла в сравнительной оценке гепатопротекторных свойств оксиметилурацила (в форме комплексных соединений с глицирризиновой и аскорбиновой кислотами) и референтного силимарина на модели сочетанного токсического поражения печени совтолом-1 и этанолом. Токсическое поражение печени, вызванное совтолом-1 и этанолом, сопровождается нарушением белково-синтетической, детоксицирующей, липосинтезирующей функции печени, признаками цитолиза и холестаза, активацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) и подавлением антиоксидантной системы (АОС). На модели интоксикации сочетанием совтола-1 и этанола гепатопротектор силимарин и комплексные соединения оксиметилурацила показали положительный терапевтический эффект, что выразилось в ограничении оксидативных и функционально-метаболических проявлений гепатотоксичности. В группах леченых крыс более высокий гепатозащитный эффект выявлен у комплексного соединения оксиметилурацила с аскорбиновой кислотой по показателям, характеризующим функциональную активность печени (урокиназа, АсАТ, билирубин) и систему ПОЛ-АОС (триеновые конъюгаты, SH-группы). При данном патологическом состоянии наиболее перспективными по механизму действия являются комплексные препараты оксиметилурацила с органическими кислотами.

Ключевые слова: оксиметилурацил, глицирризиновая кислота, аскорбиновая кислота, силимарин, совтол-1, гепатотоксичность, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система.

COMPARATIVE ASSESSMENT OF COMPLEX COMPOUNDS OXYMETHYLURACIL WITH AN ORGANIC ACID AND SILYMARIN USING CIRRHOISIS MODEL IN THE EXPERIMENT

Myshkin V.A.¹, Enikeev D.A.³, Srubilin D.V.³, Gimadieva A.R.²

¹Ufa Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, e-mail: srubilin66@mail.ru;

²RAS Ufa Institute of Chemistry, Ufa;

³Bashkirian State Medical University, Ufa

Sovtol-1 has immuno toxicity, teratogenic, violates the reproductive, digestive function, including liver damage. Therefore, the aim of the study was a comparative evaluation of hepatoprotective properties oxymethyluracil (in the form of complex compounds with acidum glycyrrhizanicum and acidum ascorbinicum) and reference model of silymarin combined liver toxicity of "sovtol-1" and ethanol. Toxic liver disease caused by Sovtol-1 and ethanol, accompanied by a breach of protein-synthetic, detoxifying liver function, signs of cytolysis and cholestasis, activation of lipid peroxidation (LPO) and the suppression of antioxidant system (AOS). Using "Sovtol-1" and ethanol modulated intoxication, the hepatoprotector silymarin and the complex compounds oxymethyluracil have shown to produce therapeutic effects resulting in limited oxidative and functional-metabolic manifestations of hepatotoxicity. In the treated rat groups, the complex compound oxymethyluracil with acidum ascorbinicum turned out to have a higher hepatoprotective effect in accordance with indicators characterizing functional activity of the liver (urokinase, AcAT, bilirubin) and POL-AOS system (trien conjugates, SH-groups). With this pathological condition most promising mechanism of action are the complex compounds oxymethyluracil with an organic acid.

Keywords: oxymethyluracil, acidum glycyrrhizanicum, acidum ascorbinicum, silymarin, sovtol-1, hepatotoxicity, lipid peroxidation, antioxidant system.

Высокая биологическая активность и низкая токсичность оксиметилурацила послужили предпосылкой для создания на его основе комплексных соединений с

органическими кислотами, обладающими гепатопротекторной активностью. С учетом известных фармакологических свойств оксиметилурацила (антитоксическое и антиоксидантное действие) разработаны два новых комплексных соединения: «оксиметилурацил + глицирризиновая кислота» и «оксиметилурацил + аскорбиновая кислота» для коррекции процессов перекисного окисления липидов и нарушений метаболизма, эффективных при хронических повреждениях печени химической этиологии.

Известно, что печень крыс обладает высокой чувствительностью к повреждающему действию технической смеси полихлорированных бифенилов (ПХБ) - совтола-1 с высоким содержанием хлора [11], что явилось основанием для создания двух новых моделей патологии – токсической гепатопатии [8] и цирроза печени [8; 11]. Дальнейшие эксперименты позволили выявить патогенетическую значимость оксидативного стресса и нарушение механизмов эндогенной цитопротекции, что позволило обосновать новый подход к фармакологической коррекции выявленных нарушений.

Цель данного исследования – сравнительная оценка гепатопротекторной активности оксиметилурацила (в форме комплексных соединений с глицирризиновой кислотой и аскорбатом) и референтного гепатопротектора силимарина на модели поражения печени ПХБ-содержащим препаратом «Совтол-1» и этанолом.

Материалы и методы исследования

В ходе экспериментального исследования отобрана модель цирроза печени [11] для изучения сравнительной гепатопротекторной активности гепатопротектора силимарина и двух комплексных соединений для перорального применения: «оксиметилурацил + глицирризиновая кислота» и «оксиметилурацил + аскорбат». Крысы самцы (n=40) массой 200±20 г были разделены на 5 равных групп. Животным 1-й группы вводили 50%-ный раствор совтола-1 на оливковом масле из расчета 0,25 мл на 100 г массы тела дважды в неделю в течение 4 недель. На протяжении опыта для питья животным давали 10%-ный раствор этанола. Крысам 2, 3 и 4-й групп, используя те же дозы, вводили токсиканты (ПХБ и этанол), однако во 2-й и 3-й группах животные дополнительно получали комплексы «оксиметилурацил + глицирризиновая кислота» и «оксиметилурацил + аскорбат». Препараты вводили перорально в течение 12 суток в дозе 50 мг/кг, начиная с 14-го дня эксперимента. В 4-й экспериментальной группе с целью коррекции использовали гепатопротектор силимарин в аналогичной дозе по вышеприведенной схеме. Интактным крысам (5-я группа) вводили растворитель в адекватном объеме. Все манипуляции выполнены в соответствии с международными нормативными документами, регламентирующими правила гуманного обращения с животными.

Проведена оценка показателей, характеризующих функциональное состояние печени:

активность уроганиназы (Урн) [2], аланиновой аминотрансферазы (АлАТ), аспаргиновой аминотрансферазы (АсАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) определяли по кинетическому методу Henry на биохимическом анализаторе согласно прилагаемым инструкциям, а также концентрацию SH-групп, билирубина, холестерина, триглицеридов и содержания в крови общего белка [6; 10]. Антирадикальную активность препаратов оценивали на специальной установке по величине константы K_7 – скорости реакции между молекулами изучаемого препарата (соединения) и перекисными радикалами этилбензола [13]. Состояние процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) исследовали методом прямой спектрофотометрии путем определения содержания в гомогенатах печени количества диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) [3; 4]. Одновременно с процессами ПОЛ регистрировали активность супероксиддисмутазы (СОД) [12] и каталазы [5].

Результаты обрабатывали статистически. Оценку статистической значимости различий при межгрупповых сравнениях проводили по двустороннему Т-критерию Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при значениях $P < 0,05$. Комплексные соединения синтезированы в Институте химии Уфимского научного центра РАН кандидатом химических наук Гимадиевой А.Р.

Результаты и их обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что токсическое поражение печени, вызванное введением совтола-1 и этанола, сопровождается нарушением белково-синтетической, детоксицирующей, липосинтезирующей функции печени, признаками цитолиза и холестаза, активацией процессов ПОЛ и подавлением антиокислительной системы. Эксперименты проведены в два этапа. На первом этапе исследовали активность процессов ПОЛ, систему антиоксидантной защиты и функционально-метаболическое состояние печени при сочетанном поражении ее совтолом и этанолом, на втором – сравнительную эффективность применения комплексных соединений «оксиметилурацил+глицирризиновая кислота», «оксиметилурацил+аскорбиновая кислота» и референтного препарата силимарина. Как следует из данных, представленных в таблице 1, при развитии токсического процесса происходит накопление продуктов ПОЛ в ткани печени. Содержание ДК увеличивается почти в 2 раза, уровень ТК в 1,47 раза. Накопление продуктов ПОЛ сопровождается снижением активности антиоксидантных ферментов – каталазы и супероксиддисмутазы соответственно в 2 и 3,5 раза. Нарушения в системе ПОЛ-АОЗ протекают при одновременном снижении в печени общих тиоловых групп, которое достигает к 30 суткам 42,2% от показателей интактных животных, что может быть обусловлено неферментативной реакцией SH-групп со свободными радикалами липидов в результате активации ПОЛ.

Таблица 1

Влияние комплексных соединений с органическими кислотами «оксиметилурацил» и силимарина на активность процессов ПОЛ и антиоксидантной защиты в печени крыс при ее токсическом поражении ($M \pm m$)

Показатели	Группы крыс				
	I	II	III	IV	V
ДК ($\lambda=232$) усл. ед/г ткани	2.95±0.23	2.5±0.33	3.1±0.1**	1.0±0.02**	1.52±0.09*
ТК ($\lambda=278$) усл. ед/г ткани	2.0±0.12	1.8±0.05	0.88±0.07**	1.1±0.2**	0.68±0.05*
СОД, усл. ед/мг белка	1.36±0.07	3.0±0.12**	4.22±0.13**	4.0±0.15**	4.83±0.66*
КАТ, моль в мин/г белка	120.3±19.8	166±13.2	168±17.8**	183±15.6**	244.6±18.3*
SH группы, мкг/мг белка	8.2±0.44	14.2±0.66**	12.5±0.68**	8.8±0.9	19.4±0.09*

Примечания: * $p < 0.05$ между группами контроля;

** $p < 0.05$ между группами, получавшими препараты, по сравнению с 1-й группой, получавшей только совтол-1 и этанол.

Таблица 2

Коррекция функционально-метаболических нарушений в печени на модели ее комбинированного повреждения совтолом-1 и этанолом ($M \pm m$)

Показатели	Группы животных				
	I (токсикант)	II	III	IV	V (контроль)
Количество выживших животных, %	42.5	60	60	73.3	100
УрН, ммоль/г·л сдвиг показателя Δ	54.9±3.5	38.6±8.9 -16.3 *	32.6±7.2 -22.3 *	43.6±6.3 -11.3 *	0.89±0.03 -54.01 *
АлАт, ммоль/г·л сдвиг показателя Δ	9.45±0.45	8.8±0.23 -0.5	4.0±0.16 -5.45 *	3.8±0.15 -5.65 *	3.3±0.18 -6.15 *
АсАт, ммоль/г·л сдвиг показателя Δ	25.7±0.43	15.0±0.3 -10.7 *	13.2±0.66 -12.5 *	23.0±0.5 -2.7	10.7±0.14 -15 *
ЩФ, ммоль/г·л сдвиг показателя Δ	28.5±0.94	17.7±0.88 -10.8	17.8±0.91 -10.7 *	15.3±0.74 -13.2 *	15.1±0.40 -13.4 *
Билирубин, мкмоль/л сдвиг показателя Δ	19.2±8.8	6.6±1.4 -12.6	7.3±0.9 -11.9 *	18.0±15.6 -1.2	2.90±0.39 -16.3 *
Холестерин, ммоль/л сдвиг показателя Δ	4.3±0.33	2.0±0.5 -2.3 *	2.3±0.21 -2.0 *	3.2±0.3 -1.1	2.9±0.29 -1.4

Триглицериды, ммоль/л сдвиг показателя Δ	1.9±0.12	0.39±81 -1.31 *	0.18±0.09 -1.72 *	0.88±0.07 -1.02 *	0.23±0.97 - 1.47 *
Общий белок, г/л сдвиг показателя Δ	59.5±3.7	60.3±5.5 +0.8	64.3±5.2 +4.8 *	63.5±2.8 +4 *	65.4±2.9 +5.9 *

Примечания: * сдвиг показателя (Δ) – разница между группами животных контроля, а также получавших комплексное соединение «оксиметилурацил+ глицирризиновая кислота», «оксиметилурацил+аскорбиновая кислота» и силимарин по сравнению с 1-й группой крыс, получавших только совтол-1 и этанол.

Токсическое поражение печени вызывает снижение концентрации белка, увеличение уровня билирубина, холестерина и триглицеридов (табл. 2). В крови животных значительно повышается активность печеночно-специфического фермента-уроканиназы, а также активность АлАТ, АсАТ и ШФ в 2.8, 2.4 и 1.9 раза соответственно.

Лечение отравленных крыс комплексными соединениями «оксиметилурацил + глицирризиновая кислота» и «оксиметилурацил + аскорбиновая кислота», так же как и гепатопротектором силимарином, благоприятно влияет на функционально-метаболическое состояние печени. Препараты оказывают гепатопротекторное действие: снижают гиперферментемию, частично нормализуют практически все нарушенные показатели, характеризующие метаболическое состояние печени (табл. 2). Комплекс оксиметилурацила с глицирризиновой кислотой менее эффективен, поскольку его введение крысам не изменяет концентрацию билирубина и холестерина, а также уровень АсАТ в крови отравленных крыс. В основе гепатозащитного действия комплексных соединений лежат их антиоксидантные свойства. Однако механизмы их антиоксидантного действия, по-видимому, различны: если комплексное соединение, содержащее аскорбат, проявляет прямую антирадикальную активность, то глицирризинат оксиметилурацила такой активностью не обладает (табл. 3).

Имеются данные о том, что глицирризиновая кислота не влияет на продукцию активных форм кислорода (АФК) активированными нейтрофилами, подавляет эту продукцию при инкубации с фагоцитами, активированными форболовым эфиром и лигандом специфических рецепторов на их мембране – хемотоксическим пептидом N-формил-Мет-Лей-Фен. На основании этих данных сделан вывод о том, что ограничивающее действие глицирризиновой кислоты на генерацию АФК связано либо с блокадой передачи рецепторного сигнала на НАДФН-оксидазу, либо с ингибирующим влиянием на протеинкиназу C [1].

Таблица 3

Константа скорости взаимодействия перекисных радикалов этилбензола с оксиметилурацилом, оксиметилурацилом-глицирризинатом, аскорбатом, глицирризиновой кислотой и ионолом (К₇)

Препарат (соединение)	Константа K_7 , моль/л · с	K_7 препарата
		K_7 ионола
* Инол (2-метил-2.6-дитретбутилфенол)	$(2.3 \pm 0.6) \cdot 10^4$	1
Оксиметилурацил-основание	$(2.6 \pm 0.8) \cdot 10^4$	1.17
Оксиметилурацил-аскорбат	$(1.3 \pm 0.4) \cdot 10^5$	5.7
Оксиметилурацил-глицирризинат	$(2.6 \pm 0.8) \cdot 10^4$	1.17
Глицирризиновая кислота	$(1.3 \pm 0.4) \cdot 10^2$	$5.6 \cdot 10^{-3}$

Примечание: * инол (2-метол-2.6-дитретбутил-фенол) – референтный ингибитор свободно-радикального окисления.

Заключение

Гепатопротекторное действие силимарина и комплексных соединений «оксиметилурацил + глицирризиновая кислота» и «оксиметилурацил + аскорбиновая кислота» реализуется на метаболическом уровне. Метаболический эффект препаратов проявляется в снижении цитолиза, холестаза, а также в уменьшении интенсивности липопероксидации.

Антиоксидантные свойства комплексных соединений препаратов подтверждаются благоприятным влиянием препаратов на активность антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазу и каталазу. С точки зрения получения конечного результата силимарин и комплексное соединение «оксиметилурацил + аскорбиновая кислота» имеют некоторое преимущество перед комплексным соединением «оксиметилурацил + глицирризиновая кислота» в условиях модельной патологии, вызванной комбинацией совтола-1 и этанола. Возможно, при данном патологическом состоянии наиболее перспективными по механизму действия являются препараты с прямым антирадикальным действием, что требует дальнейшего экспериментального изучения.

Список литературы

1. Баскина О.А. Возможные механизмы антиоксидантной активности глицирризиновой кислоты / О.А. Баскина, А.Ю. Абрамов, Габдулхакова А.П. // Биомедицинская химия. – 2006. - 52 (1). – С. 6-8.
2. Буробин В.А. Определение активности уруксиназы в сыворотках крови и ткани

- печени (микрометод) / В.А. Буробин, Н.В. Лихачева, Г.Е. Абгафарова // Лабораторное дело. – 1978. - № 11. – С. 650-653.
3. Волчегорский И.А. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма / И.А. Волчегорский, И.А. Долгушин, О.Л. Колесников, В.А. Цейликман. - Челябинск, 2000. - 165 с.
 4. Гаврилов В.Б. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов / В.Б. Гаврилов, А.Р. Гаврилов, А.Ф. Хмара // Лабораторное дело. – 1988. - № 2. – С. 60-64.
 5. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, Н.Н. Майорова, Токарев В.В. // Лабораторное дело. – 1988. - № 1. – С. 16-19.
 6. Колб В.Г. Клиническая биохимия / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск, 1976. – 312 с.
 7. Майстренко В.Н. Эколого-аналитический мониторинг стойких органических загрязнителей / В.Н. Майстренко, Н.А. Ключев. – М. : Бином. Лаборатория знаний, 2004. – 323 с.
 8. Мышкин В.А. Полихлорированные бифенилы и новые модели патологии печени / В.А. Мышкин, А.Б. Бакиров // Бюллетень ВСНУ СО РАМИ. – 2009. - № 1 (65). – С. 255-259.
 9. Мышкин В.А. Экспериментальная оценка производных пиримидина на моделях токсического поражения печени : обзор / В.А. Мышкин, Д.А. Еникеев, Д.В. Срубиллин и др. // Научное обозрение. Медицинские науки. – 2016. - № 3. – С. 88-98.
 10. Рубина Х.М. Количественное определение SH-групп в цельной и депротеинизированной крови спектрофотометрическим методом / Х.М. Рубина, Д.А. Романчук // Вопросы мед. химии. – 1961. – Т. 7, № 6. – С. 652-655.
 11. Способ моделирования цирроза печени / В.А. Мышкин [и др.] : Патент РФ на изобретения № 2197018 по заявке 2000103880 от 20.01.2003 г.
 12. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. - № 11. – С. 678-680.
 13. Шляпинтох В.Я. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов / В.Я. Шляпинтох, О.Н. Карпухин, Л.М. Постников и др. - М. : Наука, 1966. – 300 с.
 14. Юсфин Ю.С. Промышленность и окружающая среда / Ю.С. Юсфин, Л.И. Леонтьев, Н.П. Черноусов. - М. : Академкнига, 2002. – 469 с.