

АНТИРАДИКАЛЬНАЯ И АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО СОЕДИНЕНИЯ 5-ОКСИ-6-МЕТИЛУРАЦИЛА С ЯНТАРНОЙ КИСЛОТОЙ И ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИ ГИПОКСИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Срубиллин Д.В., Еникеев Д.А., Мышкин В.А.

ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Росздрава»,
Уфа, e-mail: rectorat@anrb.ru

Представлены результаты исследования антирадикальной, антиокислительной и противогипоксической активности комплексного соединения 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой. Установлено, что исследуемое соединение обладает высокой антирадикальной и антиокислительной активностями, а также значительно увеличивает резервное время жизни мышей при острой гистотоксической гипоксии и гипоксии с гиперкапнией. В условиях гемической гипоксии комплексное соединение 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой ограничивает снижение активности ферментов антиоксидантной защиты и интенсификацию процесса липопероксидации.

Ключевые слова: производные пиримидина, янтарная кислота, антиоксиданты, гипоксия, перекисное окисление липидов

ANTIRADICAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE COMPLEX COMPOUND OF 5-OXY-6-METHYLURACIL WITH AMBER ACID AND ITS EFFICACY UNDER HYPOXIC CONDITIONS

Srubilin D.V., Enikeev D.A., Myshki, V.A.

Bashkirian State Medical University, Ufa, e-mail: rectorat@anrb.ru

The results of studies on antiradical, antioxidative and antihypoxic activity of the complex compound of 5-oxy-6-methyluracil with amber acid are presented. It has been shown that the compound under discussion has high antiradical and antioxidative activities. It also increases the reserve life span of mice with acute histotoxic hypoxia and hypoxia with hypercapnia. Under hemic hypoxia conditions, the complex compound of 5-oxy-6-methyluracil with amber acid limits a decrease in activity of antioxidant protection enzymes and intensification of lipoperoxidation process.

Keywords: pyrimidine compounds, amber acid, antioxidants, hypoxia, lipid peroxidation

В многочисленных исследованиях последних лет доказано, что в молекулярных механизмах патогенеза многих заболеваний ключевую роль играет дисбаланс в системе свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты [8]. Избыток свободных радикалов негативно влияет на структуру любых молекул клетки, наиболее интенсивно повреждая липиды. Активация перекисного окисления липидов (ПОЛ), накопление свободных радикалов нарушают структурно-функциональную целостность клеточных мембран, и, как следствие, влияют на течение биоэнергетических процессов. В то же время имеются данные, согласно которым при гипоксии усиливается свободнорадикальная активность [1]. Это запускает порочный круг клеточной патологии, ведущий к утрате барьерных свойств мембран.

Клиническая медицина постоянно сталкивается с необходимостью защиты организма от недостатка кислорода, с одной стороны, и его повреждающим действием, с другой. В этих случаях целесообразно использовать соединения с обще клеточным

действием, обладающие антиоксидантной, антигипоксической и мембранопротекторной активностями. Коррекция развивающихся нарушений при избыточной активации процессов свободнорадикального окисления (СРО) и недостаточности антиоксидантной защиты с помощью препаратов, обладающих антиоксидантной и антигипоксической активностями, является наиболее универсальной. К числу эффективных средств, в значительной степени обладающих указанными свойствами, могут быть отнесены производные пиримидина и их комплексные соединения с карбоновыми кислотами. Одним из данных соединений является комплекс 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой. Целью настоящей работы явилось исследование антирадикальной, антиокислительной, антигипоксической активности комплексного соединения 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой.

Материалы и методы исследования

Влияние комплекса 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой на процессы генерации свободных

радикалов *in vitro* оценивали в хемилюминесцентных модельных системах. Данное соединение синтезировано по методике, разработанной в Институте органической химии УНЦ РАН д.х.н. В.П. Кривоноговым. В качестве первой использовали модельную систему, состоящую из смеси этилбензол: ледяная уксусная кислота (3:2), в которой содержался активатор – 1,4 дибромантрацен (500 мкмоль), инициатор – азодиизобутиронитрил (100 мкмоль) и изучаемое соединение. В данной системе исследуется антагонизм препаратов с органическим радикалом типа RO₂ путем определения величины константы K₇, которая характеризует скорость взаимодействия перекисных радикалов этилбензола с молекулами изучаемого соединения. Данную величину сравнивали с K₇ ионола [9].

В качестве второй модели использовали систему, где генерировалось образование активных форм кислорода (АФК). Для этого использовали фосфатный буфер (КН₂РО₄ – 20 ммоль, КСl – 105 ммоль, РН 7,45) с добавлением цитрата натрия (50 ммоль) и люминола (5-амино, 2,3 дегидро-4-фалазиндион, 10 мкмоль). Образование АФК инициировали введением сернокислого железа (2,5 ммоль).

Для оценки антиокислительной активности препаратов на процессы перекисного окисления липидов использовали модельную систему, содержащую липидно-белковые комплексы из гомогенизированного куриного желтка, соответствующие по составу липопротеидам крови низкой и очень низкой плотности, а также использовали систему плазмы крови человека. Окисление липидов инициировалось добавлением сернокислого железа (конечная концентрация 2,5 ммоль), которое катализировало окисление ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов. По интенсивности развивающегося свечения судили о процессах ПОЛ. Контролем служили модельные системы без добавления препарата.

Хемилюминесцентные измерения проводили с помощью хемилюминометра ХЛМ-003, который измеряет излучение с длиной волны 0,3–0,6 мкм, чувствительность составляет 104–107 фотон/с. В качестве эталона при оценке интенсивности хемилюминесценции (ХЛ) использовали ЖС-19(ГОСТ 9411-81), испускающий свет в видимой области спектра и прокалиброванный в абсолютных единицах по стандартному радиолюминесцентному источнику. Кинетику хемилюминесценции регистрировали и обрабатывали с помощью интерфейса, связанного с компьютером. Программа определяет следующие параметры хемилюминесценции: светосумму, спонтанную светимость, вспышку, максимальную светимость и наклон кривой. В качестве наиболее информативных показателей ХЛ были взяты светосумма (S) и максимальная светимость (I max).

Антигипоксическую активность соединения изучали на моделях острой гемической гипоксии (ОГеГ), острой гистотоксической гипоксии (ОГТГ), острой гипоксии с гиперкапнией (ОГК) в соответствии с «Методическими рекомендациями по экспериментальному изучению препаратов, предлагаемых для клинического изучения в качестве антигипоксических средств» Фармакологического государственного комитета МЗ СССР (1990).

Опыты по изучению действия гемической гипоксии проводили на крысах-самцах массой 180–240 г. Гемическую гипоксию вызывали подкожным введением нитрита натрия в дозе 90 мг/кг, вызывающего гибель 50% животных (LD₅₀). В эритроцитах крыс

определяли общий уровень аденозинтрифосфата (АТФ)[2], активность супероксиддисмутазы [6], каталазы [4], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [10], а также содержание восстановленного глутатиона [7] и диеновых конъюгатов [3].

Комплекс 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой вводили внутривенно на 2% крахмальной взвеси в дозе 50 мг/кг ежедневно с интервалом 12 часов в течение 5 дней, начиная с момента введения токсиканта. В контрольной группе крыс вводили растворитель. Тестирование осуществляли на 7 сутки. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями приказов №1179 МЗ СССР от 10.10.83 г., №267 МЗ РФ 19.06.03 г. «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Правилами по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных».

Обработку полученных результатов проводили с применением методов вариационной статистики. В сравниваемых группах определяли средние величины (M), ошибку средних величин ($\pm m$). Оценку достоверности проводили по критерию Стьюдента (t). Минимальный уровень достоверности верифицировали при $p < 0,05$. Математическую обработку выполняли на компьютере с применением программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследованное комплексное соединение 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой является активным ингибитором свободнорадикального окисления в системе инициированного окисления этилбензола. Константа скорости взаимодействия перекисных радикалов этилбензола (константа K₇) с изучаемым соединением составила $(2,22 \pm 0,2) \cdot 10^4$ л/(моль·с). Соотношение константы взаимодействия перекисных радикалов исследуемого соединения к K₇ ионола составила 0,96, что говорит о высокой антирадикальной активности, сопоставимой с ингибирующим эффектом ионола. Выявленный антагонизм указанного соединения с радикалом типа LO₂[·] имеет большое значение, так как по современным представлениям имеется всего два типа непосредственных «радикалов-убийц» – это гидроксильный радикал и один из липидных радикалов – L[·], LO[·] и LO₂[·], а возможно все три.

Из данных, представленных в табл. 1, следует, что добавление 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой в концентрации 10⁻⁴ М в модельную систему, в которой осуществляются процессы генерации активных форм кислорода (АФК), вызывает уменьшение светосуммы хемилюминесценции на 42,1% ($p < 0,05$) в сравнении с контролем, а в концентрации 10⁻³ М генерация АФК практически полностью прекращается. Угнетающее воздействие комплекса на люминолзависимую хемилюминесценцию является показателем его способности по-

давать выработку первичных свободных радикалов, образующихся путем одноэлек-

тронного восстановления с участием ионов переменной валентности.

Таблица 1

Влияние комплекса 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой на параметры модельных систем, инициирующих реакции липопероксидации и генерирующих активные формы кислорода ($M \pm m$)

| Препарат | Кон-центр. в системе | ХЛ желточных липопротеидов | | ХЛ плазмы крови человека | | ХЛ системы генерирующей АФК | |
|--|----------------------|----------------------------|--------------|--------------------------|--------------|-----------------------------|--------------|
| | | S, усл.ед. | I, усл.ед. | S, усл.ед. | I, усл.ед. | S, усл.ед. | I, усл.ед. |
| Контроль | | 119,0 ± 3,7 | 22,13 ± 1,4 | 2,15 ± 0,01 | 0,64 ± 0,03 | 67,16 ± 1,5 | 44,85 ± 1,7 |
| Комплекс 5-окси-6-метилурацила с ЯК ($n = 10$) | 10 ⁻⁴ М | 56,25 ± 2,4* | 12,38 ± 1,2* | 1,69 ± 0,02* | 0,45 ± 0,05* | 38,87 ± 1,2* | 32,65 ± 1,1* |
| Комплекс 5-окси-6-метилурацила с ЯК ($n = 10$) | 10 ⁻³ М | 23,48 ± 0,9* | 5,46 ± 0,5* | 0,87 ± 0,05* | 0,28 ± 0,01* | 1,92 ± 0,03* | 1,1 ± 0,02* |

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Для оценки влияния препаратов на процессы перекисного окисления липидов были использованы модельные системы, содержащие липидно-белковые комплексы из гомогенизированного куриного желтка, соответствующие по составу липопротеидам крови низкой и очень низкой плотности, а также плазме крови человека. По полученным данным, введение комплексного соединения 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой в концентрации 10⁻⁴ М в модельную систему желточных липопротеидов вызывало снижение интенсивности хемиллюминисценции по сравнению с контрольным результатом на 52,7% ($p < 0,05$), а введение в плазму крови – на 21,4% ($p < 0,05$). С увеличением концентрации препарата происходило усиление подавления ХЛ. Воздействие комплексного соединения 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой более выражено в липопротеидах желтка, здесь при добавлении препарата в концентрации 10⁻³ М происходило угнетение ХЛ на 80,2% ($p < 0,05$) от контроля, в то время как в плазме крови – на 59,5% ($p < 0,05$). Эти результаты можно объяснить более сложным липидным составом плазмы в сравнении с липидами куриного желтка и большей окисляемостью не входящих в состав куриного желтка липидов.

Гипоксия одна из основных причин нарушений метаболизма и функции клеток при многих патологических состояниях. Возникающие серьезные нарушения окислительного и энергетического метаболизма клетки требуют поиска средств, ограничивающих активацию оксидативного стресса и оказывающих корректирующее влияние на метаболические процессы. Данное направ-

ление опирается на современные представления о важной роли активации процессов ПОЛ и состояния антиоксидантной системы в патогенезе, течении и прогнозе патологии гипоксической природы [5].

Проведенные исследования, представленные в табл. 2, свидетельствуют о наличии противогипоксической активности у комплексного соединения 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой. Данное соединение увеличивает время жизни мышей на модели гиперкапнической гипоксии в 1,76 раза ($p < 0,05$), что сопоставимо по эффективности с действием этомерзола. Известно, что гиперкапния повышает выброс катехоламинов, который приводит к спазму артериол, росту периферического сопротивления, выраженным нарушениям реологических свойств крови. Значительное увеличение времени жизни на модели ОГТК позволяет рассматривать это соединение, как средство эффективное при состояниях, связанных с избыточным накоплением углекислого газа.

В условиях гистотоксической гипоксии соединение повышало выживаемость животных на 48% ($p < 0,05$). Эффективность этомерзола на данной модели равна 84,1%. При тканевой гипоксии нарушается утилизация кислорода вследствие снижения количества или инактивации дыхательных ферментов и разобщения окисления и фосфорилирования. Возникновение тканевой гипоксии может быть обусловлено и активацией свободнорадикального окисления. В связи с этим увеличение времени жизни при введении комплекса свидетельствует о его способности ограничивать метаболические нарушения.

Таблица №2

Влияние комплекса 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой на продолжительность жизни белых мышей при ОГЕГ, ОГТГ и ОГКГ ($M \pm m$)

| Номер серии | Препарат | Доза мг/кг | ОГЕГ (n = 8) | | ОГТГ (n = 8) | | ОГКГ (n = 8) | |
|-------------|-------------------------------------|------------|------------------|-------------|------------------|-------------|------------------|-------------|
| | | | Время жизни, мин | % от контр. | Время жизни, мин | % от контр. | Время жизни, мин | % от контр. |
| 1 | Контроль | | 14,64 ± 1,2 | 100 | 18,37 ± 2,5 | 100 | 15,77 ± 1,1 | 100 |
| | Комплекс 5-окси-6-метилурацила с ЯК | 100 | 15,74 ± 2,0 | 107,5 | 27,16 ± 2,1* | 147,8 | 27,72 ± 1,2* | 175,8 |
| 2 | Контроль | | 10,2 ± 0,8 | 100 | 24,5 ± 2,0 | 100 | 16,6 ± 0,8 | 100 |
| | Этомерзол | 50 | 16,9 ± 0,8* | 166 | 45,1 ± 4,3* | 184,1 | 31,5 ± 2,8* | 189,7 |

Примечание: * – достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Особенность патологического процесса при гипоксии, вызванной введением токсических доз нитрита натрия, состоит в том, что метгемоглобинизирующее действие токсиканта дополняется оксидативным стрессом с ингибированием ферментов дыхательной цепи митохондрий, что ведет к нарушению их функционального состояния и метаболическим расстройствам. Данное соединение значительно не увеличивает продолжительность жизни белых мышей при введении летальных доз нитрита натрия. В то же время у крыс при введении токсиканта в дозе LD₅₀ комплексное соединение 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой улучшало окислительно-энергетический потенциал эритроцитов. Как следует из данных, представленных в табл. 3, введение нитрита натрия подавляло активность ферментов антиоксидантной защиты – каталазы и СОД, снижало уровень АТФ и существенно повышало количество ДК в эритроцитах. Эритроциты чувствительны к окислительному стрессу из-за повышенного содержания в мембране полиненасыщенных жирных кислот, высокой концентрации кислорода в клетке и отсутствия возможности ресинтезировать поврежденные структуры. Снижение уровня восстановленного глутатиона и активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) служит отражением дисбаланса глутатионовой системы защиты клеток от свободнорадикального повреждения. Известно, что эритроциты содержат богатые запасы глутатиона, причем 95% приходится на восстановленную форму. Глутатион участвует как в индуцированной глутатионпероксидазной реакции, так и в поддержании восстановленного состояния сульфгидрильных групп белковых молекул, редокс-стату-

са аскорбата и клетки в целом. Соотношение окисленных и восстановленных форм глутатиона зависит от скорости реакций пентозного цикла, ключевым ферментом которого является Г6ФДГ. Наблюдаемое уменьшение концентрации АТФ в эритроцитах приводит к снижению скорости образования восстановленных эквивалентов, тем самым повышается опасность окислительного разрушения эритроцитов.

В эритроцитах, отравленных нитритом натрия, крыс, которым вводили комплексное соединение 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой, выраженность изменений активности каталазы, СОД, общего уровня АТФ, восстановленного глутатиона была достоверно ниже, чем в контроле и приближалась к аналогичным показателям интактных животных. Учитывая важную роль в патогенезе гипоксий свободнорадикальных процессов, можно сказать, что восстановление окислительного гомеостаза составляет важное звено в терапии гипоксического синдрома при гемической гипоксии.

Заключение. Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что комплексное соединение 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой обладает антирадикальной, антиоксидантной активностью и повышает устойчивость животных к состояниям, характеризующимся дефицитом кислорода. Данное соединение ограничивает развитие гипоксического порочного круга, когда снижение активности ферментов антиоксидантной защиты сопряжено с интенсификацией процесса липопероксидации, а это, в свою очередь, провоцирует снижение активности ферментов, участвующих в поддержании окислительного и энергетического гомеостаза.

Таблица 3

Влияние комплекса 5-окси-6-метилурацила с янтарной кислотой на окислительно-энергетический потенциал эритроцитов при интоксикации нитритом натрия

| Показатель | Интактные животные, (n = 8) | Нитрит натрия (контроль), (n = 8) | Нитрит натрия + комплекс 5-окси-6-метилурацила с ЯК, (n = 8) |
|---|-----------------------------|-----------------------------------|--|
| ДК($\lambda = 232$), усл. ед. на 1 мл крови | 2,53 ± 0,2 | 4,48 ± 0,24* | 3,1 ± 0,18*^ |
| Каталаза, ммоль в мин на 1 мг гемоглобина | 92,7 ± 4,2 | 59,5 ± 4,8* | 87,2 ± 3,6^ |
| СОД, усл.ед. на 1 мг гемоглобина | 1,9 ± 0,09 | 0,78 ± 0,03* | 0,92 ± 0,02*^ |
| АТФ, мкмоль на 1 мл эритроцитов | 1,8 ± 0,19 | 0,7 ± 0,1* | 1,4 ± 0,2^ |
| Г6ФДГ, нмоль в мин на 1 мг гемоглобина | 14,5 ± 0,5 | 12,8 ± 0,66* | 16,2 ± 0,33*^ |
| Восстановленный глутатион, мг % | 78,3 ± 3,5 | 53,7 ± 4,1* | 72,3 ± 3,9^ |

Примечание: * – различие достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с интактными животными.

^ – различие достоверно ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой.

Список литературы

- Активация свободнорадикального окисления – ферментное звено типовых патологических процессов / под ред. Н.П. Чесноковой, М.Ю. Ледванова. – Саратов: Изд-во Саратов. мед. ун-та, 2006. – 177 с.
- Виноградов И.Л., Багрянцева С.Ю., Дервиз Г.В. Метод одновременного определения 2,3-ДФГ и АТФ в эритроцитах // Лаб. дело. – 1980. – № 7. – С. 424–426.
- Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Нахимов, Б.Г. Яровинский, Р.И. Лифшиц // Вопр. мед. химии. – 1989. – № 1. – С. 127–130.
- Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
- Лукиянова Л.Д. Новые подходы к созданию антигипоксантов метаболического действия // Вестник РАМН. – 1999. – №3. – С. 18–25.
- Макаренко Е.В. Комплексное определение активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в эритроцитах у больных с хроническими заболеваниями печени // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 48–50.
- Путилина Е.Ф. Определение восстановленного глутатиона в тканях. Методы биохимических исследований. – Л.: 1982. – С. 183–187.
- Чеснокова Н.П., Моррисон В.В., Понукалина Е.Ф., Афанасьева Г.А., Бизенкова М.Н., Барсуков В.Ю., Морозова О.Л., Полотова Н.В., Жевак Т.И. О роли активации свободнорадикального окисления в структурной и функциональной дезорганизации биосистем в условиях патологии // Фундаментальные исследования. – 2009. – №5. – С. 122–130.
- Шляпинтох В.Я. Хемиллюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. – М.: Наука, 1966.
- Glock G., McLean P. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver // Biochem. – 1953. – Vol. 55, № 3. – P. 400–408.

Рецензенты:

Минибаев М.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патофизиологии ГОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», г. Казань;

Овсянников В.Г., д.м.н., профессор, зав. кафедрой патофизиологии ГОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет», г. Ростов-на-Дону.