

УДК 615.9:616.36-085.2

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ОКСИМЕТИЛУРАЦИЛА

В.А. Мышкин, А.Б. Бакиров, Э.Ф. Репина, Д.О. Каримов, Г.В. Тимашева,

Н.Ю. Хуснутдинова, Д.А. Смолянкин

ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа, Россия

С учетом современных достижений биологической химии, фармакологии и токсикологии, представлены сведения о разработанном комплексном методическом подходе, который может быть рекомендован для изучения антиоксидантной активности лекарственных препаратов. Приведено экспериментальное обоснование наличия первичных антиоксидантных свойств у иммуномодулирующего препарата оксиметилурацила. Разработана принципиальная схема влияния оксиметилурацила на механизмы антиоксидантной защиты и репарации повреждений при активации перекисного окисления липидов токсическим фактором. Авторы полагают, что в фармакологической коррекции токсических повреждений, вызванных свободнорадикальными процессами, наибольший успех приносят средства метаболического типа действия, способные предупреждать гиперактивацию перекисного окисления липидов и подавление систем антиоксидантной защиты.

Ключевые слова: оксиметилурацил, антиоксидантные свойства, перекисное окисление липидов, токсическое повреждение, фармакологическая коррекция, антиоксидантная защита

OXYLMETHYLURACIL ANTIOXIDANT ACTIVITY

V.A. Myshkin, A.B. Bakirov, E.F. Repina, D.O. Karimov, G.V. Timasheva, N.Yu. Khusnutdinova,

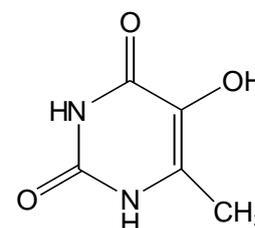
D.A. Smolyankin

Ufa Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, Russia

In view of the latest achievements of biological chemistry, pharmacology and toxicology, information about a comprehensive methodological approach that can be recommended for studying the antioxidant activity of medications is presented. Experimental substantiation of antioxidant properties of the immunomodulatory medication "oxymethyluracil" has been done. We have developed a concept of oxymethyluracil influence on the mechanisms of antioxidant protection and repair of damage in the activation of lipid peroxidation toxic factor. The authors suggest that the pharmacological correction of toxic damage caused by free radical processes, bringing the greatest success belongs to a metabolic type of action that can prevent hyperactivation of lipid peroxidation and suppression of antioxidant defense systems.

Key words: oxymethyluracil, antioxidant properties, lipid peroxidation, toxic damage, pharmacological correction, antioxidant protection

Препарат из фармакологического класса иммуномодуляторов – оксиметилурацил (ОМУ) является производным урацила, соединения близкого по строению к пиримидиновым основаниям нуклеиновых



кислот урацилу и тимину. ОМУ носит химическое название 5-гидрокси-6-метилурацил, имеет следующую структурную формулу:

Препарат всасывается в желудочно-кишечном тракте, после однократного приема он обнаруживается в крови через 60 минут.

ОМУ хорошо переносится, совместим при приеме с другими лекарственными средствами. Суточная доза препарата до 2,0 г. При длительном курсовом приеме ОМУ практически не кумулирует. В настоящее время выпускается в таблетированной форме под коммерческим названием «Иммурег» фирмой Башбиомед в г. Уфа. В основе действия ОМУ лежит оптимизирующее влияние на обменные процессы, опосредованные через активацию РНК-зависимого синтеза белка и блокады фермента уридинфосфатазы.

Активирующее действие ОМУ на базальные клеточные процессы обуславливает его главное клиническое применение, поскольку синтез белка лежит в основе иммунных реакций, репаративных и восстановительных процессов. Антиоксидантные свойства ОМУ были открыты В.А. Мышкиным в 1982 году, однако до настоящего времени препарат в качестве самостоятельного антиоксидантного средства широкого применения еще не получил. Накоплен значительный экспериментальный опыт, свидетельствующий о высокой защитной и антиоксидантной эффективности ОМУ при интоксикациях различными химическими веществами, обладающими нейротоксическим, пульмонотоксическим, кардио-, гемато- и особенно гепатотоксическим действием [2,3,4,5,6]. Выявлен положительный эффект от использования препарата в качестве средства коррекции последствий окислительного стресса при химически индуцированной патологии [3,5]. В тоже время, оценка клинической эффективности ОМУ при активации перекисного окисления липидов (ПОЛ) токсическим фактором, требует обоснования механизмов его антиоксидантного действия, которое может быть самостоятельным (первичным) в своем проявлении, так и явиться результатом нормализации метаболических (биоэнергетических) процессов, т.е. быть вторичным [1].

Цель: изучение антиоксидантных свойств ОМУ и механизмов его антиоксидантного действия.

Материал и методы исследования.

Изучение антиоксидантных эффектов ОМУ in vivo:

1) В полушариях головного мозга крыс при остром отравлении карбофосом - ОМУ в дозе 25 мг/кг вводили крысам внутрибрюшинно через 0,5 минуты, 3, 6, 24 и 48 часов после острого отравления животных карбофосом (260 мг/кг внутривенно).

2) В эритроцитах крыс при острой и субхронической интоксикации натрия нитритом – ОМУ в дозе 50 мг/кг вводили в желудок крысам за 2 часа до острого отравления натрия нитритом (100 мг/кг подкожно). Проводилось определение количества диеновых конъюгатов (ДК) в эритроцитах крыс через 6 часов после токсиканта.

3) В печени при экспериментальном моделировании токсической гепатопатии ПХБ – содержащим препаратом «Совтол-1» - Введение ОМУ в желудок в дозе 25 мг/кг за 1 час до ПХБ-содержащего препарата «Совтол-1» (смесь совола и трихлорбензола) 2 раза в неделю в течение 30 суток.

Изучение антиоксидантных эффектов ОМУ in vitro [7,8]:

1) В модельной системе иницированного окисления этилбензола – Система состояла из смеси этилбензол : ледяная уксусная кислота в соотношении 3:2, в которой содержался активатор 9,10 – дибромантрацен (5×10^{-4} М), инициатор – азодиизобутиронитрил (10^{-2} М) и изучаемое соединение (ОМУ). Препаратом сравнения служили ионол и супероксиддисмутаза (СОД) – эталонные (референтные) препараты с антирадикальным механизмом действия. K_7 рассчитывали по формуле:

$$K_7 = \left(\sqrt{\frac{J_0}{J}} - l \right) \times \frac{\sqrt{w_i \times K_6}}{[IuH]}$$

где J_0 – интенсивность хемилюминисценции (ХЛ) до введения ОМУ;

J – интенсивность ХЛ после введения ОМУ;

w_i – скорость иницирования реакции;

K_6 – константа скорости рекомбинации перекисных радикалов этилбензола;

$[IuH]$ – концентрация ингибитора.

2) Влияние ОМУ на «быструю вспышку» хемилюминесценции перекиси водорода – В термостатическую кювету помещали 3% H_2O_2 в количестве 18,5 мл. С целью иницирования реакции сопровождающейся ХЛ вводили раствор $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ в стандартной концентрации. Основной характеристикой процесса ХЛ служила интенсивность «быстрой вспышки» в присутствии и отсутствии ингибитора (исследуемых препаратов в различных концентрациях).

3) Влияние ОМУ на светосумму свечения «медленной вспышки» хемилюминесценции в модельной системе сыворотки крови собаки – Исследовали ХЛ 0,5 мл сыворотки крови собаки разведенной в 18,5 мл солевого раствора (20 мМоль KH_2PO_4 и 105 мМоль KCl ; рН 7,45). В качестве инициатора использовали соль $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Исследуемые препараты вводили в инкубационную смесь в стандартном количестве – 1 мг.

4) Влияние ОМУ на скорость восстановления нитротетразолия синего в модельной системе генерирующей супероксид-анион радикал – Система состояла из 0,066 М фосфатного буфера (рН 7,8); 1 мМоль ЭДТА; 0,407 мМоль нитротетразолия синего; 1,8 мкМоль феназинметасульфата; 1 мМоль НАД·Н, 1 мг желатина. Инкубацию проводили 10 минут в аэробных условиях при 25°C. Об активности препаратов судили по скорости изменения оптической плотности в ходе восстановления нитротетразолия синего при длине волны 540 нм.

5) Влияние ОМУ на светосумму свечения «медленной вспышки» хемилюминесценции суспензии митохондрий печени крыс – Условия эксперимента аналогичны п. 4.

Обсуждение результатов.

Антиоксидантные эффекты ОМУ in vivo

1. В полушариях головного мозга крыс при остром отравлении карбофосом.

Результаты опытов представлены в таблице 1. Они свидетельствуют о том, что применение ОМУ снизило у отравленных крыс количество продуктов ПОЛ: ДК, шиффовых оснований (ШО) на фоне полного восстановления до нормы, подавленной карбофосом, активности супероксиддисмутаза (СОД), Na,K-АТФазы, сукцинатдегидрогеназы (СДГ), НАД·Н-дегидрогеназы (НАД·Н-ДГ) и моноаминоксидазы (МАО).

Таблица 1.

Влияние ОМУ на процессы свободнорадикального окисления и метаболические системы головного мозга на 14 сутки после острого отравления крыс карбофосом

Показатели	Группы животных		
	интактные	карбофос	карбофос + ОМУ
ДК, ед.оп.пл/мг	0,18±0,01	0,58±0,03*	0,30±0,04**
ШО, у.ед./мг мин.	0,16±0,02	0,34±0,02*	0,21±0,02**
СОД, ед/мг белка	2,68±0,02	2,19±0,05*	2,48±0,06**
Na,K- АТФаза, мк МФ/мг белка/час	4,53±0,44	2,79±0,36*	4,57±0,56**
СДГ, у.ед.	8,50±0,09	8,17±0,20*	8,59±0,10**
НАД·Н – ДГ, у.ед.	8,86±0,13	8,46±0,08*	8,89±0,18**
МАО, у.ед.	7,99±0,10	7,44±0,10*	7,98±0,05**

Примечание: * - P<0,05 по сравнению с интактными

** - P<0,05 по сравнению с гр. «карбофос»

Таким образом, лечебно-профилактическое введение оксиметилурацила при остром отравлении карбофосом тормозит активацию процессов ПОЛ и подавление системы антиоксидантной защиты.

2. В эритроцитах крыс при острой и субхронической интоксикации натрия нитритом. ОМУ в дозе 50 мг/кг при введении в желудок крысам за 2 часа до острого отравления натрия нитритом (100 мг/кг подкожно) значительно уменьшает накопление ДК в эритроцитах крыс через 6 часов после токсиканта. Препарат оказывает нормализующий эффект на активность каталазы (КАТ), СОД и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ). Антиоксидантный эффект ОМУ сохраняется в условиях субхронической нитритной интоксикации (1/2 ДЛ₅₀) в течение 60 суток (табл. 2).

Таблица 2.

Показатели свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты на фоне терапии ОМУ в эритроцитах крыс при экспериментальной нитритной интоксикации

Показатель	Группы животных		
	интактные	NaNO ₂	NaNO ₂ + ОМУ
I. Острая интоксикация			
ДК, усл.ед.	82,1±5,0	173,0±27,0*	93,2±7,8**
КАТ, мМоль/мин/г	31,7±1,8	20,9±1,12*	28,8±1,6 **
СОД, усл. ед/мг	1,07±0,04	0,80±0,05*	1,14±0,04 **
Г-6-ФДГ, нМоль/мин/мг	15,7±0,4	10,2±0,6*	13,9±0,5 **
II. Субхроническое отравление			
ДК, усл. ед.	86,2±4,0	179,4±7,3*	115,8±8,4**
ШО, усл.ед/мг/ мин	0,16±0,01	0,24±0,02*	0,18±0,01 **
КАТ, мМоль/мин/г	3 2,1±1,5	20,1±1,2*	30,6±1,1 **
СОД, усл. ед/мг	1,02±0,03	0,83±0,04*	1,05±0,05 **

Г-6-ФДГ, нМоль/мин/мг	14,6±0,56	12,7±0,49*	13,3±0,54 **
-----------------------	-----------	------------	--------------

Примечание: * - P<0,05 по сравнению с интактными

** - P<0,05 по сравнению с группой NaNO₂

3. В печени при экспериментальном моделировании токсической гепатопатии ПХБ – содержащим препаратом «Совтол-1».

Введение ОМУ в желудок в дозе 25 мг/кг за 1 час до ПХБ-содержащего препарата «Совтол-1» (смесь совола и трихлорбензола) 2 раза в неделю в течение 30 суток оказывает гепатопротекторный и антиоксидантный эффект: ограничивает накопление продуктов ПОЛ – изолированных двойных связей (ИДС), ДК, триеновых конъюгатов (ТК), ТБК-реагирующих продуктов (ТБК-РП), способствует активации в ткани печени СОД и сохранению активности глутатионпероксидазы (ГП) (табл. 3). Применение оксиметилурацила стабилизирует в печени крыс глутатионовую антиоксидантную систему (АОС), которая участвует в разнообразных метаболических реакциях, направленных на поддержание клеточного гомеостаза организма и защиту его от окислительного стресса (табл. 4).

Таблица 3.

Показатели свободнорадикального окисления (СРО) и антиоксидантной защиты (АОЗ) при поражении печени ПХБ-содержащим препаратом «Совтол-1» на фоне коррекции ОМУ

Показатели	Группы животных		
	Контроль – интактные крысы	Совтол-1	Совтол-1+ ОМУ
ИДС, усл.ед./100 г.тк.	2,7±0,01	5,5±0,02*	2,9±0,05**
ДК, усл.ед./100 г.тк.	2,0±0,09	4,1±0,08*	2,8±0,16**
ТК, усл.ед./100 г.тк.	1,1±0,10	2,1±0,11*	1,2±0,10**
ТБК-РП, нмоль/г.тк	90,4±4,1	23,1±3,4*	80,1±3,3**
СОД, усл.ед./мин/ г.белка	168,8±8,6	125,3±4,5*	180,5±10,6**
ГП, мкмоль/мин/г	20,6±1,0	11,4±1,1*	20,0±2,2**

Примечание: * - P<0,05 по сравнению с контролем

** - P<0,05 по сравнению с группой Совтол-1

Таблица 4.

Показатели свободнорадикального окисления и глутатионовой антиоксидантной системы, при поражении печени ПХБ-содержащим препаратом «Совтол-1» на фоне коррекции ОМУ (в % к контролю, принятому за 100%)

Показатели	Группы животных	
	Совтол-1	Совтол-1+ ОМУ
ТБК – реагирующие продукты	+ 215,3	+ 123,6
Каталаза	- 48,7	+ 9,5
Глутатион	- 42,6	+ 3,8
Глутатионредуктаза	- 52,0	- 22,6
Глутатионпероксидаза	- 33,8	- 3,4

Глутатионтрансфераза	- 37,9	- 1,8
Гамма-глутамилтрансфераза	- 36,9	+ 2,5
Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа	-78,3	- 26,9

Антиоксидантные эффекты ОМУ in vitro.

1. В модельной системе инициированного окисления этилбензола.

Результаты исследований представлены в таблице 5, они свидетельствуют о высокой активности ОМУ, превосходящей ингибирующий эффект ионола и токоферола (ацетата α -токоферола и токоферола-хинона), а также 6-метилурацила (>10 000 раз). Антирадикальная активность (АРА) комбинации ОМУ+аскорбиновая кислота (АК) превосходит АРА индивидуальных препаратов – ОМУ и АК. Однако значительно уступает АРА супероксиддисмутазы. Антиоксидант N-ацетил цистеин в данных условиях окисления не активен.

Таблица 5.

Константы скорости взаимодействия ОМУ и препаратов сравнения с перекисными радикалами.

Препараты	$K_7(\text{л/моль}\cdot\text{с}^{-1})$
ОМУ	$(2,6 \pm 0,3) \cdot 10^4$
6 - метилурацил	$(3,0 \pm 0,9) \cdot 10^1$
Токоферол (хинон)	$(6,4 \pm 0,5) \cdot 10^3$
Ацетат- α -токоферола	$(2,3 \pm 0,2) \cdot 10^1$
СОД	$(5,35 \pm 0,07) \cdot 10^9$
Аскорбиновая кислота	$2,7 \cdot 10^5$
N-ацетил цистеин	0
Ионол	$(2,3 \pm 0,6) \cdot 10^4$
ОМУ + АК	$3,7 \cdot 10^6$

2. Влияние ОМУ на «быструю вспышку» хемилюминесценции перекиси водорода.

Результаты исследований представлены в таблице 6, они свидетельствуют о том, что наибольшей АРА обладает 5-аминоурацил. ОМУ активнее ионола и метилурацила.

Таблица 6.

Влияние ОМУ и препаратов сравнения на «Реакцию Фентон» - концентрации, обеспечивающие 90% ингибирование «быстрой вспышки» хемилюминесценции (ХЛ) в модельной системе 3% H_2O_2 (инициатор - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Соединение (препарат)	90% ингибирование «быстрой вспышки» ХЛ
метилурацил	не достигается
ОМУ	1,2мм
5-аминоурацил	0, 5мм
ионол	7,8 мм



3. Влияние ОМУ на светосумму свечения «медленной вспышки» хемилюминесценции в модельной системе сыворотки крови собаки.

Результаты исследований представлены в таблице 7, они свидетельствуют о различном их влиянии на интенсивность «медленной вспышки» ХЛ. Введение в инкубационную среду ОМУ и ионола полностью блокировало «медленную вспышку» ХЛ, что может свидетельствовать об их высокой антиоксидантной активности превосходящей активность метилурацила, 5-аминоурацила и цистамина

Таблица 7.

Влияние ОМУ и препаратов сравнения на светосумму свечения «медленной вспышки» хемилюминесценции сыворотки крови собаки (в % к контролю).

Соединение (препарат) (10 ⁻⁴ М)	Светосумма излучения
метилурацил	54,5±2,4
ОМУ	0
5-аминоурацил	26,2±0,9
цистамин	40,0±1,7
ионол	0

4. Влияние ОМУ на скорость восстановления нитротетразолия синего в модельной системе генерирующей супероксид-анион радикал.

Результаты опытов представлены в таблице 8. Наиболее высокой АРА обладает 5-аминоурацил. АРА ОМУ сопоставима с активностью ионола и в 3,5 раза выше активности метилурацила.

Таблица 8.

Влияние ОМУ и препаратов сравнения на скорость восстановления нитротетразолия синего в модельной системе, генерирующей O₂⁻

Соединение (препарат)	Ингибирующая активность в %
метилурацил	12,8±0,5
ОМУ	42,3±1,9
5-аминоурацил	50,3 ±2,5
ионол	48,4±2,8

5. Влияние ОМУ на светосумму свечения «медленной вспышки» хемилюминесценции суспензии митохондрий печени крыс

Результаты исследования ХЛ 0,5 мл суспензии митохондрий печени крыс при введении в инкубационную смесь ОМУ и препаратов сравнения представлены в таблице 9. Они свидетельствуют о высокой активности ОМУ, превосходящей активность 6-метилурацила и 5-аминоурацила. Однако она ниже, чем у ионола и комбинации ОМУ+ глицирризиновая кислота.

Таблица 9.

Влияние ОМУ и препаратов сравнения на светосумму свечения «медленной вспышки» хемилюминесценции суспензии митохондрий печени крыс

Соединение (препарат)	*Светосумма измерения
6-метилурацил	18,7±1,7
ОМУ	11,5±2,6
5-аминоурацил	31,2±3,2
ОМУ+ глицирризиновая кислота	6,3±0,5
ионол	2,5±0,8

Примечание: * - показатель контроля принят за 100%.

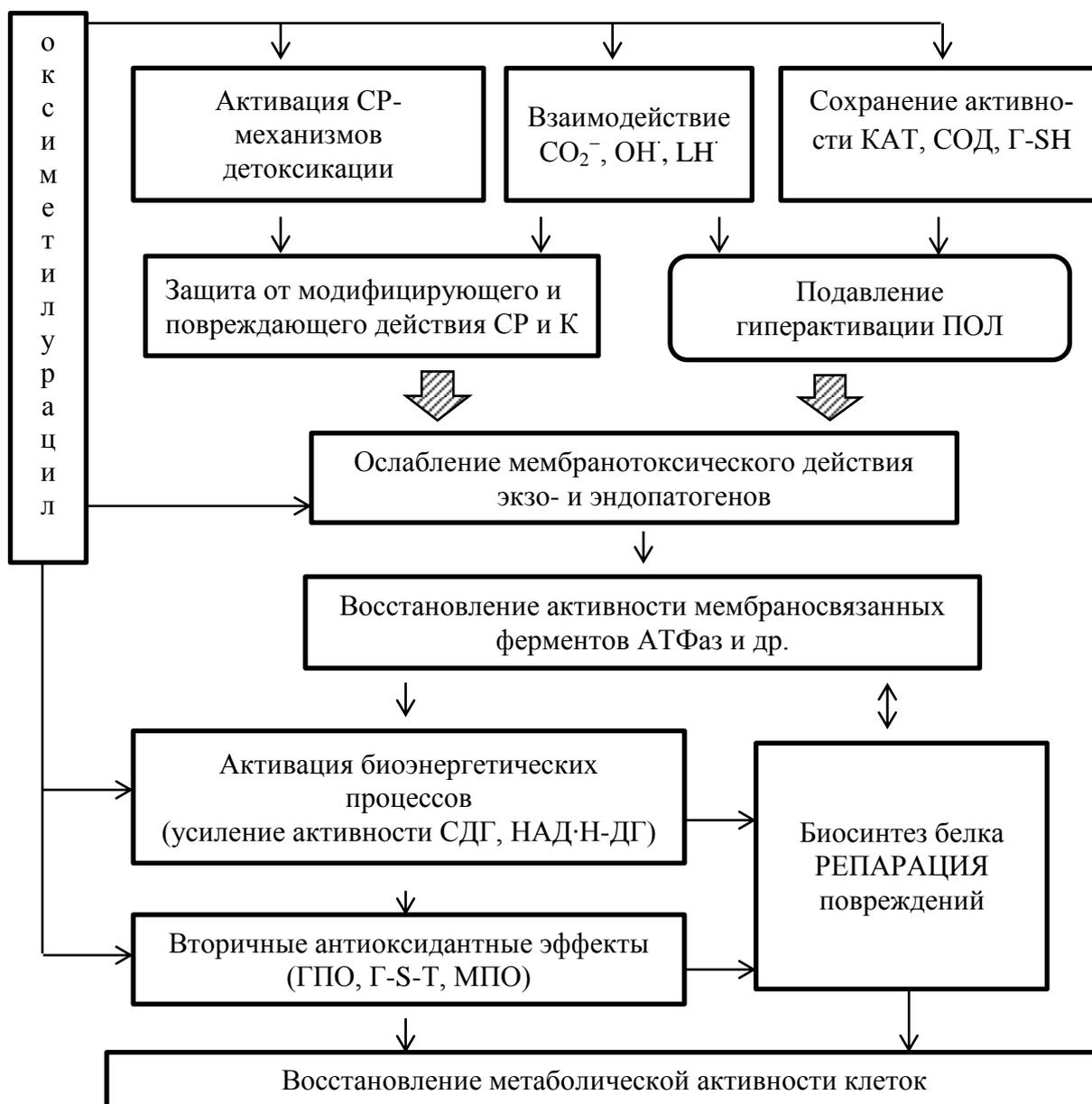


Рисунок 1. Принципиальная схема влияния ОМУ на механизмы антиоксидантной защиты и репарации повреждений при активации ПОЛ токсическим фактором.

На рис. 1. представлена разработанная нами схема влияния ОМУ на механизмы антиоксидантной защиты и репарации повреждений при активации ПОЛ токсическим фактором.

Выводы:

1. В рамках единого комплексного подхода изучены антиоксидантные свойства ОМУ при экспериментальных интоксикациях различными химическими веществами, в которых установлена патогенетическая значимость нарушений антиоксидантной системы и гиперактивации ПОЛ как наиболее общего звена токсогенеза.

2. ОМУ является эффективным средством коррекции ПОЛ и нарушений АОЗ в эритроцитах крыс при острой и субхронической интоксикации натрия нитратом.

3. ОМУ проявляет выраженное антиоксидантное действие в полушариях головного мозга при остром отравлении крыс карбофосом; на 14 сутки постинтоксикационного периода препарат предупреждает накопление диеновых конъюгатов, шиффовых оснований, падение активности супероксиддисмутазы и оказывает благоприятное влияние на метаболическое состояние мозга по показателям активности Na, K-АТФазы, сукцинатдегидрогеназы, НАД·Н-дегидрогеназы и моноаминоксидазы.

4. ОМУ на модели токсической гепатопатии сохраняет содержание восстановленной формы глутатиона и способствует сохранению в печени активности глутатион- S-трансферазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и гамма-глутамилтрансферазы.

5. Антиоксидантное действие ОМУ в условиях поражения печени ПХБ-содержащим препаратом «Совтол-1» проявляется в ограничении накопления продуктов ПОЛ - изолированных двойных связей, диеновых конъюгатов, триеновых конъюгатов, ТБК-реагирующих продуктов и восстановлении активности ферментов антиоксидантной защиты.

6. Антиоксидантные эффекты ОМУ *in vivo* подтверждаются результатами тестирования *in vitro*, в которых препарат значительно ингибирует процессы спонтанного (аутоокисление) и индуцированного ПОЛ.

7. Разработана принципиальная схема влияния ОМУ на ПОЛ, механизмы антиоксидантной защиты и репарации при активации ПОЛ токсическим фактором (по экспериментальным данным).

8. Обосновано новое применение препарата «Оксиметилурацил» в качестве антиоксиданта.

Список литературы:

1. Голиков С.Н. Общие механизмы токсического действия / С.Н. Голиков, И.В. Саноцкий, Л.А. Тиунов. – М.: Медицина, 1986 – 279 с.
2. Мышкин В.А. Оксиметилурацил. Очерки экспериментальной фармакологии / В.А. Мышкин, А.Б. Бакиров. – Уфа, 2001. – 218 с.
3. Мышкин В.А. Коррекция перекисного окисления липидов при экспериментальных интоксикациях различными химическими веществами. – Уфа- Челябинск, 2010. – 393 с.
4. Мышкин В.А. Антиоксидантная коррекция отравлений / В.А. Мышкин, Д.А. Еникеев. – Уфа, 2009. – 404 с.

5. Мышкин В.А. Окислительный стресс и повреждение печени при химических воздействиях / В.А. Мышкин, А.Б. Бакиров. – Уфа, 2010. – 176 с.
6. Влияние метилурацила и оксиметилурацила на свободно-радикальное окисление в модельных системах / В.А. Мышкин, З.Г. Хайбуллина, С.А. Башкатов и др. // Бюллетень эксп. биологии и медицины. – 1995. - №8. – С. 142-145.
7. Фархутдинов Р.Р. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине / Р.Р. Фархутдинов, В.А. Лиховских. – Уфа. – 1995. – 87 с.
8. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов / В.Я. Шляпинтох, О.Н. Карпунин, Л.М. Постников и др. – М.: Наука, 1966. – 300 с.