

# ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

## НОВЫЙ ИНДУКТОР МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ 6,8-ДИМЕТИЛ-2-ПИПЕРИДИНОМЕТИЛ-2,3-ДИГИДРОТИАЗОЛО[2,3-f]КСАНТИН КАК КОРРЕКТОР ВНУТРИПЕЧЕНОЧНОГО ХОЛЕСТАЗА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

И. Л. Никитина, Е. К. Алехин, Ф. А. Халиуллин<sup>1</sup>

Новый индуктор монооксигеназной системы 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-f]ксантин в экспериментах на крысах препятствовал развитию внутрипеченочного холестаза, вызванного  $\alpha$ -нафтилизотиоцианатом, и стимулировал антитоксическую функцию печени. Он увеличивал выживаемость крыс, восстанавливал содержание микросомального белка, цитохрома P-450, уменьшал среднечелюточную хрупкость эритроцитов, снижал активность маркеров холестаза и количество ТБК-активных продуктов в гепатоцитах.

**Ключевые слова:** холестаз внутрипеченочный, индукторы монооксигеназной системы,  $\alpha$ -нафтилизотиоцианат

### ВВЕДЕНИЕ

Применение индукторов монооксигеназной системы (МОС) обосновано при гепатобилиарной патологии, сопряженной с синдромом депрессии детоксицирующей функции печени — внутри- и подпеченочном холестазах, токсическом гепатите, ишемии печени, циррозе [6]. Стимулируя цитохромы P-450 (P-450) и конъюгирующие ферменты, они проявляют выраженные МОС-корректирующие свойства, потенцируя эффект гепатопротекторов и повышая, тем самым, эффективность терапии [5, 9].

В результате многолетних исследований по синтезу и изучению свойств производных азотсодержащих гетероциклов в БГМУ найден 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-f]ксантин (гепазан), проявляющий свойства сильного индуктора фенобарбиталового типа [1].

Нами исследован эффект гепазана на модели внутрипеченочного холестаза, вызванного введением  $\alpha$ -нафтилизотиоцианата (АНИТ), который наиболее часто используется с этой целью в эксперименте [4], в сравнении с референтным индуктором бензоалом.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Холестаз воспроизводили на неинбредных половозрелых крысах-самцах массой 180–220 г однократным внутрижелудочным введением масляного раствора АНИТ в дозе 100 мг/кг. Через сутки животным в желудок начинали вводить индукторы (с +1 по +4 день в дозе 35 мг/кг на 2% крахмальной слизи). Контрольные крысы получали крахмальную слизь в эквивалентных количествах. На 5-е сутки с момента введения АНИТ у крыс оценивали длительность гексеналового сна (ГС, 80 мг/кг внутривенно) после чего под легким эфирным наркозом их

декапитировали. В микросомальной фракции печени, полученной по методу S. A. Kamath и K. A. Narayan [8], определяли содержание цитохромов P-450 и  $b_5$  [10], в сыворотке крови с помощью стандартных наборов — активность щелочной фосфатазы, гаммаглутамилтрансферазы (ГГТ), содержание общего (ОБ) и связанного билирубина (СБ), холестерина (ХЛ) (“Lachema”, Чешская Республика), в периферической крови — осмотическую резистентность эритроцитов [2, 11], в гомогенате печени — количество ТБК-активных продуктов (“Агат Биомед”, Москва) и интенсивность хемилюминесценции (образование активных форм кислорода регистрировали на хемиллюминиметре ХЛМ-003, в качестве иницирующего раствора использовали 1 мл 50 мМ раствора сернокислого железа [7]). Результаты обрабатывали с использованием пакета статистических программ Statistica 5.5 (StatSoft, USA) и Биостат 4.03 (S. A. Glantz). Применялись следующие методы: проверка нормальности распределения (с использованием показателей асимметрии, эксцесса, критерия Колмогорова-Смирнова); проверка равенства дисперсий с помощью критерия Фишера-Снедекора; проверка гипотезы о равенстве выборочных средних - дисперсионный анализ Краскела — Уоллиса. Выборочные расчетные параметры, приводимые далее, имеют следующие обозначения:  $M$  — выборочное среднее арифметическое значение,  $m$  — стандартная ошибка выборочной средней арифметической;  $s$  — среднее квадратическое отклонение;  $n$  — объем анализируемой выборки,  $N$  — критерий Краскела — Уоллиса;  $p$  — достигнутый уровень значимости. Критическое значение уровня значимости принималось равным 5%. Оценку статистически значимой разницы выборочных средних проводили с помощью Q-критерия Данна и  $\chi^2$  [3].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Инттоксикация АНИТ приводит к гибели более половины животных (суммарная гибель 17 из 29;  $\chi^2 = 24,05$   $p = 0$ ). На 5-е сутки после заправки в печени выживших крыс уменьшается содержание микросомального белка (на 16%), P-450 (на 67%) и  $b_5$  (на 30%), что сопровождается угнетением каталитической активности МОС и увеличением длительности ГС в 1,9 раза по сравнению с интактным контролем. Под влиянием АНИТ наблюдается четкая тенденция к рос-

<sup>1</sup> Кафедра фармакологии (зав. — проф. Е. К. Алехин) Башкирского государственного медицинского университета, Уфа, 450000, ул. Ленина, 3.

## Влияние гепазана и бензонала на метаболические показатели печени и сыворотки крыс с АНИТ-холестазом

| Показатель                            | Контроль                     | АНИТ-холестаз                            | АНИТ-холестаз + гепазан 35 мг/кг                         | АНИТ-холестаз + бензонал 35 мг/кг                        | Проверка гипотезы о равенстве выборочных средних |
|---------------------------------------|------------------------------|--|--|--|--|
| P-450, нмоль/мг белка                 | 0,28 ± 0,02<br>0,04 (n = 7)  | 0,09 ± 0,03<br>0,07 (n = 6)<br>p < 0,01* | 0,29 ± 0,06<br>0,14 (n = 6)<br>p < 0,05**                | 0,25 ± 0,03<br>0,08 (n = 6)<br>p < 0,05**                | H (3, N = 25) = 12,137 p = 0,0069                |
| b <sub>5</sub> , нмоль/мг белка       | 0,46 ± 0,03<br>(n = 7)       | 0,32 ± 0,03<br>(n = 5) p < 0,05*         | 0,43 ± 0,04<br>(n = 5)                                   | 0,33 ± 0,05<br>(n = 6)                                   | H (3, N = 23) = 8,592 p = 0,0353                 |
| Микросомальный белок, мг/мл           | 2,77 ± 0,09<br>0,22 (n = 6)  | 2,28 ± 0,07<br>0,16 (n = 5)<br>p < 0,05* | 2,83 ± 0,09<br>0,20 (n = 5)<br>p < 0,05**                | 2,77 ± 0,13<br>0,28 (n = 5)<br>p < 0,05**                | H (3, N = 21) = 9,379 p = 0,0247                 |
| Гексеналовый сон, мин                 | 16,3 ± 3,8<br>9,3 (n = 6)    | 41,0 ± 6,9<br>15,4 (n = 5)<br>p < 0,01*  | 9,7 ± 0,7<br>1,8 (n = 6)<br>p < 0,05**                   | 6,5 ± 0,2<br>0,6 (n = 6)<br>p < 0,01*;<br>p < 0,01**     | H (3, N = 24) = 17,71<br>p = 0,0005              |
| ГГТ, мкмоль/л · с                     | 0,22 ± 0,02<br>0,06 (n = 7)  | 0,45 ± 0,02<br>0,04 (n = 6)<br>p < 0,01* | 0,29 ± 0,03<br>0,07 (n = 6)<br>p < 0,05**                | 0,55 ± 0,07<br>0,16 (n = 5)<br>p < 0,01*;<br>p < 0,01*** | H (3, N = 24) = 18,15<br>p = 0,0004              |
| ЩФ, мкмоль/л · с                      | 12,6 ± 1,6<br>4,6 (n = 8)    | 18,9 ± 0,6<br>1,6 (n = 6)<br>p < 0,05*   | 14,3 ± 1,6<br>4,3 (n = 7)                                | 13,3 ± 1,6<br>4,4 (n = 8)<br>p < 0,05**                  | H (3, N = 29) = 9,12<br>p = 0,028                |
| Холестерин, ммоль/л                   | 1,9 ± 0,4<br>0,9 (n = 8)     | 2,8 ± 0,1<br>0,3 (n = 6)                 | 3,1 ± 0,8<br>2,3 (n = 8)                                 | 2,5 ± 0,2<br>0,5 (n = 6)                                 | H (3, N = 28) = 2,431 p = 0,488                  |
| Общий билирубин, мкмоль/л             | 13,6 ± 0,8<br>2,2 (n = 7)    | 22,5 ± 0,9<br>2,5 (n = 7)                | 27,6 ± 2,5<br>6,5 (n = 7)<br>p < 0,01*                   | 24,1 ± 1,6<br>3,2 (n = 4)<br>p < 0,05*                   | H (3, N = 25) = 15,56<br>p = 0,0014              |
| Прямой билирубин, мкмоль/л            | 12,1 ± 0,8<br>1,9 (n = 7)    | 14,7 ± 0,5<br>1,3 (n = 6)                | 15,4 ± 0,9<br>2,1 (n = 6)                                | 17,5 ± 0,9<br>1,9 (n = 5)<br>p < 0,01*                   | H (3, N = 24) = 12,06                            |
| Среднеклеточная хрупкость эритроцитов | 0,45 ± 0,01<br>0,03 (n = 11) | 0,46 ± 0,01<br>0,02 (n = 5)              | 0,41 ± 0,01<br>0,03 (n = 10)<br>p < 0,05*;<br>p < 0,05** | 0,46 ± 0,02<br>0,04 (n = 5)<br>p < 0,05***               | H (3, N = 31) = 11,265<br>p = 0,0104             |
| ТБК-активные продукты, ммоль/л        | 13,9 ± 1,3<br>4,4 (n = 12)   | 33,9 ± 3,9<br>9,4 (n = 6)<br>p < 0,01*   | 17,5 ± 2,2<br>7,0 (n = 10)<br>p < 0,05**                 | 16,4 ± 0,9<br>2,3 (n = 6)<br>p < 0,05**                  | H (3, N = 35) = 16,31<br>p = 0,001               |
| Хемилюминисценция:                    |                              |  |  |  |  |
| светосумма, усл. ед./мин              | 78,7 ± 1,9<br>6,9 (n = 12)   | 64,3 ± 4,9<br>10,9 (n = 5)               | 75,5 ± 5,6<br>18,4 (n = 11)                              | 92,6 ± 3,4<br>8,3 (n = 6)<br>p < 0,05*;<br>p < 0,01**    | H (3, N = 34) = 12,74<br>p = 0,005               |
| максимальная светимость, усл. ед.     | 12,3 ± 0,3<br>1,2 (n = 13)   | 9,3 ± 0,7<br>1,4 (n = 4)<br>p < 0,05*    | 11,3 ± 0,7<br>2,2 (n = 11)                               | 13,9 ± 0,2<br>0,3 (n = 5)<br>p < 0,01**;<br>p < 0,05***  | H (3, N = 33) = 14,44<br>p = 0,0024              |
| вспышка, усл. ед.                     | 2,4 ± 0,3<br>0,9 (n = 14)    | 2,2 ± 0,2<br>0,5 (n = 4)                 | 2,2 ± 0,3<br>0,8 (n = 10)                                | 2,1 ± 0,2<br>0,4 (n = 5)                                 | H (3, N = 33) = 0,476<br>p = 0,924               |
| спонтанная светимость, усл. ед.       | 1,9 ± 0,2<br>0,9 (n = 14)    | 1,8 ± 0,2<br>0,4 (n = 4)                 | 1,8 ± 0,2<br>0,7 (n = 10)                                | 1,7 ± 0,2<br>0,5 (n = 5)                                 | H (3, N = 33) = 0,032 p = 0,998                  |

**Примечание.** В таблице приведены  $M \pm m$ ;  $s$ ;  $n$ . Уровень значимости для Q-критерия Данна при сравнении: \* — с интактным контролем; \*\* — с АНИТ-холестазом; \*\*\* — с АНИТ-холестаз + гепазан. ГГТ — гаммаглутамилтрансфераза, ЩФ — щелочная фосфатаза.

ту концентрации ОБ (на 65 %), СБ (на 28 %), ХЛ (на 41 %) и статистически значимое увеличение активности ГГТ (в 2,2 раза) и щелочной фосфатазы (на 37 %), таблица.

Оба изученных индуктора МОС позитивно влияли на течение внутрипеченочного холестаза. Однако более сильный защитный эффект оказывал гепазан, кото-

рый статистически значимо, по сравнению с холестазными животными и получавшими бензонал, снижал летальность крыс (суммарная гибель 5 из 29; [сравнение с холестазом:  $\chi^2 = 10,55$   $p = 0,0012$ ; с бензоналом:  $\chi^2 = 10,55$   $p = 0,0012$ ]). Действие бензонала, было нестабильным и варьировало в разных сериях эксперимента от абсолютной защиты до увеличения летально-

сти (суммарная гибель 13 из 21;  $\chi^2 = 0,05$   $p = 0,815$ ). Биохимические параметры у леченных бензоналом холестазных животных мало отличались от показателей “гепазановых” крыс. Оба индуктора сравнимо друг с другом возвращали до уровня интактного контроля количество микросомального белка, P-450,  $b_5$  в печени крыс с АНИТ-холестазом, снижали длительность ГС, содержание в сыворотке ХЛ, ЩФ и статистически значимо не изменяли показателей ОБ, СБ, по сравнению с нелечеными холестазами животными (см. таблицу). Единственным весомым отличием эффекта гепазана было снижение до уровня интактного контроля активности органоспецифичного маркера холестаза — ГГТ, тогда как бензонал не только не купировал гиперферментемию, но и вызывал тенденцию к увеличению ее активности (см. таблицу). Разница между эффектами сравниваемых соединений была статистически значима. Механизм подобного действия гепазана, по-видимому, отчасти обусловлен его мембраностабилизирующим эффектом. На фоне АНИТ — холестаза он достоверно, по сравнению с холестазом, интактными животными и получавшими бензонал, уменьшал средноклеточную хрупкость эритроцитов, что, несомненно, является положительной характеристикой нового индуктора МОС (см. таблицу). Еще одним важным отличием гепазана, как корректора внутрипеченочного холестаза, является иной, чем у бензонала, тип действия в отношении активности свободнорадикальных процессов в печени крыс. Если бензонал приводил к значимому росту показателей хемилюминесценции (светосуммы и максимальной светимости) гомогената печени в сравнении с холестазом, то гепазан их не изменял. Однако оба индуктора достоверно снижали количество ТБК- активных продуктов, приводя эти показатели к значениям контроля (см. таблицу).

Таким образом, гепазан оказывает выраженный защитный эффект при АНИТ-холестазе, превосходящий бензонал по ряду характеристик, который, вероятно, обусловлен совокупностью его МОС-индуцирующих и мембраностабилизирующих свойств.

## ВЫВОДЫ

1. Новый индуктор монооксигеназной системы 6,8-диметил-2-пиперидинометил-2,3-дигидротиазоло[2,3-f]ксантин (гепазан) оказывает отчетливый защитный эффект при внутрипеченочном холестазе, вызванном  $\alpha$ -нафтилизотиоцианатом, существенно увеличивая выживаемость крыс.

2. Гепазан эффективно корригирует нарушенную детоксицирующую функцию печени у крыс с внутрипеченочным холестазом, восстанавливая содержание микросомального белка, цитохромов P-450, длительность гексеналового сна, и проявляет умеренные гепатопротекторные свойства - снижает сывороточную активность маркеров холестаза и активность перекисного окисления липидов в печени.

## ЛИТЕРАТУРА

1. И. В. Багманова, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Уфа (2002).
2. Н. Л. Василевская, *Бюл. exper. биол.*, № 12, 68 – 72 (1955).
3. С. Гланц, *Медико-биологическая статистика*, Практика, Москва (1999).
4. Т. П. Новожеева А. С. Саратиков, *Сиб. журн. гастроэнтерол. и гепатол.*, № 8, 55 – 60 (1999).
5. Е. А. Посохова, *Экспер. и клин. фармакол.*, **59**(4), 73 – 79 (1996).
6. А. С. Саратиков, Р. Р. Ахмеджанов, А. А. Бакибаев, и др., *Регуляторы ферментативных систем детоксикации среди азотсодержащих соединений*, Сибирский издательский дом, Томск (2002).
7. Р. Р. Фархутдинов, В. А. Лиховских, *Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине*, Уфа (1995).
8. S. A. Kamath and K. A. Narayan, *Anal. Biochem.*, **8**(1), 53 – 61 (1972).
9. N. G. Melnichenko, I. V. Zverinsky, L. F. Legonkova, et al., *Toxicology Letters.*, **95**(1001), 165 (1998).
10. T. Omura and R. Sato, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 – 2385 (1964).
11. T. Waugh and E. Asherman, *J. Lab. Clin. Med.*, **23**(7), 746 – 751 (1938).

Поступила 25.04.03

## 6,8-DIMETHYL-2-PIPERIDINOMETHYL-2,3-DIHYDROTHIAZOLO[2,3-f]XANTHIN E: A NEW INDUCTOR OF THE MONOOXYGENASE SYSTEM INHIBITS EXPERIMENTAL INTRAHEPATIC CHOLESTASIS IN RATS

I. L. Nikitina, E. K. Alekhin, and F. A. Khaliullin

Pharmacology Department, Bashkir State Medical University, ul. Lenina 3, Ufa, Bashkortostan, 450000 Russia

6,8-Dimethyl-2-piperidinomethyl-2,3-dihydrothiazolo[2,3-f]xanthin e, a new inductor of the monooxygenase system, inhibited the development of experimental intrahepatic cholestasis induced by  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate in rats. The drug stimulated the detoxicating function of liver, increased the survivability of rats, restored the level of microsomal protein and cytochrome P-450, decreased the cell-average erythrocyte fragility, and reduced the activity of cholestasis markers and the amount of TBA-active products in hepatocytes.