

©Коллектив авторов

## ВОЗДЕЙСТВИЕ 6-ГИДРОКСИ-2,2,4-ТРИМЕТИЛ-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИНА НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ У КРЫС

*Д.А. Бразжникова<sup>1\*</sup>, Т.Н. Попова<sup>1</sup>, Е.Д. Крыльский<sup>1</sup>, К.К. Шульгин<sup>1</sup>,  
Л.В. Матасова<sup>1</sup>, Х.С. Шихалиев<sup>1</sup>, С.С. Попов<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет,  
394018, Воронеж, Университетская площадь, 1; \*эл. почта: [dasha.brazhnikowa@yandex.ru](mailto:dasha.brazhnikowa@yandex.ru)  
<sup>2</sup>Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко, Воронеж

Проведено исследование воздействия 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на маркерные показатели цитолиза гепатоцитов (активность аспаргатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы и гамма-глутамилтранспептидазы), параметры, отражающие состояние оксидативного статуса (интенсивность биофлуоресценции и содержание диеновых конъюгатов), и активность ферментов окислительного метаболизма (аконитатгидратазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и NADP-изоцитратдегидрогеназы) в условиях развития CCl<sub>4</sub>-индуцированного поражения печени. Полученные в ходе работы результаты свидетельствуют о наличии у тестируемого соединения способности снижать степень выраженности окислительного стресса и повреждения клеток печени, а также изменять активность аконитатгидратазы и NADP-генерирующих ферментов в направлении контрольных значений. Введение 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на фоне патологии приводило к возникновению более выраженных изменений для большинства анализируемых параметров по сравнению с воздействием карсила. Тенденция к нормализации состояния оксидативного статуса и активности ферментов окислительного метаболизма может быть обусловлена проявлением тестируемым соединением гепатопротекторных и антиокислительных свойств.

**Ключевые слова:** токсическое поражение печени; свободнорадикальное окисление; аконитатгидратаза; 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин; глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; NADP-изоцитратдегидрогеназа

**DOI:** 10.18097/PBMC20196504331

### ВВЕДЕНИЕ

Важное место среди проблем современной медицины занимают заболевания печени воспалительно-дегенеративного характера, распространённость которых имеет тенденцию к увеличению. Существуют данные, что осложнения, развивающиеся на фоне токсических поражений печени, занимают ведущие позиции в числе причин смертности среди пациентов с болезнями органов пищеварительной системы [1].

Одним из наиболее изученных гепатотропных ядов, для которого картина патогенеза схожа с острыми поражениями печени различными ксенобиотиками, является четырёххлористый углерод (CCl<sub>4</sub>). В связи с этим он широко используется в экспериментальной медицине для моделирования токсического гепатита. В ходе метаболизма CCl<sub>4</sub> в монооксигеназной микросомальной системе печени образуются многочисленные свободные радикалы (СР), в частности, трихлорметильный радикал, которые вызывают окислительный стресс. Генерируемые реактивные молекулы индуцируют пероксидное окисление липидов (ПОЛ) мембран и взаимодействуют с различными белками с образованием ковалентных связей. Это, в конечном итоге, приводит к нарушению функции белков и работы ферментативных систем, разрушению структуры клеточной мембраны и повышению её проницаемости, выходу печеночных ферментов в кровь и гибели клеток [2].

При чрезмерном поступлении в организм CCl<sub>4</sub> адаптивных резервов системы антиокислительной защиты может оказаться недостаточно, что обуславливает развитие окислительного стресса и способствует формированию токсического гепатита. Таким образом, учитывая остроту проблемы поражений печени токсической природы, актуальной темой для исследований представляется поиск гепатопротекторных средств, обладающих выраженными антиокислительными свойствами. В последнее время активно обсуждаются возможности применения антиоксидантов для коррекции нарушений, характерных для широкого ряда печёночных патологий. В частности, рассматриваются возможности применения соединений природного происхождения при алкогольной и неалкогольной жировой болезни печени [3], проводятся работы по оценке протекторных свойств витамина С, N-ацетилцистеина и астаксантина на модели стеатоза печени [4], исследуются эффекты растительных эфирных масел в условиях развития токсического поражения печени, индуцированного циклофосфамидом [5]. Наряду с поиском и изучением свойств антиоксидантов природного происхождения активно изучаются протекторы, полученные путём химического синтеза. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о наличии гепатопротекторных свойств у производных дигидрохинолина. Так, была показана способность 6,6-метилена-бис (2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина)

и 6,6-метилен-бис (2,2-диметил-4-метансульфоновой кислоты натрия-1,2-дигидрохинолина) предотвращать острые поражения печени, вызванные галактозамином и  $\text{CCl}_4$  [6]. Некоторые производные дигидрохинолина проявляют антиоксидантную активность. Например, 6-этокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин, известный как этоксихин или сантохин, обладает хорошо выраженным противooksидательным действием, в связи с чем он используется как консервант при изготовлении кормов сельскохозяйственных животных, а также с целью профилактики некоторых заболеваний птицы [7]. Таким образом, актуальными представляются исследования биологических эффектов данного производного при состояниях, сопровождающихся развитием окислительного стресса. На кафедре органической химии Воронежского государственного университета (ВГУ) была разработана методика синтеза 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (ДГХ) и осуществлено его получение для проведения настоящего исследования [8].

В качестве препарата сравнения в нашей работе был использован карсил. Данный препарат в настоящее время широко применяется как гепатопротекторное средство; его действующим веществом является силимарин, обладающий, в том числе, антиоксидантной активностью. Карсил популярен в качестве препарата сравнения для оценки эффективности потенциальных лекарственных средств при токсических поражениях печени [9].

Известно, что стеатоз является одним из ключевых патогенетических факторов развития неалкогольной жировой болезни печени, неалкогольного стеатогепатита, прогрессирования фиброза [10]. Накопление жиров в гепатоцитах характерно и для острых токсических поражений печени. Одним из механизмов гепатотропного действия  $\text{CCl}_4$  является ингибирование  $\beta$ -окисления и активация биосинтеза жирных кислот и холестерина, что происходит за счёт увеличения поступления ацетата в клетки печени [11]. Таким образом, в условиях  $\text{CCl}_4$ -индуцированного развития оксидативного стресса и воздействия соединений, способных ограничивать степень выраженности опосредованных СР повреждений, интерес представляют исследования функционирования ферментов окислительного метаболизма, участвующих в липидном обмене и работе антиоксидантных систем клетки. Среди данных ферментов можно выделить аконитатгидратазу (АГ, аконитаза, К.Ф. 4.2.1.3), катализирующую реакцию обратимой изомеризации цитрата в изоцитрат. Известны две изоформы АГ: цитоплазматическая и митохондриальная. Данные изоформы различаются по физико-химическим и структурным свойствам и выполняют разнонаправленные физиологические функции, что обуславливает участие АГ как в катаболических, так и в анаболических процессах. Активный центр данного фермента содержит железосерный кластер, легко подвергающийся деструкции под действием СР [12]. Угнетение митохондриальной формы АГ в условиях

интенсификации свободнорадикального окисления сопряжено с замедлением цикла трикарбоновых кислот и, соответственно, снижением уровня потока электронов через дыхательную цепь [12]. Цитоплазматическая форма фермента обеспечивает, в первую очередь, регуляцию накопления и утилизации цитрата [12], играющего роль предшественника субстрата для биосинтеза жирных кислот – ацетил-СоА, образующегося в АТФ-цитратлиазной реакции. С другой стороны, цитрат обладает способностью хелатировать прооксидантные ионы металлов переменной валентности. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ, КФ 1.1.1.49) является лимитирующим ферментом пентозофосфатного пути, к основным продуктам которого относятся рибозо-5-фосфат, необходимый для биосинтеза нуклеиновых кислот, и NADPH. NADP-изоцитратдегидрогеназа (NADP-ИДГ, КФ 1.1.1.42) катализирует декарбоксилирование изоцитрата до 2-оксоглутарата и локализуется, главным образом, в цитоплазме, небольшой пул активности фермента обнаруживается также в митохондриях. Осуществляя генерацию NADPH, Г6ФДГ и NADP-ИДГ участвуют в регуляции путей, связанных с биосинтезом липидов [13] и защитой от окислительного стресса, поставляя восстановительные эквиваленты для функционирования ряда компонентов антиоксидантной защиты [14].

Целью данной работы было исследование гепатопротекторной активности ДГХ и его воздействия на функционирование ферментов окислительного метаболизма при индукции тетрахлорметанового повреждения печени (ТПП). На основании поставленной цели для выполнения работы были сформулированы следующие задачи: оценить показатели цитолиза гепатоцитов при введении ДГХ на фоне индукции ТПП; проанализировать воздействие тестируемого соединения на интенсивность протекания процессов свободнорадикального окисления при развитии патологии; исследовать активность АГ, NADP-ИДГ и Г6ФДГ – ферментов, участвующих в липогенезе и поддержании редокс-состояния клеток, – при введении ДГХ на фоне индукции ТПП.

Таким образом, в ходе работы впервые была проведена оценка гепатопротекторного потенциала новосинтезированного ДГХ и исследовано воздействие данного соединения на интенсивность свободнорадикального окисления и активность ряда ферментов окислительного метаболизма.

## МЕТОДИКА

Объектом исследования были выбраны самцы белых лабораторных крыс (*Rattus norvegicus*) Wistar массой 200-250 г (питомник лабораторных животных КролИнфо, Россия, Московская обл.). Острое ТПП моделировали путём однократного внутривентрикулярного введения  $\text{CCl}_4$  в дозе 0,064 мл, растворённого в 1 мл вазелинового масла, на 100 г массы животного. Экспериментальные животные были разделены на 6 групп: 1 группу (n=12)

составляли интактные животные; 2 группа (n=12) включала крыс с индуцированным ТПП; животным 3 группы (n=10) через 3 ч после  $\text{CCl}_4$  в течение 3-х дней с интервалом в 24 ч внутрижелудочно вводили ДГХ в дозе 50 мг на 1 кг веса, растворённого в 1 мл 1% крахмала; в 4 группе (n=10) крысы с  $\text{CCl}_4$ -гепатитом получали карсил в дозе 50 мг/кг по аналогичной схеме. В пересчёте на количество силимарина в данной лекарственной форме (22,5 мг на таблетку массой 500 мг), животные получали 2,25 мг/кг, что сопоставимо с терапевтической дозой для человека, указанной в инструкции к препарату. Крысам 5 и 6 групп (n=8), содержащимся на стандартном режиме вивария, вводили соответственно ДГХ и карсил в дозе 50 мг/кг. На четвёртый день эксперимента у наркотизированных животных производили забор печени и крови из сердца. Ткань печени гомогенизировали в четырёхкратном объёме среды для выделения, содержащей 0,05 М трис-НСl буфер (pH=7,8), 1 мМ ЭДТА, 1%  $\beta$ -меркаптоэтанол, после чего центрифугировали при 8000 g в течение 15 мин. Для исследования использовали полученный супернатант и сыворотку крови.

Активность маркерных ферментов цитолиза гепатоцитов – аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТ), определяли с использованием наборов реагентов фирмы “Ольвекс Диагностикум” (Россия).

Для определения интенсивности процессов свободнорадикального окисления и общей антиоксидантной активности в образце использовали метод биохемилюминесценции (БХЛ), индуцированной пероксидом водорода с сульфатом железа. Кинетическую кривую БХЛ регистрировали в течение 30 с, используя биохемилюминометр БХЛ-07 (“Medozons”, Россия), и определяли следующие параметры: светосумму хемилюминесценции (S), интенсивность максимальной вспышки ( $I_{\max}$ ), величину тангенса угла наклона касательной к кривой хода БХЛ ( $\text{tg}\alpha_2$ ). Реакционная среда содержала 0,4 мл 0,02 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,5), 0,4 мл 0,01 мМ  $\text{FeSO}_4$  и 0,2 мл 2% раствора пероксида водорода, вносимого непосредственно перед измерением. Исследуемый материал добавляли в объёме 0,1 мл до внесения пероксида водорода.

Для оценки интенсивности процессов ПОЛ был использован оптический метод определения содержания диеновых конъюгатов (ДК) при длине волны 233 нм с применением спектрофотометра Hitachi U1900 (Япония) [15].

Активность аконитатгидратазы определяли спектрофотометрическим методом при 235 нм. Среда для анализа активности фермента содержала 0,15 мМ цитрат, 50 мМ трис-НСl-буфер, pH 7,8. Реакцию инициировали внесением исследуемого образца в спектрофотометрическую кювету. Концентрацию цитрата оценивали по методу Нательсона [16].

Активность Г6ФДГ и NADP-ИДГ оценивали по увеличению оптической плотности опытных образцов при 340 нм, вызванному восстановлением

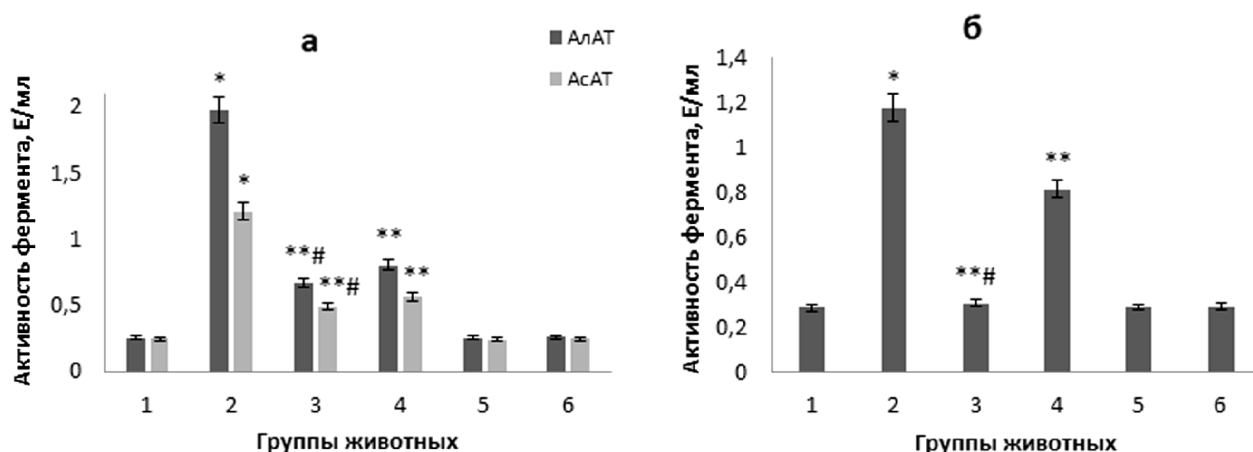
NADP. Среда спектрофотометрирования для оценки активности Г6ФДГ содержала 50 мМ трис-НСl буфер (pH 7,8), 3,2 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,25 мМ NADP, 1,0 мМ  $\text{MgCl}_2$ . Активность NADP-ИДГ измеряли в среде спектрофотометрирования, содержащей 50 мМ трис-НСl буфер (pH 7,8), 1,5 мМ изоцитрат, 2 мМ  $\text{MnCl}_2$ , 0,4 мМ NADP.

Содержание белка определяли с помощью биуретового реактива [17].

Для обработки результатов исследования использовали описательную статистику с определением выборочного среднего, выборочного стандартного отклонения, стандартной ошибки среднего [18]. Результаты работы анализировали, используя t-критерий Стьюдента для множественных сравнений с поправкой Бонферрони. Нормальность распределения значений в группах оценивали с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Достоверными считали различия при  $p < 0,05$ . В таблице и на рисунках представлены данные как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследовали гепатопротекторную активность ДГХ и карсила при моделировании ТПП. Введение ДГХ на фоне развития патологии приводило к сдвигу показателей активности АсАТ, АлАТ и ГГТ в направлении контроля, причём данные изменения были более выраженными, чем после введения карсила. Так, введение ДГХ в качестве протектора способствовало снижению в сыворотке крови активности АсАТ, АлАТ и ГГТ в 2,5, 2,9 и 3,9 раза, относительно значений этих показателей у животных второй экспериментальной группы (ТПП, индуцированное введением  $\text{CCl}_4$ ). Введение препарата сравнения было менее эффективно и приводило к уменьшению данных показателей в 2,1, 2,5 и 1,4 раза соответственно (рис. 1). Коэффициент де Ритиса (соотношение активности АсАТ/АлАТ) для животных с ТПП снижался в 1,6 раза относительно показателей интактных крыс, что, по мнению ряда авторов, свидетельствует о существенной роли воспалительных процессов в развитии данного патологического состояния [19]. Введение ДГХ и карсила на фоне развития  $\text{CCl}_4$ -индуцированного ТПП приводило к сдвигу соотношения активности АсАТ/АлАТ в направлении показателей интактной группы на 19% и 15% соответственно. Все эти результаты свидетельствуют в пользу того, что ДГХ обладает более выраженным гепатопротекторным действием в сравнении с карсилом. По-видимому, в основе протекторной активности исследуемого соединения лежит способность дезактивировать СР, чрезмерная генерация которых является ключевым фактором повреждения гепатоцитов при ТПП. Проявление антирадикальной активности ДГХ может быть связано с наличием гидроксильной группы и р-сопряжением электронов N и O в *para*-положении ароматического цикла [20]. Кроме того, известны протекторные свойства других производных дигидрохинолина.



**Рисунок 1.** Активность АлАТ, АсАТ (а) и ГГТ (б) в сыворотке крови крыс экспериментальных групп при развитии тетрахлорметанового повреждения печени и воздействии 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина. Здесь, а также в таблице и в последующих рисунках: 1 – интактные животные; 2 – группа животных с ТПП; 3 – животные с ТПП, которые получали 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 50 мг/кг; 4 – животные с ТПП, получавшие карсил в дозе 50 мг/кг; 5 – контрольная группа, получавшая 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолин в дозе 50 мг/кг; 6 – контрольная группа, получавшая карсил в дозе 50 мг/кг. Различия достоверны при  $p < 0,05$ : \* – по сравнению с интактной группой, \*\* – по сравнению с патологией, # – по сравнению с группой животных, получавших карсил на фоне патологии.

**Таблица.** Параметры биофлуоресценции в сыворотке крови (а) и печени (б) крыс при воздействии 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на фоне индукции тетрахлорметанового повреждения печени

Показатель	$I_{\max}$ , МВ		S, мВ		$\text{tg}\alpha_2$	
	а	б	а	б	а	б
1	25,2±1,26	42,0±2,10	307,7±15,38	92,3±4,61	13,3±0,67	8,1±0,41
2	51,2±2,56*	86,7±4,33*	739,8±36,99*	236±11,80*	29,5±1,47*	16,65±0,83*
3	25,9±1,29**	53,7±2,69**#	310,0±15,50**	101,75±5,09**	15,8±0,79**	12,82±0,64**
4	28,0±1,40**	63,6±3,18**	314,1±15,71**	112,06±5,6**	15,4±0,77**	14,1±0,70**
5	23,5±1,17	45,0±2,25	278,2±13,91	90,2±4,51	11,7±0,58	9,05±0,45
6	26,4±1,32	41,3±2,06	315,4±15,77	95,7±4,79	14,2±0,71	8,0±0,40

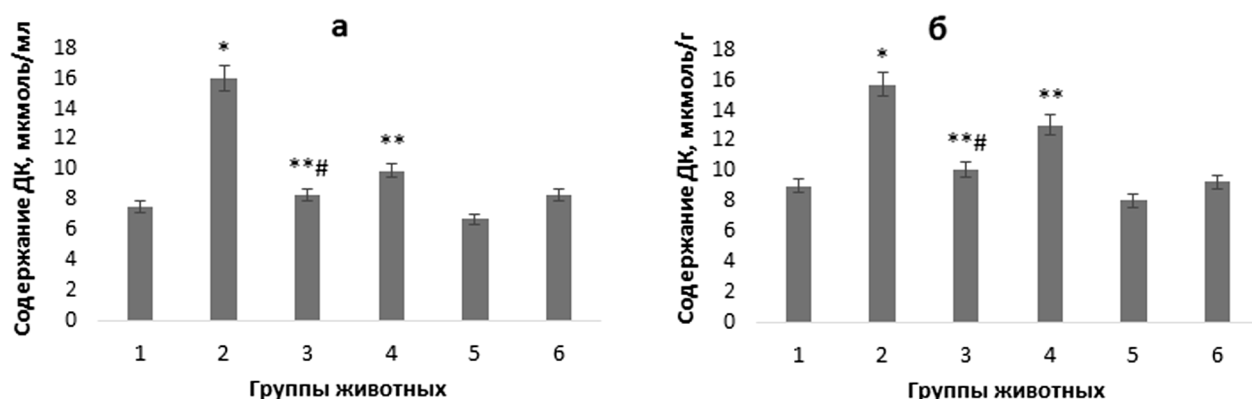
Ранее были установлены нейропротекторные свойства соединения, относящегося к хинолиновым 1,2-дигидропроизводным – этоксихина [21]. В контрольных группах крыс, получавших ДГХ и карсил, существенных изменений активности АсАТ, АлАТ и ГГТ не наблюдалось.

ДГХ оказывал гепатопротекторный эффект при введении на фоне развития ТПП. Поскольку одним из ключевых звеньев патогенеза  $\text{CCl}_4$ -индуцированного гепатита выступает окислительный стресс, то для выяснения механизмов цитопротекторного действия ДГХ нами была проведена оценка интенсивности свободнорадикального окисления у экспериментальных животных. Ранее было показано, что развитие ТПП сопряжено со значительным возрастанием показателей БХЛ, содержания ДК, а также угнетением активности АГ [22]. Результаты работы показали, что введение ДГХ на фоне ТПП приводило к уменьшению значений  $I_{\max}$ , S и  $\text{tg}\alpha_2$  в 1,6, 2,3 и 1,3 раза в печени и в 2,0, 2,4 и 1,9 раза в сыворотке крови крыс. В то же время, воздействие карсила при патологии сопровождалось менее значительными изменениями параметров БХЛ

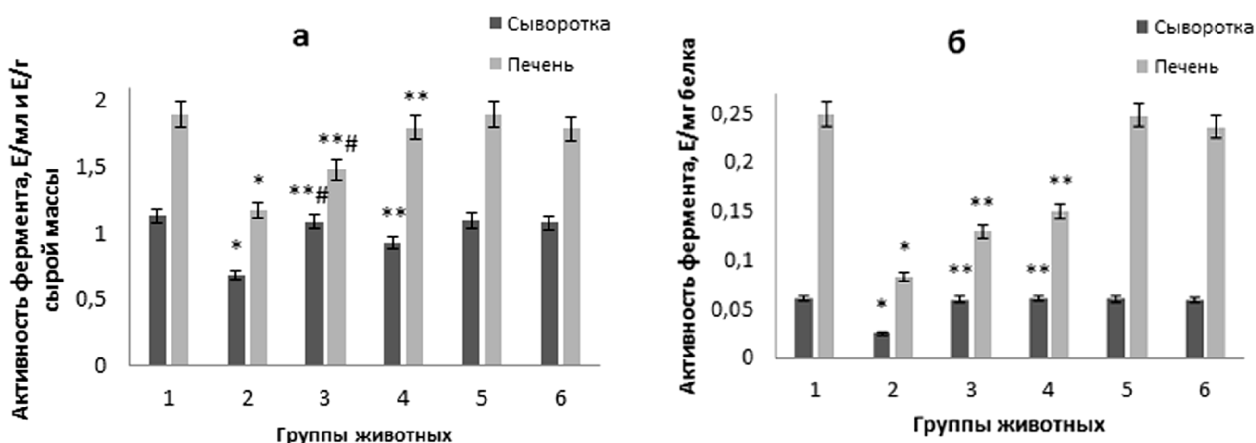
в печени животных. Так, показатели  $I_{\max}$ , S и  $\text{tg}\alpha_2$  снижались у крыс четвертой группы в 1,4, 2,1 и 1,2 раза относительно данных при патологии (таблица).

Содержание ДК у крыс, получавших на фоне патологии ДГХ, снижалось в сыворотке крови в 1,9 раза, в печени – в 1,5 раза относительно животных второй группы. Введение карсила способствовало уменьшению данного показателя соответственно в 1,6 и 1,2 раза (рис. 2).

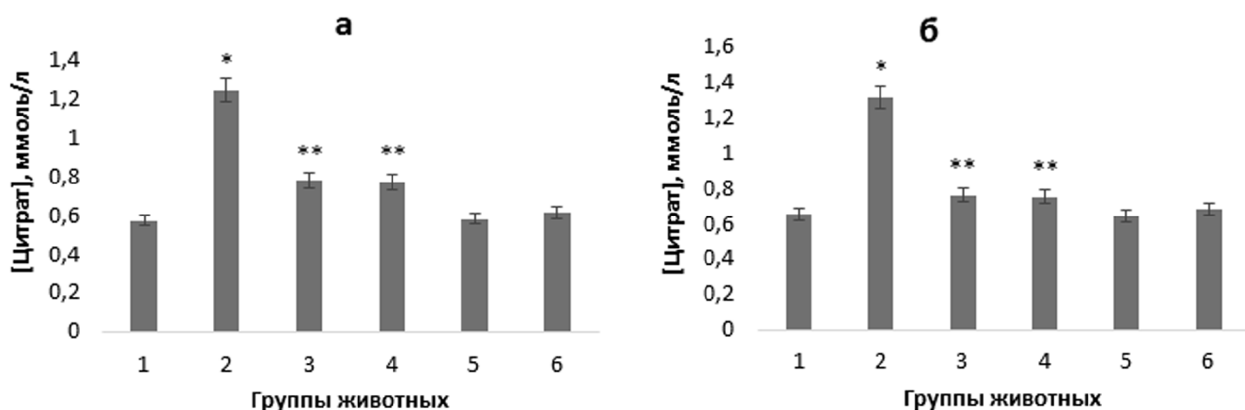
Известно, что развитие ТПП сопровождается угнетением активности фермента окислительного метаболизма АГ – чувствительной мишени действия свободных радикалов [22]. Снижение активности данного фермента было продемонстрировано также в ходе клинических исследований у пациентов с лекарственным гепатитом [23]. При введении крысам ДГХ на фоне ТПП наблюдалась тенденция к нормализации активности АГ: в печени данный показатель возрастал в 1,3 раза, а в сыворотке крови – в 1,6 раза относительно значений этих показателей у крыс второй группы (рис. 3а). На фоне происходящих изменений снижалось и содержание цитрата в 1,7 и 1,6 раза соответственно (рис. 4а,б).



**Рисунок 2.** Воздействие 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на содержание диеновых конъюгатов в сыворотке крови (а) и печени (б) крыс при тетрахлорметановом повреждении печени.



**Рисунок 3.** Активность АГ, выраженная в Е/мл сыворотки крови и Е/г сырой массы ткани печени (а), а также удельная активность фермента в сыворотке крови и печени крыс (б) при введении 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина крысам с ТПП.



**Рисунок 4.** Влияние 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина на содержание цитрата в сыворотке крови (а) и печени (б) крыс при ТПП.

Таким образом, отмечено снижение концентрации предшественника субстрата для процесса биосинтеза жирных кислот, играющего существенную роль в развитии стеатоза и фиброза в условиях его активации [10]. В контрольных группах, получавших ДГХ и карсил, существенных изменений показателей интенсивности свободнорадикального окисления обнаружено не было. Удельная активность АГ в тканях животных экспериментальных групп проявляла схожую динамику (рис. 3б). Вероятно, обнаруженные изменения обусловлены проявлением

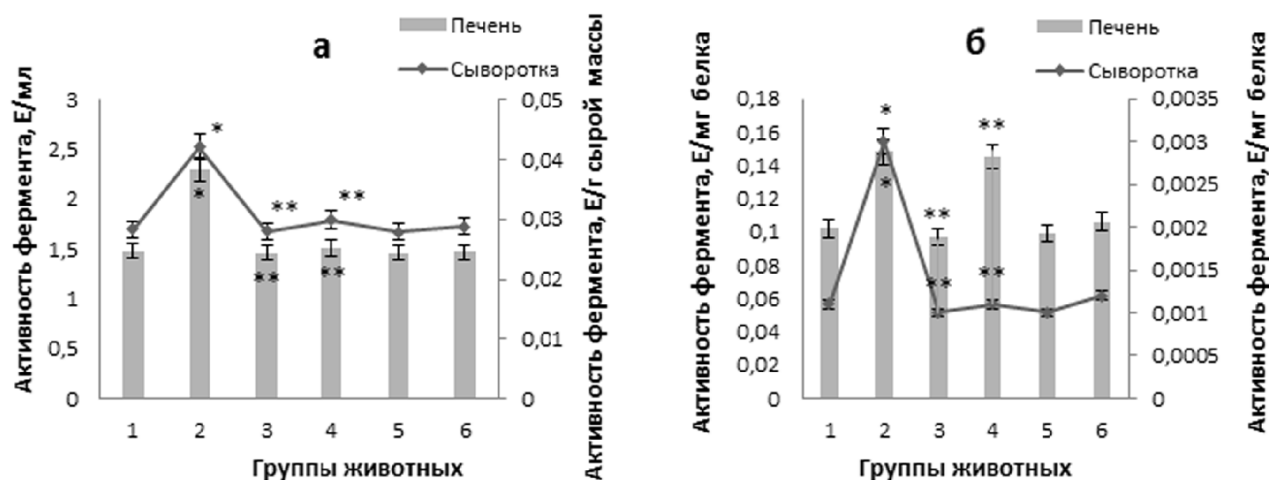
ДГХ антиокислительных свойств при развитии ТПП, основным патогенетическим звеном которого выступает окислительный стресс. Известно, что после попадания в печень при низком парциальном давлении кислорода  $\text{CCl}_4$  способен превращаться в радикалы  $\text{CCl}_3^{\cdot}$  и  $\text{CHCl}_2^{\cdot}$  [24]. В данных условиях значительно нарушается метаболизм липидов и развивается стеатоз или ожирение печени. С другой стороны, высокое парциальное давление кислорода способствует превращению  $\text{CCl}_4$  в радикал  $\text{CCl}_3\text{-OO}^{\cdot}$  с последующей активацией ПОЛ и индукции

в клетках апоптоза. Кроме того, повреждение клеточных мембран сопровождается выделением провоспалительных хемокинов и цитокинов, приводящем к эндотоксическому шоку и воспалительному повреждению печени [24]. Введение препарата сравнения на фоне ТПП оказывало несколько более выраженное воздействие на активность АГ в печени по сравнению с эффектом ДГХ. Вероятно, данный эффект карсила обусловлен способностью основного компонента препарата, силимарина, оказывать позитивное воздействие на метаболизм. Так, было показано, что применение силимарина как отдельно, так и в сочетании с янтарной кислотой, способствовало восстановлению скорости клеточного дыхания, возрастанию сопряжения окисления и фосфорилирования, увеличению скорости метаболизма интермедиатов цикла Кребса при экспериментальном ингибировании  $\beta$ -окисления жирных кислот [25]. Следует отметить, что и для других производных дигидрохинолина было продемонстрировано наличие антиокислительного эффекта. Так, с помощью виртуального скрининга были получены соединения дигидрохинолинового ряда, показавшие высокую антиоксидантную активность [26]. Известно также о наличии у производных 8-гидроксихинолина способности снижать уровень  $\beta$ -амилоида, выступать в роли сквенджеров свободных радикалов, хелатировать ионы меди [27].

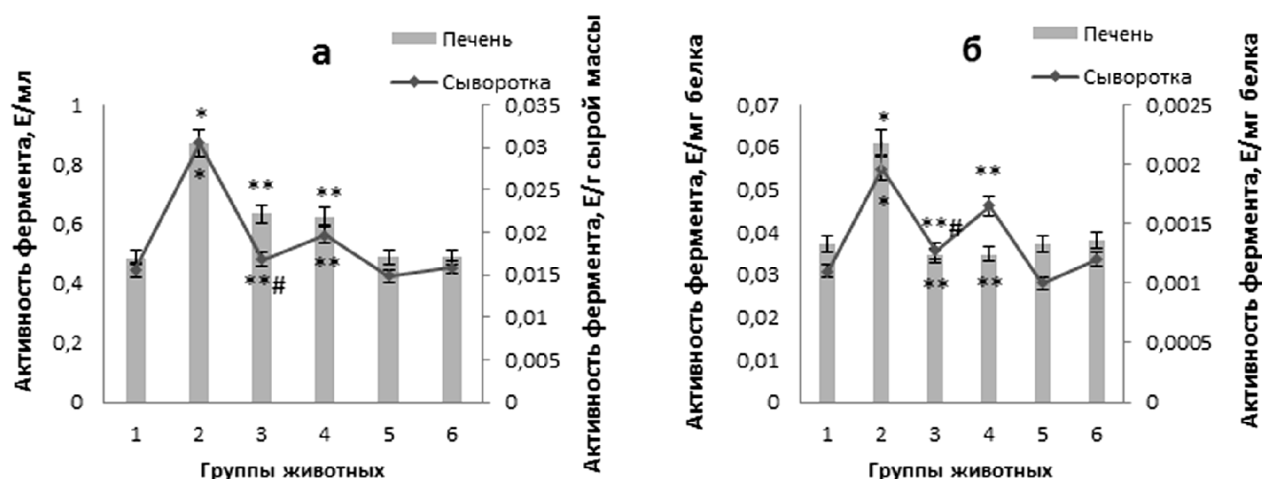
Известно, что NADPH выступает в качестве восстановительного эквивалента в процессе биосинтеза жирных кислот, а также играет роль в функционировании глутатионовой антиоксидантной системы, обеспечивающей снижение степени окислительного стресса. Ранее было продемонстрировано, что индукция ТПП у крыс и лекарственного гепатита у людей сопряжена с мобилизацией данной защитной системы, а также с увеличением активности ферментов – поставщиков NADPH [22, 23]. Показано, что мыши, нокаутированные по гену цитоплазматической формы NADP-ИДГ, были более восприимчивы

к окислительному стрессу, воспалению и цитолизу гепатоцитов при введении липополисахарида [28]. Есть данные, что в условиях окислительного стресса активированный белок SIRT2 (sirtuin 2) деацетилирует молекулу Г6ФДГ в положении Lys-403, что приводит к возрастанию активности фермента и усилению генерации NADPH [29]. Как показали результаты нашей работы, воздействие ДГХ при ТПП способствовало изменению активности Г6ФДГ и NADP-ИДГ в направлении контрольных значений, в то время как введение карсила было менее эффективным. Так, у животных, получавших ДГХ при индукции ТПП, активность NADP-ИДГ в сыворотке крови и печени достигала показателей контрольной группы. После введения карсила на фоне ТПП активность NADP-ИДГ уменьшалась в 1,4 и 1,5 раза соответственно (рис. 5а). Применение в качестве протектора ДГХ способствовало также уменьшению в печени и сыворотке крови активности Г6ФДГ в 1,4 и 1,8 раза относительно значений 2-й группы. Введение карсила оказывало на активность этого фермента в печени аналогичный эффект, а в сыворотке крови данный показатель снижался несколько менее выражено (рис. 6а). Изменения удельной активности исследуемых ферментов имели схожую тенденцию (рис. 5б, 6б). Очевидно, наблюдаемые изменения активности Г6ФДГ и NADP-ИДГ при воздействии ДГХ на фоне патологии связаны с уменьшением потребности в NADPH антиоксидантной системой клеток печени. По-видимому, введение исследуемого протектора способствовало снижению интенсивности свободнорадикального окисления, и, как следствие, смягчению степени выраженности адаптивного компенсаторного ответа на стресс [30].

Таким образом, ДГХ в условиях развития ТПП проявлял гепатопротекторную и антиокислительную активность, что выражалось в снижении маркерных показателей цитолиза клеток печени и значений интенсивности свободнорадикального окисления, а также способствовал изменению в направлении контроля активности ферментов



**Рисунок 5.** Активность NADP-ИДГ, выраженная в Е/мл сыворотки крови и Е/г сырой массы ткани печени (а), а также удельная активность фермента в сыворотке крови и печени крыс (б) при развитии ТПП и введении 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина.



**Рисунок 6.** Активность Г6ФДГ, выраженная в Е/мл сыворотки крови и Е/г сырой массы ткани печени (а), а также удельная активность фермента в сыворотке крови и печени крыс (б) при развитии ТПП и введении 6-гидрокси-2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина.

окислительного метаболизма. По сравнению с карсилом тестируемое соединение в большинстве случаев оказывало более существенный эффект на анализируемые параметры.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воздействие ДГХ на животных с индуцированным ТПП способствовало изменению в направлении контроля показателей цитолиза гепатоцитов, а также параметров, характеризующих интенсивность свободнорадикальных процессов – БХЛ и концентрации ДК. Наблюдалось снижение степени мобилизации ферментов-поставщиков NADPH и восстановление активности АГ, что могло быть следствием проявления протектором антиокислительного эффекта. Результаты работы свидетельствуют о том, что тестируемое соединение оказывает более существенное позитивное воздействие на большинство исследуемых параметров по сравнению с препаратом сравнения – карсилом. Полученные данные подчеркивают целесообразность поиска новых гепатопротекторных соединений среди дигидрохинолиновых производных для создания терапевтических средств, применяемых при острых поражениях печени.

На основе полученных в ходе исследования результатов можно сделать следующие выводы: (1) введение ДГХ в условиях развития ТПП способствовало снижению маркерных показателей цитолиза клеток печени; (2) тестируемое соединение приводило к уменьшению интенсивности свободнорадикального окисления в тканях крыс с индуцированной патологией; (3) ДГХ оказывал регулирующее воздействие на активность ферментов окислительного метаболизма, участвующих в функционировании антиокислительной системы печени и поставке ацетил-СоА и NADPH для биосинтеза жирных кислот; (4) по сравнению с карсилом тестируемое соединение в большинстве случаев оказывало более существенный эффект на анализируемые параметры.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции были выполнены в соответствии с правилами гуманного обращения с лабораторными животными (Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010), санитарными нормами вивариев (ГОСТ 33216-2014), а также одобрены этическим комитетом по экспертизе биомедицинских исследований ВГУ (протокол № 42-01 от 10.01.2019).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Поликарпов А.В. и др. (2018) Заболеваемость всего населения России в 2017 году. Статистические материалы, часть 2, М., с. 142. [Polikarpov A.V. et al. (2018) Zabolevayemost vsego naseleniya Rossii v 2017 godu. Statisticheskiye materialy, chast 2, M., p. 142.]
2. Qi B., Zhang S., Guo D., Guo S., Jiang X., Zhu X. (2017) Mol. Med. Rep., **16**(3), 2814-2822.
3. Han K.H., Hashimoto N., Fukushima M. (2016) World J. Gastroenterol., **22**(1), 37-49.
4. Yang J.P., Shin J.H., Seo S.H., Kim S.G., Lee S.H., Shin E.H. (2018) Int. J. Mol. Sci., **19**(9), DOI: 10.3390/ijms19092563.
5. Sheweita S.A., El-Hosseiny L.S., Nashashibi M.A. (2016) PLoS One, **11**(11), e0165667.
6. Feher J., Bar-Pollak Z., Sreter L., Feher E., Tuncsev H. (1982) Br. J. Exp. Pathol., **63**(4), 394-400.
7. Bailey C.A., Srinivasan L.J., McGeachin R.B. (1996) Poult. Sci., **75**(9), 1109-1112.
8. Попова Т.Н., Шульгин К.К., Шихалиев Х.С., Крыльский Е.Д., Матасова Л.В., Медведева С.М., Попов С.С., Вережкин А.Н. (2019) Патент RU 2 677 883 C1, Бюл. изобрет. №3. [Popova T.N., Shulgin K.K., Shikhaliyev Kh.S., Krylskiy E.D., Matasova L.V., Medvedeva S.M., Popov S.S., Verezhkin A.N. (2019) Patent RU 2 677 883 C1, Byul. izobret. №3.]
9. Иванова В.В., Лигостаева Ю.В., Потеряева О.Н., Русских Г.С., Грек О.Р., Шарпов В.И., Геворгян М.М. (2013) Фундаментальные исследования, **3**(2), 277-279. [Ivanova V.V., Ligostayeva Yu.V., Poteryaeva O.N., Russkih G.S., Grek O.R., Sharapov V.I., Gevorgyan M.M. (2013) Fundamentalniye issledovaniya, **3**(2), 277-279.]

10. Ipsen D.H., Lykkesfeldt J., Tveden-Nyborg P. (2018) Cell Mol. Life Sci., **75**(18), 3313-3327.
11. Weber L.W., Boll M., Stampfl A. (2003) Crit. Rev. Toxicol., **33**(2), 105-136.
12. Матасова Л.В., Попова Т.Н. (2008) Биохимия, **73**(9), 1189-1198.
13. Koh H.J., Lee S.M., Son B.G., Lee S.H., Ryoo Z.Y., Chang K.T., Park J.W., Park D.C., Song B.J., Veech R.L., Song H., Huh T.L. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 39968-39974.
14. Domínguez-Perez M., Nuno-Lambarri N., Clavijo-Cornejo D. (2016) Oxid. Med. Cell Longev., **2016**, DOI: 10.1155/2016/7960386.
15. Quiroga P.L., Soria E.A., Valentich M.A., Eynard A.R. (2018) Nutr. Cancer, **14**, 1-8.
16. Valdez J.M., Johnstone A.F.M., Richards J.E., Schmid J.E., Royland J.E., Kodavanti P.R.S. (2018) Int. J. Mol. Sci., **20**(1), DOI: 10.3390/ijms20010011.
17. Меньшикова В.В. (1987) Лабораторные методы исследования в клинике (справочник), Медицина, М., 368 с. [Menshikova V.V. (1987) Laboratorniye metody issledovaniya v klinike (spravochnik), Meditsina, M., 368 p.]
18. Гланц С. (1999) Медико-биологическая статистика. Практика, М., 459 с. [Glantz S. (1999) Mediko-biologicheskaya statistika. Praktika, M., 459 p.]
19. Parmar K.S., Singh G.K., Gupta G.P., Pathak T., Nayak E. (2016) Int. J. Med. Sci. Public Health, **5**(9), 1783-1788.
20. Касаикина О.Т. (1983) Изв. АН СССР. Сер. Хим., **10**, 2214. [Kasaikina O.T. (1983) Izv. AN SSSR Ser. Khim., **10**, 2214.]
21. Zhu J., Carozzi V.A., Reed N., Mi R., Marmioli P., Cavaletti G., Hoke A. (2016) Int. J. Sci. Rep., **6**, 28861, DOI: 10.1038/srep28861.
22. Попова Т.Н., Матасова Л.В., Макеева А.В. (2007) Биомед. химия, **53**(2), 181-189. [Popova T.N., Matasova L.V., Makeeva A.V. (2007) Biomed. khimiya, **53**(2), 181-189.]
23. Popov S.S., Shulgin K.K., Popova T.N., Agarkov A.A., Pashkov A.N., Carvalho D.E. (2015) J. Biochem. Mol. Toxicol., **29**(10), 449-457.
24. Dutta S., Chakraborty A.K., Dey P., Kar P., Guha P., Sen S., Kumar A., Sen A., Chaudhuri T.K. (2018) PLoS One, **13**(4), DOI: 10.1371/journal.pone.0196411.
25. Венгеровский А.И., Хазанов В.А. (2007) Экспер. клин. фармакол., **70**(2), 51-55. [Vengerovskiy A.I., Khazanov V.A. (2007) Eksper. klin. farmakol., **70**(2), 51-55.]
26. El Bakkali M., Ismaili L., Tomassoli I., Nicod L., Pudlo M., Refouvet B. (2011) Int. J. Med. Chem., **2011**(592879), DOI: 10.1155/2011/592879.
27. Fernández-Bachiller M.I., Pérez C., González-Muñoz G.C., Conde S., López M.G., Villarroya M., García A.G., Rodríguez-Franco M.I. (2010) J. Med. Chem., **53**(13), 4927-4937.
28. Itsumi M., Inoue S., Elia A.J., Murakami K., Sasaki M., Lind E.F., Brenner D., Harris I.S., Chio I.I., Afzal S. et al. (2015) Cell Death Differ., **22**(11), 1837-1845.
29. Wang Y.P., Zhou L.S., Zhao Y.Z., Wang S.W., Chen L.L., Liu L.X., Ling Z.Q., Hu F., Sun Y.P., Zhang J.Y., Yang C., Yang Y., Xiong Y., Guan K.L., Ye D. (2014) EMBO J., **3**(12), 1304-1320.
30. Gobbo M.G., Costa C.F., Silva D.G., de Almeida E.A., Goes R.M. (2015) Oxid. Med. Cell Longev., **2015**, 614579, DOI: 10.1155/2015/614579.

Поступила в редакцию: 28. 01. 2019.  
После доработки: 10. 04. 2019.  
Принята к печати: 12. 04. 2019.

# EFFECT OF 6-HYDROXY-2,2,4-TRIMETHYL-1,2-DIHYDROQUINOLINE ON THE INTENSITY OF FREE RADICAL PROCESSES AND THE ACTIVITY OF OXIDATIVE METABOLISM ENZYMES UNDER TOXIC LIVER INJURY IN RATS

D.A. Brazhnikova<sup>1\*</sup>, T.N. Popova<sup>1</sup>, E.D. Kryl'skii<sup>1</sup>, K.K. Shulgin<sup>1</sup>, L.V. Matasova<sup>1</sup>, H.S. Shikhaliev<sup>1</sup>, S.S. Popov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University,  
1 University sq., Voronezh, 394018 Russia; \*e-mail: dasha.brazhnikova@yandex.ru  
<sup>2</sup>Burdenko Voronezh State Medical University, Voronezh, Russia

The effect of 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline on markers of hepatocytes cytolysis (aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and gamma-glutamyl transpeptidase), parameters reflecting the state of oxidative status (intensity of biochemical luminescence and the content of diene conjugates), and the activity of oxidative metabolism enzymes (aconitate hydratase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADP-isocitrate dehydrogenase) was studied in rats with CCl<sub>4</sub>-induced liver injury. The results obtained in the course of the work demonstrated the ability of the test compound to reduce the severity of oxidative stress and liver cells damage, as well as to change the activity of aconitate hydratase and NADP-generating enzymes in the direction of control values. 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline was more effective in normalizing CCl<sub>4</sub>-induced changes of the analyzed parameters that Carsil used as a reference compound. The tendency to normalize the state of oxidative status and enzyme activity of oxidative metabolism can attributed to hepatoprotective and antioxidant properties of the tested compound.

**Key words:** toxic liver injury; free radical oxidation; 6-hydroxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydroquinoline; aconitate hydratase; glucose-6-phosphate dehydrogenase; NADP-isocitrate dehydrogenase

Received: 28.01.2019, revised: 10.04.2019, accepted: 12.04.2019.