

УДК 615.244

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕПАТОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ПРОИЗВОДНЫХ УРАЦИЛА ПРИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОМ ДЕЙСТВИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНА НА КУЛЬТУРЕ ГЕПАТОЦИТОВ МН22А

Кудояров Э.Р.<sup>1</sup>, Каримов Д.Д.<sup>1</sup>, Кутлина Т.Г.<sup>1</sup>, Каримов Д.О.<sup>1</sup>, Мухаммадиева Г.Ф.<sup>1</sup>,  
Валова Я.В.<sup>1</sup>, Данилко К.В.<sup>2</sup>, Гимадиева А.Р.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа, Россия

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»

МЗ РФ, Уфа, Россия

<sup>3</sup>УФИЦ РАН, Уфа, Россия

*В статье представлены данные об эффективности производных урацила (5-этиламино-6-метилурацил, 5-диметиламино-6-метилурацил, 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-тетрагидропиримидин-5-ил N-фталилглицинат, 5-морфолинометил-6-метилурацил, 3,5-бис(пиперазинометил)-6-метилурацил) для защиты гепатоцитов мыши МН22а от цитотоксического действия тетрахлорметана. Для изучения выживаемости клеток использовали МТТ-тест. Среди соединений, исследованных в настоящем эксперименте, наибольшей эффективностью для выживания клеток печени в условиях затравки тетрахлорметаном обладали 5-этиламино-6-метилурацил и 5-диметиламино-6-метилурацил.*

**Ключевые слова:** урацил, МТТ-тест, гепатоцит, МН22а.

**Для цитирования:** Кудояров Э.Р., Каримов Д.Д., Кутлина Т.Г., Каримов Д.О., Мухаммадиева Г.Ф., Валова Я.В., Данилко К.В., Гимадиева А.Р. Исследование гепатопротекторных свойств производных урацила при цитотоксическом действии тетрахлорметана на культуре гепатоцитов МН22а. Медицина труда и экология человека. 2019; 2:63-68.

**DOI:** <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10023>

## RESEARCH OF THE HEPATOPROTECTIVE PROPERTIES OF URACIL DERIVATIVES IN THE PRESENCE OF CYTOTOXIC ACTION OF CARBON TETRACHLORIDE ON THE CUL- TURE OF HEPATOCYTES МН22А

Kudoyarov E.R.<sup>1</sup>, Karimov D.D.<sup>1</sup>, Kutlina T.G.<sup>1</sup>, Karimov D.O.<sup>1</sup>, Muhammadieva G.F.<sup>1</sup>,  
Valova Ya.V.<sup>1</sup>, Danilko K.V.<sup>2</sup>, Gimadieva A.R.<sup>3</sup>

1-Ufa Research Institute of Occupational Health and Human Ecology, Ufa, Russia

2 – FSBEI HE «Bashkir State Medical University» MZ RF, Ufa, Russia

3 – Ufa branch of RAS, Ufa, Russian Federation

*In the article are presented data on the efficiency of new uracil derivatives (5-ethylamino-6-methyluracil, 5-dimethylamino-6-methyluracil, 1,3,6-trimethyl-2,4-dioxo-tetrahydropyrimidine-5-yl N-phthalylglycinate, 5-morpholinomethyl-6-methyluracil, 3,5-bis(piperazinomethyl)-6-methyluracil) for the protection of mice hepatocytes МН22а from the cytotoxic action of carbon tetrachloride. MTT-test was used to study cell viability. Among the compounds investigated in the present experiment, the greatest efficiency for the viability of hepatocytes under conditions of priming with carbon tetrachloride had a 5-ethylamino-6-methyluracil and 5-dimethylamino-6-methyluracil.*

**Key words:** uracil, MTT-test, hepatocyte, МН22а.

**For quotation:** Kudoyarov E.R., Karimov D.D., Kutlina T.G., Karimov D.O., Muhammadiyeva G.F., Valova Ya.V., Danilko K.V., Gimadiyeva A.R. Research of the hepatoprotective properties of uracil derivatives in the presence of cytotoxic action of carbon tetrachloride on the culture of hepatocytes MH22a. *Occupational health and human ecology*. 2019;2:63-68.

**DOI:** <http://dx.doi.org/10.24411/2411-3794-2019-10023>

Тетрахлорметан (четырёххлористый углерод) входит в состав растворителей, применяемых при производстве масел, жиров и каучука. При поступлении тетрахлорметана (ТХМ) в организм млекопитающего в гепатоцитах генерируются активные формы кислорода и перекисного окисления липидов [1]. Одним из результатов интоксикации ТХМ является образование соединений (аддуктов) АФК с ДНК [1, 2], что приводит к ошибкам репликации и, как следствие, может привести к мутациям [1, 3].

Химические вещества, содержащие в своей структуре пиримидин, часто встречаются в природе и участвуют в биологических процессах (в основном урацил, тимин, цитозин). Заслуга в основополагающем изучении производных пиримидина и, особенно, метилурацила принадлежит Н.В. Лазареву [4]. Метилурацил ускоряет процессы клеточной регенерации, ускоряет заживление ран, стимулирует клеточные и тканевые факторы защиты, лейко- и эритропоэз [5]. Оксиметилурацил всесторонне был изучен В.А. Мышкиным.

На основе химической структуры урацила группой химиков БашГУ и УФИЦ РАН были разработаны и синтезированы химические соединения: 5-этиламино-6-метилурацил, 5-диметиламино-6-метилурацил, 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-тетрагидропиримидин-5-ил N-фталилглицинат, 5-морфолинометил-6-метилурацил, 3,5-бис(пиперазинометил)-6-метилурацил [4, 6]. Задачей нашего исследования было определить выраженность гепато-защитных свойств производных урацила *in vitro* на культуре гепатоцитов мыши МН-22а для последующей проверки их активности на грызунах.

### **Материал и методы.**

Исследование гепатозащитных свойств выполнено на клеточной линии МН-22а (мышь СЗНА, гепатома, монослой). Культура клеток была посеяна в стерильные 96-луночные планшеты для адгезионных клеточных культур (SPL Life Sciences, Республика Корея). Для затравки клеток были сформированы экспериментальные группы:

1. Контроль — клетки без обработки;
2. Клетки, затравленные 100 мМ ТХМ;
3. Клетки, затравленные испытуемым веществом в концентрации 400 мкМ;
4. Клетки, затравленные 100 мМ раствором ТХМ и обработанные испытуемым веществом в одной из 7 концентраций (12,5, 25, 50, 100, 200, 400 или 800 мкМ).

Все группы клеток инкубировали 48 часов после затравки ТХМ и добавления растворов соединений. Для растворения тетрахлорметана применяли диметилсульфоксид (ДМСО), разведенный в питательной среде для культивирования клеток до 1%. Для измерения метаболической активности и последующего расчета выживаемости инкубированных клеток с помощью МТТ-теста по оптической плотности культуральной среды руководствовались методикой СТП14.621.21.0008.12-2015 [7]. Оптическую плотность растворов измеряли на многофункциональном микропланшетном ридере Spark 20M (Tecan, Швейцария) при длинах волн света 530 и 620 нм. Для проверки статистической достоверности различий между группами по оптической плотности применяли критерий Краскела-Уоллиса. По каждой группе были рассчитаны среднее арифметическое, стандартное отклонение и стандартная ошибка среднего. Статистический анализ результатов выполнен в программе SPSS Statistics 21. Для оценки гепатозащитных свойств находили разность (P) между значениями выживаемости экспериментальной группы и группы клеток, затравленной 100 мМ раствором ТХМ. Экспе-

риментальная часть работы была выполнена на базе лаборатории клеточных культур Центральной научно-исследовательской лаборатории БГМУ.

### Результаты и обсуждение.

Влияние 5-этиламино- и 5-диметиламино-6-метилурацила было проверено на клетках, культивированных на одном микропланшете. Выживаемость в группе клеток, обработанных только 400 мкМ 5-этиламино-6-метилурацилом, составила  $93,57 \pm 1,85\%$ , что показывает низкую токсичность самого соединения. Выживаемость в группе клеток, затравленных 100 мМ ТХМ, составила в среднем  $36,46 \pm 2,67\%$ . Различия между всеми группами статистически значимые (критерий Крускала-Уоллиса  $N=25,13$ ;  $p=0,0028$ ). Средняя выживаемость клеток, затравленных ТХМ и обработанных 25 мкМ 5-этиламино-6-метилурацилом, была равна  $83,34 \pm 5,74\%$ . Выживаемость при упомянутой концентрации соединения явилась наивысшей среди затравленных групп и оказалась на 46,88% выше, чем в группе клеток, затравленных только 100 мМ ТХМ (рис. 1).

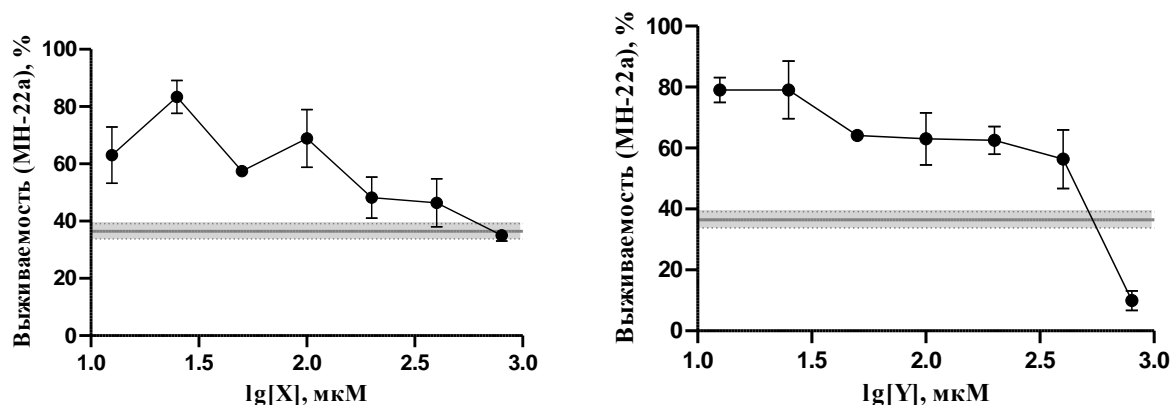


Рис. 1. Графики зависимости выживаемости от логарифма концентрации 5-этиламино-6-метилурацила (X) и 5-диметиламино-6-метилурацила (Y) при затравке тетрахлорметаном

Выживаемость в группе клеток, обработанных только 400 мкМ 5-диметиламино-6-метилурацилом, составила  $76,25 \pm 2,52\%$ , что указывает на токсичность соединения. Различия между группами являются статистически значимыми (критерий Крускала-Уоллиса  $N=23,25$ ;  $p=0,0057$ ). Средняя выживаемость клеток, затравленных ТХМ и обработанных 25 мкМ 5-диметиламино-6-метилурацилом, была равна  $79,07 \pm 9,46\%$ , что на 42,61% выше, чем в группе клеток, затравленных только 100 мМ ТХМ (рис. 1).

Выживаемость в группе клеток, обработанных только 400 мкМ N-фталилглицинатом 1,3,6-триметил-2,4-диоксотетрагидропиримидин-5-ила (соединение M), составила  $66,21 \pm 2,52\%$ , что указывает на токсичность соединения при высокой концентрации. Различия между группами являются статистически значимыми (критерий Крускала-Уоллиса  $N=24,94$ ;  $p=0,003$ ). Средняя выживаемость клеток, затравленных ТХМ и обработанных 12,5 мкМ раствором соединения M, была равна  $84,32 \pm 4,14\%$ , что на 13,2% выше, чем в группе клеток, затравленных только 100 мМ ТХМ ( $71,12 \pm 2,66\%$ ) (рис. 2). При остальных испытанных концентрациях растворы соединения M оказались неэффективными и токсичными в примененных условиях затравки.

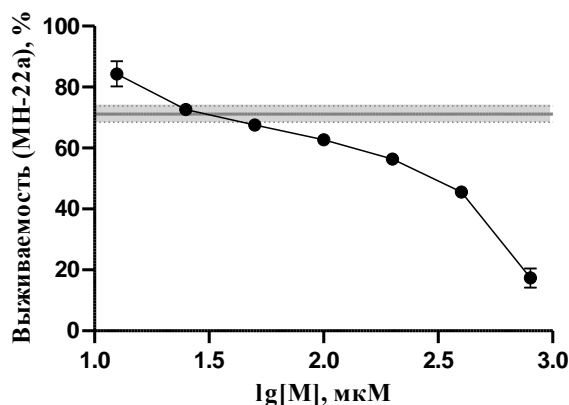


Рис. 2. График зависимости выживаемости от логарифма концентрации 1,3,6-триметил-2,4-диоксо-тетрагидропиримидин-5-ила N-фталилглицината (M) при затравке тетрахлорметаном

Выживаемость в группе клеток, обработанных только 400 мкМ 5-морфолинометил-6-метилурацилом (соединение N), составила  $90,81 \pm 1,73\%$ , что указывает на низкую токсичность соединения. Различия между группами не являются статистически значимыми (критерий Крускала-Уоллиса  $H=8,974$ ;  $p=0,255$ ). Средняя выживаемость клеток, затравленных ТХМ и обработанных 400 мкМ раствором соединения N ( $52,94 \pm 8,07\%$ ), статистически не отличается от выживаемости при отсутствии лечения препаратом ( $45,29 \pm 5,69\%$ ) (рис. 3).

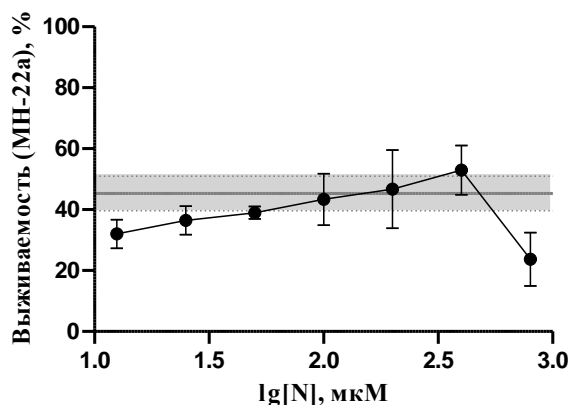


Рис. 3. График зависимости выживаемости от логарифма концентрации 5-морфолинометил-6-метилурацила (N) при затравке тетрахлорметаном

Соединение N в растворах всех испытанных концентраций неэффективно для защиты гепатоцитов мыши от токсического действия 100 мМ ТХМ.

Выживаемость в группе клеток, обработанных только 400 мкМ 3,5-бис(пиперазинометил)-6-метилурацилом (соединение Z), составила  $15,95 \pm 0,26\%$ , что указывает на высокую токсичность соединения. Различия между опытными группами являются статистически значимыми (критерий Крускала-Уоллиса  $H=25,852$ ;  $p=0,002$ ). Однако вещество также показало высокую токсичность (рис. 4) при концентрациях 200, 400 и 800 мкМ, кроме того, показало низкую эффективность для защиты гепатоцитов от тетрахлорметана.

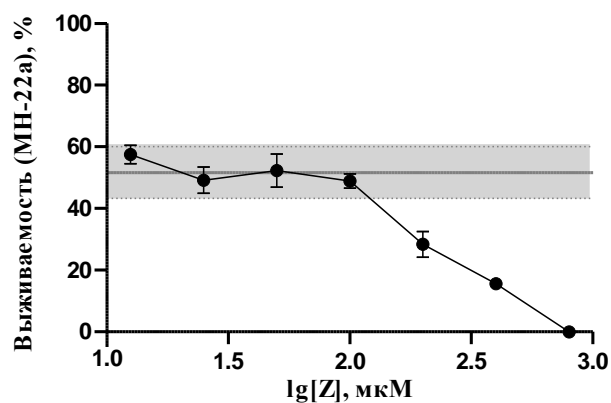


Рис. 4. График зависимости выживаемости от логарифма концентрации 3,5-бис(пиперазинометил)-6-метилурацила (Z) при затравке тетрахлорметаном. Выживаемость при затравке 100 мМ ТХМ составила 51,61±8,40%

### Заключение.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о низкой токсичности и наличии выраженных гепатозащитных свойств у 5-этиламино-6-метилурацила и 5-диметиламино-6-метилурацила, что дает возможность планирования дальнейшего исследования выбранных препаратов *in vivo* для защиты печени. 5-морфолинометил-6-метилурацил оказался нетоксичным, но и неэффективным в проведенном эксперименте, что исключает возможность его дальнейшего применения в исследованиях *in vivo*. Обнаруживаемые эффекты, возможно, объясняются выраженностью антиоксидантной активности у исследуемых соединений. Так, по результатам FRAP-теста в диапазоне концентраций 25–100 мкг/мл 5-морфолинометил-6-метилурацил отнесен к веществам со очень низкой восстанавливающей способностью, а 5-этиламино-6-метилурацил имеет высокую восстанавливающую способность, приближающуюся по значениям к свойствам аскорбиновой кислоты [6]. N-фталилглицинат 1,3,6-триметил-2,4-диоксотетрагидропиримидин-5-ила и 3,5-бис(пиперазинометил)-6-метилурацил проявили токсичность по отношению к гепатоцитам в исследованном диапазоне концентраций, что исключает на следующем этапе исследований необходимость проверки их эффективности на грызунах.

### Список литературы:

1. Мышкин В.А., Ибатуллина Р.Б., Бакиров А.Б. Поражение печени химическими веществами (функционально-метаболические нарушения, фармакологическая коррекция). Уфа: Гилем; 2007.
2. Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями. Усп. биол. хим. 2013; 53:245-96.
3. de Fouw J. Environmental Health Criteria 208, Carbon Tetrachloride [Internet]. Geneva: World Health Organization; 1999 [cited 2019 Mar 9]. 177 p. Available from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc208.htm>.
4. Гимадиева А.Р., Чернышенко Ю.Н., Абдрахманов И.Б., Мустафин А.Г. Синтез, модификации и биологическая активность урацилов. Уфа: Гилем; 2013.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т.2. М.: Новая волна; 2002.
6. Гимадиева А.Р., Хазимуллина Ю.З., Белая Е.А., Зимин Ю.С., Абдрахманов И.Б., Мустафин А.Г. Экспресс-оценка антиоксидантной активности производных урацила. Биомедицинская химия 2015; 61(6):765-9.

7. СТП-14.621.21.0008.12-2015. Методика определения цитотоксичности веществ МТТ-тестом на культуре нормальных клеток человека HEK-293. Утв. дир. ИФАВ, чл.-корр. РАН С.О. Бачуриным от 25.12.2015. – Черноголовка, Московская обл.; 2015.

**References:**

1. Myshkin V. A., Ibatullina R. B., Bakirov A. B. Liver damage by chemicals (functional and metabolic disorders, pharmacological correction). Ufa: Gilem; 2007.
2. Grivennikova V. G., Vinogradov A. D. Generation of reactive oxygen species by mitochondria. // Usp. biol. chem. 2013; 53:245-96.
3. de Fouw J. Environmental Health Criteria 208, Carbon Tetrachloride [Internet]. Geneva: World Health Organization; 1999 [cited 2019 Mar 9]. 177 p. Available from: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc208.htm>.
4. Gimadieva A. R., Chernyshenko Yu. N., Abdrakhmanov I. B., Mustafin A. G. Synthesis, modifications and biological activity of uracils. Ufa: Gilem; 2013.
5. Mashkovsky M. D. Medicines. Vol.2. Moscow: New wave; 2002.
6. Gimadieva A. R., Khazimullina Yu. Z., Belaya E. A., Zimin Yu. S., Abdrakhmanov I. B., Mustafin A. G. Rapid assessment of antioxidant activity of uracil derivatives. Biomedical chemistry 2015; 61(6):765-9.
7. СТП-14.621.21.0008.12-2015. Methods of determining the cytotoxicity of MTT-test substances on the culture of normal human cells HEK-293. Approved. dir. IPAC, member.-cor. RAS S. O. Bachurin from 25.12.2015. - Chernogolovka, Moscow region; 2015.

Поступила/Received: 12.02.2019

Принята в печать/Accepted: 29.04.2019