

Бензобарбитал и фторбензобарбитал — индукторы фенобарбиталового типа монооксигеназной системы печени

Новожеева Т.П.¹, Смагина М.И.², Черевко Н.А.², Фатеева С.Н.²

Benzobarbital and fluorbenzobarbital — hepatic monooxygenase system phenobarbital-like inducers

Novozhneyeva T.P., Smagina M.I., Cherevko N.A., Fateyeva S.N.

¹ НИИ психического здоровья СО РАМН, г. Томск

² Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Новожеева Т.П., Смагина М.И., Черевко Н.А. и др.

Бензобарбитал и фторбензобарбитал как индукторы монооксигеназной системы повышают в печени суммарное содержание цитохрома Р-450 и количество его изоферментов 2В6, 2С9, 2Е1, ускоряют окисление амидопирина, этоксирезорифина, пентоксирезорифина, анилина, андростендиона. Ферментиндуцирующая активность бензобарбитала и фторбензобарбитала в значительной степени обусловлена действием их основного метаболита — фенобарбитала. В отличие от фенобарбитала бензобарбитал и фторбензобарбитал индуцируют изофермент 3А4, ответственный за 16β-ОН-гидроксилирование андростендиона. В связи с этим нельзя исключить индуцирующую активность нативных молекул бензобарбитала и фторбензобарбитала по РСN-типу.

Ключевые слова: бензобарбитал, фторбензобарбитал, фенобарбитал, индукция, изоферменты цитохрома Р-450.

Benzobarbital and fluorbenzobarbital as monooxygenase system inducers increase the hepatic cytochrome P-450 level and the content of its isoenzymes 2B6, 2C9, 2E1, accelerate aminopyrine, 7-ethoxyresorufine, 7-pentoxyresorufine, aniline and androstendione oxidation. Activity of benzobarbital and fluorbenzobarbital as inducers is to a large degree due to the action of their major metabolite — phenobarbital. Benzobarbital and fluorbenzobarbital unlike phenobarbital induce isoenzyme 3A4, responsible for androstendione 16β-OH-hydroxylation. PCN-type induction activity possesses also native molecules of benzobarbital and fluorbenzobarbital.

Key words: benzobarbital, fluorbenzobarbital, phenobarbital, induction, isozymes cytochrome P-450.

УДК 547.854.5:577.1:612.35

Введение

Бензобарбитал (бензонал; 5-этил-5-фенил-N-бензоилбарбитуровая кислота) и фторбензобарбитал (галонал; 5-этил-5-фенил-1-о-фтор-N-бензоилбарбитуровая кислота) — оригинальные противосудорожные средства, изученные на кафедре фармакологии Томского медицинского института (ныне Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск) (СибГМУ) в 1960—1990-х гг. под руководством профессоров Е.М. Думеновой и А.С. Саратикова [2]. Эти бензоильные производные барбитуровой кислоты оказывают также противоаритмическое и иммуномодулирующее действие, являются индукторами зависимой от цитохрома Р-450 монооксигеназной системы (МОС) детоксикации ксенобиотиков в печени [5, 6]. Фермент-

индуцирующий эффект бензобарбитала и фторбензобарбитала проявляется как у интактных животных, так и при экспериментальной гипербилирубинемии, моделях токсической патологии, ишемии и резекции печени [6]. По силе и продолжительности действия бензобарбитал и фторбензобарбитал не уступают референтному индуктору МОС фенобарбиталу [7, 9]. Вместе с тем окончательно не установлен тип ферментативной активации МОС, вызываемой новыми индукторами. Известно, что они аналогично фенобарбиталу связываются с цитохромом Р-450 по I типу [5].

Цель исследования — с помощью методов биохимии и иммунохимии определить тип и возможные механизмы индукции МОС печени крыс под влиянием бензобарбитала и фторбензобарбитала.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 65 белых аутбредных крысах-самцах массой 140—160 г в соответствии с рекомендациями «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств» [4]. Животных содержали в виварии Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск) при естественном световом режиме на стандартной диете со свободным доступом к воде и пище. Бензобарбитал и фторбензобарбитал в дозе 70 мг/кг массы тела, фенобарбитал в дозе 50 мг/кг массы тела вводили интактным крысам в желудок 1 раз в сутки в течение 3 сут в виде суспензии на 1%-й крахмальной слизи. В этих дозах изученные барбитураты в максимальной степени повышают содержание цитохрома P-450 в печени [7, 9]. Животные контрольной группы получали эквивалентное количество крахмальной слизи.

Крыс декапитировали под эфирным наркозом через 48 ч после последнего введения препаратов. По ранее описанным методикам [8, 9] в микросомальной фракции печени определяли содержание белка, цитохромов P-450, b_5 , метаболитов андростендиона, активность НАДФ·Н-цитохром P-450-редуктазы, скорость N-деметилирования амидопирина, *n*-гидроксилирования анилина, O-деалкилирования 7-этоксирезорурфина и 7-пентоксирезорурфина. Из микросом печени выделяли молекулярные изоферменты цитохрома P-450, ин-

дуцированного фенобарбиталом (изоферменты 2B) и 3-метилхолантеном (изоферменты 1A).

Антитела против изоферментов цитохрома P-450 получали иммунизацией препаратами цитохромов взрослых беспородных кроликов. Иммуноглобулины из иммунных сывороток, изолированные фракционированием сульфатом аммония, использовали для иммунохимического анализа микросом. Проводили реакцию двойной иммунодиффузии. Содержание изоферментов цитохрома P-450 2B1 и 2B6 определяли методом «ракетного» иммуноэлектрофореза. Белки микросомальной фракции разделяли с помощью электрофореза с додецилсульфатом натрия в полиакриламидном геле [8].

Статистическую обработку результатов проводили методом парных сравнений с использованием непараметрического критерия Вилкоксона—Манна—Уитни при вероятности ошибочного вывода, не превышающей 5% ($p \leq 0,05$) [11]. Данные в таблице представлены в виде $M \pm m$, где M — среднее арифметическое значение, m — ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Бензобарбитал, фторбензобарбитал и фенобарбитал увеличивали количество микросомального белка, суммарное содержание изоферментов цитохрома P-450 и активность НАДФ·Н-зависимой цитохром P-450-редуктазы, не изменяя содержания цитохрома b_5 (таблица).

Влияние бензобарбитала, фторбензобарбитала и фенобарбитала на систему монооксигеназ печени крыс ($M \pm m$)

Показатель	Интактные животные	Бензобарбитал	Фторбензобарбитал	Фенобарбитал
Белок микросом, мг/орган	56,20 ± 2,5	73,70 ± 4,70*	78,20 ± 5,34*	75,60 ± 7,35*
Содержание цитохромов нмоль/мг белка:				
P-450	0,53 ± 0,07	1,35 ± 0,07*	1,32 ± 0,15*	1,21 ± 0,08*
2B	0,02 ± 0,002	0,60 ± 0,06*	0,65 ± 0,06*	0,56 ± 0,07*
b_5	0,44 ± 0,01	0,55 ± 0,03	0,54 ± 0,04	0,48 ± 0,04
Цитохром P-450-редуктаза, нмоль/мг белка · 1 мин	153,00 ± 13,00	342,00 ± 40,00*	350,00 ± 38,00*	321,00 ± 25,00*
Активность монооксигеназ, нмоль продукта на 1 мг белка в 1 мин:				
N-деметилаза амидопирина	1,44 ± 0,15	5,29 ± 0,33*	5,36 ± 0,28*	4,78 ± 0,37*
<i>n</i> -гидроксилаза анилина	0,54 ± 0,01	1,11 ± 0,22*	1,12 ± 0,15*	1,12 ± 0,07*
O-деэтилаза 7-оксирезорурфина	0,07 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02
O-деэтилаза 7-пентоксирезорурфина	0,07 ± 0,01	0,83 ± 0,05*	1,24 ± 0,09*	1,20 ± 0,02*
Андростендионгидроксилаза:				
7 α -ОН	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,06	0,14 ± 0,05	0,11 ± 0,01
16 α -ОН	1,96 ± 0,13	2,69 ± 0,67	1,43 ± 0,42	0,87 ± 0,28*
6 β -ОН	1,07 ± 0,03	1,96 ± 0,43*	2,22 ± 0,19*	1,36 ± 0,36
16 β -ОН	0,82 ± 0,05	3,33 ± 0,71*	4,50 ± 0,90*	3,11 ± 0,32*

Примечание. * — $p < 0,05$ по сравнению с интактными животными. Приведены средние данные 10 определений.

Микросомы, выделенные из печени крыс, получавших индукторы, образовывали линию преципитации с антителами к изоферментам группы 2В и не взаимодействовали с антителами к изоферментам группы 1А. Следовательно, в микросомах, индуцированных бензобарбиталом и фторбензобарбиталом, образуются формы цитохрома Р-450, иммунологически идентичные индуцируемым фенобарбиталом изоферментам 2В1, 2В2 и 2В6. В микросомах отсутствуют индуцируемые метилхолантроном изоферменты 1А1 и 1А2.

При определении содержания в печени цитохрома Р-450, иммунологически идентичного индуцируемым фенобарбиталом формам, учитывали, что изоферменту 2В6 иммунологически идентичен изофермент 2В2. Оба изофермента имеют близкую молекулярную массу, высокую степень гомологии в первичной структуре и различаются лишь субстратной специфичностью и каталитической активностью, поэтому идентифицировали суммарное количество цитохромов 2В2 и 2В6. В микросомах печени крыс, получавших бензобарбитал, фторбензобарбитал и фенобарбитал, абсолютное и относительное содержание изоферментов 2В оказалось сходным, при этом индуцированные фенобарбиталом формы составляли около 50% от суммарного содержания цитохрома Р-450, определенного по количеству комплекса с СО (см. таблицу). Молекулярная масса изоферментов 2В составляла 52 кДа, что указывает на фенобарбиталовый тип индукции [1, 10].

Все барбитураты существенно повышали активность ферментов окислительного метаболизма — N-деметилазы амидопирин (субстрат 1-го типа), ассоциированной с изоферментом 2С9, и *n*-гидроксилазы анилина (субстрат 2-го типа), ассоциированной с изоферментом 2Е1 (см. таблицу). Метаболизм указанных субстратов не является строго специфичным для этих изоферментов цитохрома и характеризует ускорение индуктором фенобарбиталового типа метаболизма широкого класса субстратов [3, 6, 12]. Для оценки субстратной специфичности индуцированных бензобарбиталом и фторбензобарбиталом изоферментов цитохрома Р-450 были использованы субстраты, метаболизм которых строго связан с определенными изоферментами. 7-Этоксирезорурфин метаболизируется только О-деэтилазой этоксирезорурфина и является субстратом изофермента 1А2, индуцируемого 3-метилхолантроном [13, 14]. В данных экспериментах под влиянием всех трех барбитуратов каталитическая

активность изофермента 1А2 не изменялась, что подтверждает данные, полученные при иммунохимическом анализе. О-деалкилирование 7-пентоксирезорурфина — субстрата, специфичного для изофермента 2В6, ускорилось, что согласуется с данными «ракетного» иммунофореза.

Метаболизм еще одного модельного субстрата монооксигеназ — андростендиона позволяет оценить активность сразу четырех изоферментов цитохрома Р-450 [1, 8, 15]. Бензобарбитал и фторбензобарбитал стимулировали катализируемое изоферментом 2В6 гидроксирование андростендиона в положении 16β-ОН и не влияли на гидроксирование в положениях 7α-ОН и 16α-ОН. В отличие от фенобарбитала бензобарбитал и фторбензобарбитал стимулировали окисление андростендиона в позиции 6β-ОН при участии индуцированного изофермента 3А4 (тип индукции монооксигеназ PCN) [7, 9, 12, 13]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что бензобарбитал и фторбензобарбитал по влиянию на МОС печени можно отнести к индукторам фенобарбиталового типа.

Таким образом, экспериментально доказано индуцирующее влияние бензоильных производных барбитуровой кислоты бензобарбитала и фторбензобарбитала на МОС печени по фенобарбиталовому типу. В тонком кишечнике они подвергаются щелочному гидролизу с образованием фенобарбитала и бензойной кислоты, в крови присутствуют только в виде основного метаболита — фенобарбитала [7, 9]. Логично предположить, что ферментиндуцирующая активность бензобарбитала и фторбензобарбитала обусловлена действием фенобарбитала. С этим предположением согласуются полученные данные о сходном влиянии всех препаратов на уровень цитохрома Р-450 и изоферментов 2В6, а также на скорость метаболизма модельных субстратов (см. таблицу). Нельзя исключить также индуцирующую активность нативных молекул бензобарбитала и фторбензобарбитала, связывающихся с цитохромом Р-450 по I типу, так как при индукции фенобарбиталом значительно возрастает их сродство к цитохрому. В этих экспериментах бензобарбитал и фторбензобарбитал добавляли к суспензии микросом непосредственно перед измерением оптической плотности, поэтому метаболизм исключался [8]. При парентеральном введении бензобарбитала и фторбензобарбитала в эквимолярных дозах развивалась более выраженная индукция МОС печени, чем при инъекции фенобарбитала [5].

Заключение

В экспериментах на крысах доказано индуцирующее влияние оригинальных барбитуратов бензобарбитала и фторбензобарбитала на МОС печени по фенобарбиталовому типу. Эти вещества повышали содержание в печени цитохрома P-450 и его изофермента 2B6, ускоряли метаболизм модельных субстратов. Фермент-индуцирующая активность бензобарбитала и фторбензобарбитала обусловлена как действием их основного метаболита — фенобарбитала, так и нативных молекул.

Литература

1. Арчаков А.И., Алисица А.В., Петушкова Н.А. и др. Цитохромы P-450, лекарственная болезнь и персонифицированная медицина // Клинич. медицина. 2008. Т. 86, № 2. С. 4—8.
2. Венгеровский А.И. Первая кафедра фармакологии Сибири // Эксперим. и клинич. фармакология. 2008. Т. 71, № 2. С. 60—64.
3. Кукес В., Сычев Д., Ших Е. Изучение биотрансформации лекарственных средств — путь к повышению эффективности и безопасности фармакотерапии // Врач. 2007. № 1. С. 68—75.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических средств / под ред. Р.У. Хабриева М.: Медицина, 2005. 832 с.
5. Саратиков А.С., Новожеева Т.П. Антikonвульсанты и монооксигеназная система // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 1991. Т. 91, № 6. С. 104—108.
6. Саратиков А.С., Новожеева Т.П. Индукторы монооксигеназной системы печени и перспективы их клинического использования // Эксперим. и клинич. фармакология. 1993. Т. 56, № 3. С. 69—71.
7. Саратиков А.С., Новожеева Т.П., Ахмеджанов Р.Р. Галонал — индуктор монооксигеназной системы фенобарбиталового типа // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2002. Т. 134, № 9. С. 308—310.
8. Саратиков А.С., Новожеева Т.П., Бакибаев А.А., Ахмеджанов Р.Р. Индукторы фенобарбиталового типа // Хим.-фарм. журн. 1995. Т. 29, № 3. С. 3—13.
9. Саратиков А.С., Новожеева Т.П., Гришанова А.Ю. и др. Бензонал — индуктор монооксигеназной системы фенобарбиталового типа // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1991. Т. 111, № 2. С. 163—165.
10. Филимонова А.А., Зиганшин А.У., Зиганшина Л.Е. Особенности метаболизма разных лекарственных средств с участием изоферментов цитохрома P-450 // Эксперим. и клинич. фармакология. 2007. Т. 70, № 3. С. 69—77.
11. Хафизьянова Р.Х., Бурыкин И.М., Алеева Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной фармакологии. Казань: Медицина, 2006. 374 с.
12. Danielson P. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and metabolism in humans // Curr. Drug Metab. 2002. V. 3, № 6. P. 561—597.
13. Nelson D. The cytochrome P450 // Human Genom. 2009. V. 4. № 1. P. 59—65.
14. Yoshinari K., Sueyoshi T., Moore R., Negishi M. Nuclear receptor CAR as a regulatory factor induction of CYP2B1 gene by phenobarbital in rat livers // Mol. Pharmacol. 2001. V. 59, № 2. P. 278—284.
15. Zelko I., Negishi M. Phenobarbital-elicited activation of nuclear receptor CAR in induction of cytochrome P-450 genes // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. V. 277, № 1. P. 1—6.

Поступила в редакцию 30.04.2011 г.

Утверждена к печати 01.06.2011 г.

Сведения об авторах

Т.П. Новожеева — д-р биол. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории нейробиологии НИИ психического здоровья СО РАМН (г. Томск).

М.И. Смагина — канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры фармакологии СибГМУ (г. Томск).

Н.А. Черевко — канд. мед. наук, доцент кафедры иммунологии и аллергологии СибГМУ (г. Томск).

С.Н. Фатеева — канд. мед. наук, доцент кафедры госпитальной терапии с курсом спортивной медицины и физической реабилитации СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Новожеева Татьяна Петровна, e-mail: rgtom@mail.tomsknet.ru