БІОЛОГІЯ

УДК 591.112:547.831.1

БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ S-ЗАМІЩЕНИХ 2-МЕТИЛ-4-МЕРКАПТО-8-МЕТОКСИХІНОЛІНУ

В. І. Генчева, Л. О. Омельянчик, О. А. Бражко, М. П. Завгородній
Запорізький національний університет, м. Запоріжжя

Вивчено вплив похідних хіноліна на показники вуглеводнього, енергетичного обміну, на рівень креатинфосфокінази. Встановлено, що на нейропротекторну активність вивчених речовин впливає природа меркаптокарбонової кислоти в 4 положенні хінолінового цикла.

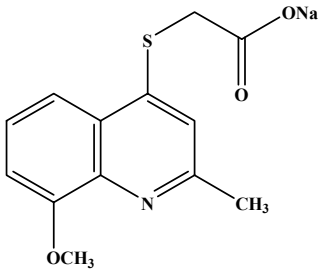
Ключові слова: S-заміщені 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну, вуглеводний, енергетичний обмін, нейропротекторна активність.

Вступ. На сьогодні, лікування мозкових інсультів потребує сучасних засобів нейропротекції. Відомі нейропротектори мають ряд побічних ефектів при тривалому застосуванні, у зв'язку з відсутністю вірогідного терапевтичного ефекту, їх неможливо застосувати в клініці в гострий період гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) [1,2]. Відомо, що гетероциклічна система хіноліну є основою багатьох синтетичних і природних лікарських засобів, тому актуальним і перспективним є пошук нових ефективних нейропротекторів серед S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну.

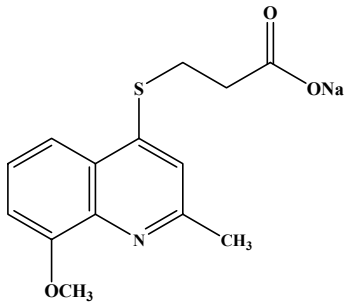
Метою даної роботи є дослідження біологічної, а саме, нейропротекторної активності S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну та встановлення залежності «біологічна дія − хімічна структура».

Матеріали та методи. Були досліджені похідні хіноліну (сполуки 1, 2), які синтезовані за методикою [3].

За допомогою віртуального скринінгу, який здійснювали на основі комп'ютерної програми PASS, були відібрані сполуки 1 і 2, для яких прогнозується вірогідність наявності (Ра) нейропротекторної активності.



сполука 1



сполука 2

Гостру токсичність визначали в дослідах на білих безпородних мишах масою тіла 18 – 25 г за методом Прозоровського [4].

Стан вуглеводно-енергетичного обміну визначали за рівнем АТФ, лактату, пірувату, малату. Для визначення їх рівня використовували уніфіковані методи [5,6]. Аденілові нуклеотиди визначали методом тонкошарової хроматографії [5]. Рівень лактату, малату (мкмоль/г/тканини) визначали за методом Хохорста [5]. Вміст пірувату (мкмоль/г тканини) визначали за методом Цоха-Ломпрехта [5].

Для оцінки нейропротекторної дії досліджуваних сполук була використана модель неповної глобальної ішемії головного мозку, яка найбільш адекватна клінічним проявам ішемічного інсульту [7]. Цю модель відтворили шляхом двосторонньої перев'язки загальних сонних артерій білих щурів лінії Вістар обох статей, масою 220 – 260 г, яких утримували у віварію при вільному доступі до їжі і води, при природній зміні дня і ночі. Щури одержані з розплідника Інституту фармакології і токсикології АМН України. Усі експериментальні процедури та оперативні втручання здійснювали відповідно до «Положення про використання тварин в біомедичних дослідженнях» [8].

Дослідження проведені на 5 групах тварин: перша група – інтактні тварини; друга-п'ята групи – тварини з двосторонньою перев'язкою загальних сонних артерій; друга група – оперовані тварини (контроль). Тваринам третьої − четвертої груп вводили відповідно досліджувані сполуки: натрієву сіль (8-метокси-2-метилхінолін-4-ілтіо)оцтової кислоти (сполука 1), натрієву сіль (8-метокси-2-метилхінолін-4-ілтіо) пропанової кислоти (сполука 2). Тваринам з п'ятої групи вводили еталон порівняння – пірацетам (рис. 1).

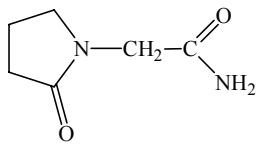


Рис. 1. Пірацетам

Сполуки 1 та 2 вводили один раз на добу протягом всього експерименту внутрішньочеревно в дозі 50 мг/кг маси; тваринам п'ятої групи вводили еталон порівняння – 2-оксо-1-піролідинілацетамід (пірацетам) внутрішньочеревно у дозі 250 мг/кг маси за тією ж самою схемою.

 © Генчева В. І., Омельянчик Л. О., Бражко О. А., Завгородній М. П.

Критерієм ішемічного ушкодження тканин були показники гіперферментомії ізоферменту креатинфосфокінази (ВВ-КФК, К.Ф. 2.7.3.2). Активність ВВ-КФК (мкм/л/година) визначали після поділення на сефадексі ДЕАЕ-А-50, використовуючи оптичний тест Варбурга [5]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили, застосовуючи t-критерій Стьюдента [9].

Результати та обговорення. Синтез натрієвих солей (2-метил-8-метоксихінолін-4-ілтіо) карбонових кислот проводили наступним чином: до розчину 0,01 мол відповідної (2-метил-8-метоксихінолін-4-ілтіо)карбонової кислоти в 30 мл спирту додавали 0,01 мол розчин натрій гідроксиду, суміш нагрівали на водяному нагрівачі 5-7 хвилин, розчинник відганяли, додавали 100 мл ацетону. Осад, що утворився, збирали, промивали ефіром, сушили (перекристалізовували з метанолу).

Будову синтезованих сполук підтвердили ІЧ-спектрами, хромато-мас-спектрами. Індивідуальність – ПМР-спектрами, чистоту − методом тонкошарової хроматографії у різних системах розчинників. Тонкошарову хроматографію провели на пластинках “Silufol UV-254” у різних системах розчинників. Проявлення хроматограм здійснено за допомогою УФ-променів або парами йоду. Визначення температури плавлення провели відповідно до вимог ДФ XI [10]. Фізико-хімічні властивості отриманих сполук представлені в табл. 1.

Таблиця 1

Фізико-хімічні властивості натрієвих солей (2-метил-8-метоксихінолін-4-ілтіо)карбонових кислот

№ сполук	Брутто-формула	Т пл., ^{0}C	Вихід, %	Системи розчинників	
1	2	3	4	5*	6**
1	$C_{13}H_{12}NO_3SNa$	252-4	93	36	55
2	$C_{14}H_{14}NO_3SNa$	252-4	83	20	57

Примітки:

* – система: хлороформ : метанол (4:1)

** – система: оцтова кислота : вода (1:1)

Для вивчення нейропротекторної активності синтезованих сполук, які моделюються на експериментальних тваринах, виникла необхідність дослідити їхню гостру токсичність − середня летальна доза − $ЛД_{50}$ (мг/кг). $ЛД_{50}$ вивчених сполук знаходиться в межах від 898±71 (сполука 2) до 1131±89мг/кг (сполука 1), що дозволяє їх віднести до мало та нетоксичних сполук за класифікацією Сидорова.

Біохімічні дослідження показали, що двостороння перев’язка загальної сонної артерії призводить до типових ішемічних порушень: дефіциту макроергічних фосфатів, дискоординації в циклі Кребса, активації анаеробного гліколізу, розвитку оксидативного стресу.

При курсовому призначенні S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну в гострому періоді ішемії головного мозку виявлено виражений їх вплив на окремі ланки вуглеводного обміну, активізуючи при цьому як анаеробні так і аеробні шляхи утворення енергії (табл. 2, 3).

Аналізуючи показники енергетичного обміну у клітинах мозку щурів спостерігали, що введення сполук приводило до збільшення синтезу АТФ за рахунок активації аеробного шляху окиснення (табл. 2). Порушення процесів окиснення вуглеводів визначає зниження макроергічних фосфатів (АТФ) на 53,7% у тварин з гострим порушенням мозкового кровообігу. Введення досліджуємих сполук підвищує рівень АТФ, причому сполука 2 конкурує за силою ефекту з препаратом порівняння – пірацетамом.

При введенні сполуки 1, яка має в своїй структурі залишок карбонової кислоти, спостерігається підвищення рівня АТФ на 23,6% порівняно з контролем. Збільшення ланцюга на CH_2-групу в карбоновому ланцюзі (сполука 2), збільшує вміст АТФ на 44,0%, що наближає цей показник до рівня інтактної групи тварин, перевищує при цьому дію еталона порівняння – пірацетаму.

Таблиця 2

Вплив S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну на вміст АТФ в головному мозку в сироватці крові тварин після гострого порушення мозкового кровообігу

Група тварин	АТФ мкмоль/г тканини	% змін
Інтактні тварини	2,01±0,02	–
Тварини з ГПМК	0,93±0,01	53,7
Тварини з ГПМК + 1[1]	1,15±0,02	23,6
Тварини з ГПМК + 2	1,34±0,02*	44,0
Тварини з ГПМК + пірацетам	1,33±0,04*	43,0

Примітки:

* − $P<0,05$ відносно контролю;

[1] – № сполуки.

На четверту добу експерименту після двосторонньої перев’язки сонної артерії має місце активація анаеробного гліколізу, яка проявляється гіперпродукцією лактату (на 284%) відносно інтактної групи тварин (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну на показники вуглеводного обміну в головному мозку після гострого порушення мозкового кровообігу

Група тварин	Лактат, мкмоль/г тканини	% змін	Піруват, мкмоль/г тканини	% змін	Малат, мкмоль/г тканини	% змін
Інтактні тварини	2,50±0,03	–	0,48±0,05	–	0,28±0,03	–
Тварини з ГПМК	9,60±0,05	284,0	0,18±0,014	62,5	0,10±0,04	64,3
Тварини з ГПМК + 1[1]	5,70±0,001*	40,6	0,26±0,02	44,4	0,21±0,01*	110,0
Тварини з ГПМК + 2	5,40±0,002*	43,7	0,34±0,02*	88,8	0,24±0,02*	140,0
Тварини з ГПМК + пірацетам	14,80±0,02*	54,1	0,30±0,04*	66,6	0,18±0,02*	80,0

Відбувається різке пригнічення окислювального метаболізму глюкози, про що свідчить зниження концентрації пірувату на 62,5% у контролі (ГПМК). Паралельно спостерігається гальмування реакцій у циклі Кребса, про що свідчить зниження рівня малату на 64,3% у контрольній групі тварин.

Сполуки, що досліджувались, по-різному впливали на рівень лактату. При дії сполуки 1 вміст лактату зменшився на 40,6% відносно контролю ($P<0,05$). Збільшення ланцюга на CH_2-групу в залишку карбонової кислоти (сполука 2) впливає на достовірне зменшення вмісту лактату на 43,7% ($P<0,05$). Всі досліджені сполуки перевищують дію еталона – пірацетаму.

Введення S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну після гострого порушення мозкового кровообігу достовірно підвищувався рівень пірувату в головному мозку відносно контролю (див. табл. 3). Введення натрієвої солі 3-(8-метокси-2-метилхінолін-4-ілтіо)пропанової кислоти (сполука 2) перевищує дію еталона – пірацетам на 22,2%.

Рівень малату після гострого порушення мозкового кровообігу зменшився на 64,3%. Всі сполуки впливали на підвищення показників рівня малату. Наявність залишку оцтової кислоти (сполука 1) впливає на достовірне збільшення рівня малату (на 110 %) відносно контролю. Збільшення карбонового ланцюга на CH_2-групу (сполука 2) призводить до зростання вмісту малату на 140% ($P<0,05$), що на 60% перевищує показник препарату порівняння − пірацетам.

В енерготропній дії пірацетаму відмічалася активація анаеробних реакцій і підсилення лактоацидозу. Важливу роль в енергозабезпеченні клітин грає окиснення НАДН в лактатдегідрогеназній реакції в цитозолі, яку можуть активувати тіоли, що входять до складу молекул досліджуваних сполук. Позитивно впливаючи на утилізацію відновлених форм піридиннуклеотидів, похідні хіноліну здатні гальмувати утворення активних форм кисню (АФК) енергетичними системами.

Встановлено, що S-заміщені 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну впливають на окислювальну модифікацію білка (ОМБ), внаслідок чого утворюються альдегідфенілгідразон (АФГ) і карбоксилфенілгідразон (КФГ) продукти окислювальної модифікації білка (табл. 4). Зміни метаболізму мозкової тканини призводять до активації шляхів утворення АФК й подальшої активації вільнорадикального окиснення.

Після гострого порушення мозкового кровообігу у контрольній групі тварин спостерігається збільшення показників АФГ і КФГ (на 184,3% та 250,0% відповідно). При введенні сполук 1, 2 спостерігалось наближення показників альдегідфенілгідразону і карбоксилфенілгідразону до рівня інтактних тварин.

Таблиця 4

Вплив S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну на окислювальну модифікацію білка в головному мозку тварин після гострого порушення мозкового кровообігу

Група тварин	Продукти ОМБ, у.о./г білка			
	АФГ (270 нм)	% змін	КФГ (363 нм)	% змін
Інтактні тварини	6,4+0,33	–	9,0±0,31	–
Тварини з ГПМК	18,2±0,13	184,3	31,5±0,20	250,0
Тварини з ГПМК + 1[1]	15,0±0,21	17,6	18,6±0,12*	41,0
Тварини з ГПМК + 2	13,0±0,10*	28,6	15,0±0,11*	52,4
Тварини з ГПМК + пірацетам	15,0±0,10	17,6	18,2±0,20*	42,3

Пошкодження структурної цілісності клітинних мембран супроводжувалося збільшенням активності ВВ-ізоформи КФК у сироватці крові на 250% (рис. 2).

При курсовому призначенні S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну спостерігалась зменшення рівня ВВ-ізоформи креатинфосфокінази на 28,5-45,0%, наближаючи до рівня інтактних тварин, що свідчить про нейропротекторну активність досліджених сполук (рис. 2).

Наявність залишку оцтової кислоти в 4-му положенні хінолінового циклу (сполука 1) впливає на достовірне зменшення рівня ВВ-КФК (на 28,5%) відносно контролю ($P<0,05$). Збільшення ланцюга на CH_2-групу в залишку карбонової кислоти (сполука 2) призводить до значного зменшення показника ВВ-КФК (на 45,0%).

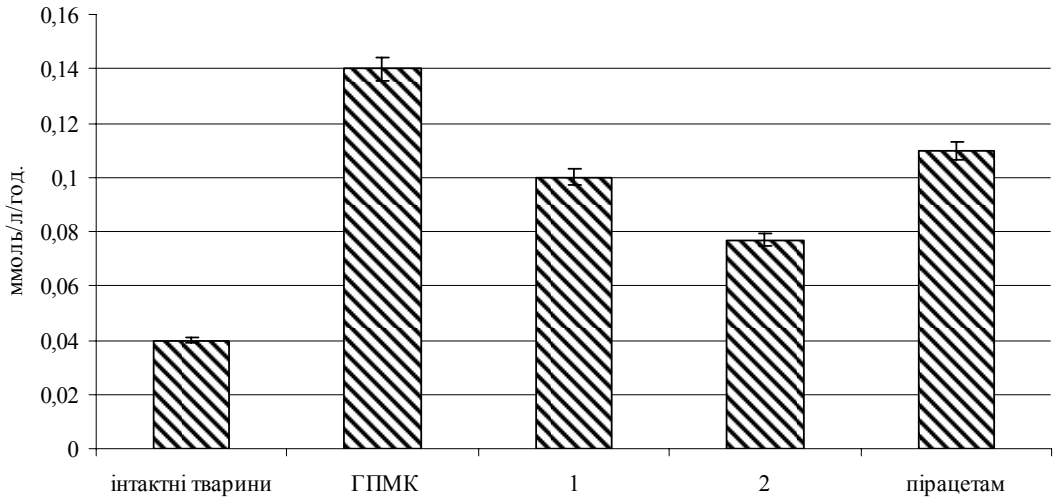


Рис. 2. Вплив натрієвих солей S-заміщених похідних 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну на активність ВВ-ізоформи КФК при гострому порушенні мозкового кровообігу

Висновки. Результати проведених досліджень підтвердили дані комп'ютерного прогнозу щодо прояву нейропротекторної активності. Натрієві солі S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну на моделі двосторонньої перев'язки загальної сонної артерії (*in vivo)* виявляють властивості ефективних біорегуляторів з нейропротекторною дією. В результаті аналізу експериментальних даних виявлено, що найбільш активною сполукою є натрієва сіль 3-(8-метокси-2-метилхінолін-4-ілтіо)пропанової кислоти (сполука 2), яка за показникам вуглеводного, енергетичного обміну перевищує препарат порівняння − пірацетам. Також встановлено, що найбільшу нейропротекторну дію при пошкодженні цілісності клітинних мембран головного мозку проявляє натрієва сіль 3-(8-метокси-2-метилхінолін-4-ілтіо)пропанової кислоти, тобто подовження карбонового ланцюга на $–CH_2$-групу впливає на збільшення показників.

РЕЗЮМЕ

Изучено влияние производных хинолина на показатели углеводного, энергетического обмена, на уровень креатинфосфокиназы. Установлено, что на нейропротекторную активность исследуемых веществ влияет природа меркаптокарбоновой кислоты в 4 положении хинолинового цикла.

Ключовые слова: S-замещенные 2-метил-4-меркапто-8-метоксихинолина, углеводный, энергетический обмен, нейропротекторная активность.

SUMMARY

Influence of derivatives of quinoline is studied on the indexes of carbohydrate, power exchange, on the level of kreatinfosfokinazy. It is set that on neuroprotector activity of the probed matters nature of merkaptokarbonovoy acid influences in 4 positions of quinolinovogo cycle.

Keywords: S-derivative 2-methyl-4-merkapto8-methoxyquinoline, energy, carbohydrate metabolism, neuroprotective activity.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гусев Е. И. Церебральній инсульт: проблемы и решения / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, М. Ю. Мартынов // Вестник РАМН. − 2003. − № 11. − С. 44-48.
2. Fieschi C. Prevention of Ischemic Stroke / C. Fieschi, M. Fischer. – Martin: Dunitz. Ltd, 2000. − 290 p.
3. Синтез, фізико-хімічні властивості α(β)-[S-(4-хіноліл)] тіолалканкарбонових кислот та їх ефірів / С. І. Коваленко, О. А. Бражко, І. А. Мазур та ін. // Фізіологічно активні речовини. – 2002. – № 2(34). – С. 15–19.
4. Прозоровский В. Б. Табличный экспресс-метод определения средних эффективных мер воздействия на биологические объекты / В. Б. Прозоровский // Токс. вестник. – 1998.– № 1. – С. 28-32.
5. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / Под ред. М. И. Прохоровой. – Л.: Изд. Ленинградского университета, 1982. − 272 с.
6. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В. В. Меньшикова.− М.: "Медицина", 1987. − 368 с.
7. Гусев Е. И. Ишемия головного мозга / Е. И. Гусев, В. И. Скворцова. – М.: "Медицина", 2001. – 328 с.
8. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідах // Експер. та клін. фізіол. і біохімія. − 2003. − № 2(22). − С. 108-109.
9. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин − М.: Высшая школа, 1990. − 352 с.
10. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.

Надійшла до редакції 13.05.2010 р.