УДК 547.831.1:577.1

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ S-ЗАМІЩЕНИХ 2-МЕТИЛ-4-МЕРКАПТО-8-МЕТОКСИХІНОЛІНУ

Генчева В.І., к.б.н., викладач, Омельянчик Л.О., д. фарм. н., професор,
Бражко О.А., д.б.н., професор, Завгородній М.П., к.б.н., доцент

Запорізький національний університет

Вивчена антиоксидантна активність ряду S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну. Встановлено, що активність досліджуваних сполук визначається природою карбонового ланцюга меркаптокарбонової кислоти в 4 положенні хінолінового циклу.

Ключові слова: S-заміщені 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну, антиоксиданти, антиоксидантні ферменти.

Генчева В.И., Омельянчик Л.А., Бражко А.А., Завгородний М.П. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ S-ЗАМЕЩЕННЫХ 2-МЕТИЛ-4-МЕРКАПТО-8-МЕТОКСИХИНОЛИНА / Запорожский национальный университет, Украина

Изучена антиоксидантная активность ряда S-замещенных 2-метил-4-меркапто-8-метоксихинолина. Установлено, что активность исследуемых веществ определяется природой карбоновой цепи меркаптокарбоновой кислоты в 4 положении хинолинового цикла.

Ключевые слова: S-замещенные 2-метил-4-меркапто-8-метоксихинолина, антиоксиданты, антиоксидантные ферменты.

Gencheva V.I., Omelyanchyk L.A., Brazhko A.A., Zavgorodniy M.P. THE RESEARCH BIOLOGOCAL ACTIVITY S-REPLACED 2-METHYL-4-MERKAPTO-8-METHOXYQUINOLINE / Zaporizhzhya national university, Ukraine

The antioxidant activity of some S-substituted 2-methyl-4-mercapto-8-metoksihinoline has studied. The activity of these substances is determined by the nature of the carbon chain mercaptan acids in 4 position quinolinic cycle has established.

Key words: S-derivative 2-methyl-4-merkapto8-methoxyquinoline, andioxidantes, antioxidants ferments.

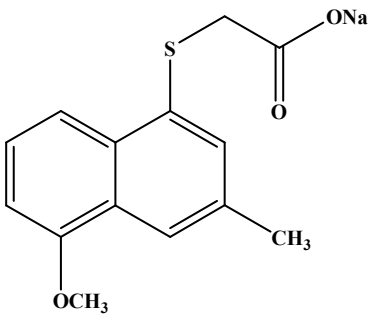
ВСТУП

Хінолін є структурним елементом багатьох лікарських препаратів, аналітичних реагентів [1]. Відомо, що в патогенезі багатьох захворювань провідне місце посідає порушення процесів вільнорадикального окислення, тому актуальним є пошук антиоксидантів серед похідних хіноліну [2, 3].

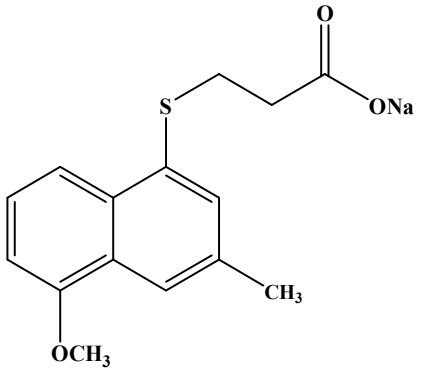
Метою даної роботи є дослідження антиоксидантної активності S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Були досліджені похідні хіноліну, які синтезовані за методикою [4].



сполука 1



сполука 2

Гостру токсичність визначали в дослідах на білих безпородних мишах масою тіла 18 – 25 г за методом Прозоровського [5].

Для дослідження антиоксидантної активності (АОА) сполук нами був використаний комплекс методів *in vitro*. Скринінг проводили на моделях, які дозволяють оцінити антиоксидантну активність сполук за рівнем стабільних молекул адренохрому й молекул малонового діальдегіду (МДА) – кінцевого продукту гідроперекисів ліпідів у порівнянні з пробами, у які не вносили антиоксидант (контрольна проба), дослідними пробами, де генерація радикалів була відсутня, пробами, у які додавали досліджувані сполуки, та пробами, у які вносили стандартний для використаної моделі еталон порівняння.

Перша модель АОА S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну за інгібуванням активної форми кисню (супероксидрадикал) дозволяє провести пошук антиоксидантів, що діють на початкових етапах перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). Друга модель характеризує антиоксиданту активність сполук на всіх етапах ПОЛ. Третя модель характеризує антиоксидантні властивості речовин на кінцевому етапі ПОЛ, де вільнорадикальні процеси відбуваються неферментативним шляхом. Четверта модель дає можливість визначення утворення NO – радикала [6, 7].

Антиоксидантну активність речовин у дослідах *in vivo* вивчали на білих щурах 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. Тваринам третьої − п’ятої 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.

Сполуки вводили один раз на добу протягом всього експерименту внутрішньочеревно в дозі 50 мг/кг маси; тваринам п’ятої групи вводили еталон порівняння – пірацетам − внутрішньочеревно у дозі 250 мг/кг маси за тією ж самою схемою.

Методики визначення всіх показників, які використовувались у роботі, описані в [9-11].

Для оцінки інтенсивності вільнорадикального окислення (ВРО) в тканинах головного мозку визначали початкові, проміжні та кінцеві продукти цього процесу – дієнові кон’югати (ДК), триєнкетони (ТК) і малоновий діальдегід (МДА) [6].

Дієнові кон’югати та триєнкетони визначали за методом О.Н. Орлович спектрофотометрично [9]. Рівень малонового діальдегіду визначали за методикою, яка описана Л.А. Андреєвою зі співавторами [9].

Вміст тіобарбітурової кислоти (ТБК) залежних продуктів МДА визначали за методикою [9].

Стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю супероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1), каталази (КФ 1.11.1.6), глутатіонпероксидази (ГПР, КФ 1.11.1.9), вмістом α-токоферолу та показниками окисної модифікації білка в тканинах головного мозку [7].

Активність СОД оцінювали за ступенем інгібування нітросинього тетразолію в присутності НАДН і феназинметасульфату [12], каталазу спектрофотометрично за методом М.А. Королюк [12].

Активність ГПР визначали за методикою [13]. Вміст α-токоферолу визначали спектрофотометрично [14].

Статистичну обробку отриманих результатів проводили, застосовуючи t-критерій Стьюдента [15].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вивчення гострої токсичності досліджуваних речовин показало, що вони відносяться до класу помірно або мало токсичних речовин. $ЛД_{50}$ вивчених сполук становлять 898 – 1131 мг/кг.

Аналіз результатів досліджень антиоксидантної активності досліджених сполук в умовах *in vitro* показав, що сполуки − натрієва сіль (8-метокси-2-метилхінолін-4-ілтіо)оцтової кислоти (сполука 1), натрієва сіль 3-(8-метокси-2-метилхінолін-4-ілтіо)пропанової кислоти (сполука 2) проявляють високу активність на всіх моделях ініціювання ВРО ліпідів (табл. 1).

Цей факт зумовлює необхідність подальших досліджень високоефективних сполук на антиоксидантну активність в умовах *in vivo* (експериментальна ішемія тканин головного мозку щурів).

Таблиця 1 – Антиоксидантна активність *in vitro* S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну (M±m, n=6)

Сполука	Інгібування O_2^-		НАДФ·Н-ПОЛ		Fe^{2+}-ПОЛ	
	Оптична густина	АОА, %	МДА, мкмоль/мл	АОА, %	МДА, мкмоль/мл	АОА, %
1[1]	0,150±0,005*	25,0	2,00±0,020*	20,0	3,30±0,08*	26,0
2	0,130±0,003*	35,0	1,74±0,015*	42,8	3,00±0,05*	33,0
Ініціація відсутня	–	–	0,75±0,002	–		
Контроль	0,200±0,005	–	–	–	–	–
Сечовина	0,130±0,002*	35,0	–	–	–	–
Контроль	–	–	2,52±0,025	–	–	–
Унітіол	–	–	2,05±0,010*	18,5	–	–
Ініціація відсутня	–	–	–	–	0,28±0,007	–
Контроль	–	–	–	–	4,50±0,07	–
Дибунол	–	–	–	–	3,30±0,04*	26,0

Примітки:

1. * − порівняно з контролем (P<0,05);

2. [1] − сполуки, що досліджувались, уводили в концентрації – 10^{-5} М.

На четверту добу експерименту спостерігалося підвищення дієнових кон'югатів на 151,8 184,3% (у 2,8 рази) у контрольній групі (після гострого порушення мозкового кровообігу) порівняно з інтактною групою тварин (рис. 1).

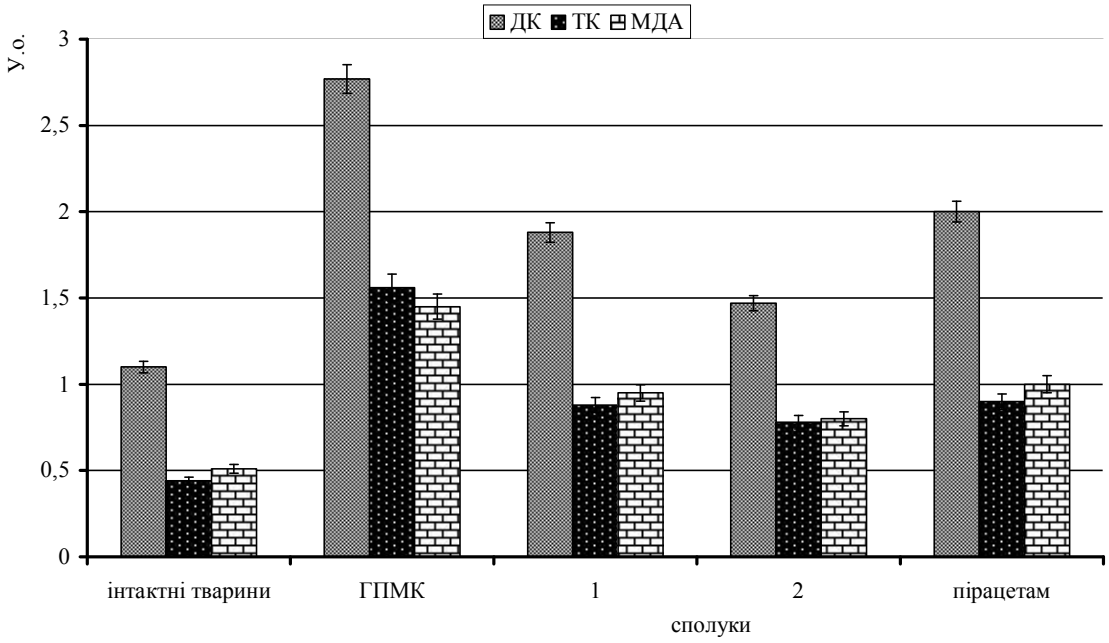


Рис. 1 Вплив S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну на показники вільнорадикального окиснення в головному мозку після гострого порушення мозкового кровобігу

При введенні сполуки 1 на фоні гострого порушення мозкового кровообігу спостерігається зниження рівня ДК на 32,1% порівняно з контролем. Збільшення ланцюга на CH_2-групу в залишку карбонової кислоти (сполука 2) зменшує показники рівня ДК на 46,9 % порівняно з контролем і наближається до рівня інтакту. При дії препарату порівняння – пірацетаму – спостерігалося зниження вмісту ДК лише на 27,7%.

Порівнюючи антиоксидантну дію сполук вивченої групи з дією еталона порівняння (пірацетам) при ГПМК, було встановлено, що сполуки цього ряду реалізують свій ефект як на ініціальних етапах ВРО, так і на вільнорадикальному етапі розвитку ВРО, а також на етапі пероксидації. Пірацетам впливає на всі продукти перекисного етапу розвитку ВРО, знижуючи лише вторинні продукти (ТК) (рис. 1).

Двостороння перев'язка загальної сонної артерії призводить до пригнічення активності ферментів антиоксидантного захисту в тканинах головного мозку на 62,4% рівня СОД, на 76,5% рівня каталази, на 54,6% рівня ГПР, на 52,3% рівня α-токоферолу (табл. 2).

Уведення S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну тваринам з експериментальною ішемією головного мозку призводить до підвищення рівня СОД на 39,3 – 92,2%, каталази − на 66,6 – 126,6%, ГПР − на 21,9 – 44,1%, вмісту α-токоферолу − на 65,0 – 90% по відношенню до контрольної групи (табл. 2).

Збільшення карбонового ланцюга на CH_2-групу − сполука 2 – впливає на збільшення вмісту СОД (на 52,9%) порівняно зі сполукою 1 ($P<0,05$). Досліджені сполуки підвищують рівень СОД і перевищують за дією пірацетам і наближають показники до рівня інтактної групи тварин.

Рівень каталази збільшується при введенні всіх досліджуваних S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну. Незначне збільшення вмісту каталази спостерігається при введенні сполуки 1 (66,6%) порівняно з контролем. Подовження карбонового ланцюга на CH_2-групу (сполука 2) впливає на достовірне підвищення рівня каталази (126,6%)

(P<0,05), дані вірогідні щодо препарату порівняння – пірацетаму. Сполука 2 перевищує активність пірацетаму.

Таблиця 2 − Вплив S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну на активність АО-ферментів і вміст α-токоферолу в головному мозку після гострого порушення мозковий кровообіг (ГПМК)

Група тварин	СОД, у.о./мг білка/хв.	% змін	Каталаза, мкат/мг білка/хв.	% змін	ГПР, мкмоль/мг білка/хв.	% змін	α-токоферол, мкмоль/г тканини	% змін
Інтактні тварини	246,2±9,6	–	12,8±0,13	–	68,3±2,7	–	4,2±0,04	–
Тварини з ГПМК	92,5±5,5	62,4	3,0±0,08	76,5	31,0±1,3	54,6	2,0±0,09	52,3
Тварини з ГПМК + 1	128,9±12,2	39,3	5,0±0,02	66,6	37,8±3,0	21,9	3,3±0,08	65,0
Тварини з ГПМК + 2	177,8±8,2**	92,2	6,8±0,03**	126,6	44,7±2,1*	44,1	3,8±0,08*	90,0
Тварини з ГПМК + пірацетам	128,5±10,1	38,9	5,7±0,05	90,0	38,6±2,0	24,5	3,3±0,08	65,0

Примітки:
1.* − P<0,05 відносно контролю;
2.** − P<0,05 відносно пірацетаму.

Це свідчить, що досліджені сполуки *in vivo* знижують показники окисного стресу при гіпоксії мозку і, можливо, діють як молекули антиоксидантного захисту − „пастки" вільних радикалів та індуктори синтезу антиоксидантних ферментів.

Рівень ГПР у контрольній групі тварин знижувався відносно інтакту (див. табл. 2). Курсове призначення S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну призводило до підвищення рівня даного антиоксидантного ферменту. За силою ефекту сполука 2 перевищувала активність пірацетаму. Незначний вплив на вміст ГПР проявляє сполука 1. Подовження карбонового ланцюга на CH_2-групу (сполука 2) призводить до збільшення активації і рівня ГПР на 44,1% порівняно з контролем.

Рівень α-токоферолу у тварин з ГПМК порівняно з інтактом зменшувався на 52,3% (див. табл. 2). При призначенні досліджуваних сполук вміст α-токоферолу збільшувався на 65,0-90,0%, наближаючи показники до інтактної групи тварин.

Таким чином, активація антиоксидантних систем, інгібування активних форм кисню і вільних радикалів призводила до зниження вмісту продуктів ВРО в ішемізованих тканинах мозку.

Досліджувані сполуки здатні реагувати як з активними формами кисню, так і запобігати їх утворенню, що нормалізує порушення тонких ланцюгів метаболізму (рис. 2). Найбільший рівень співвідношення СОД/МДА мала сполука 2.

Захисна дія S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихінолінів реалізується на початкових етапах розвитку вільнорадикального окиснення при ішемії за рахунок гальмування утворення активних форм кисню, реактивації антиоксидантного комплексу та позитивного впливу на порушення біоенергетичних процесів. Вважаємо, що в механізмі антиоксидантної і нейропротекторної дії найбільш активних сполук – натрієвих солей S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихінолінів – бере участь атом сірки залишку меркаптопропанових кислот як замісник з потенційно високими антиоксидантними властивостями, а також карбоксильна група та ендогенний атом азоту (метильна група в 2-му положенні хіноліну підсилює основність азоту). Це свідчить про те, що вони беруть участь у хелатоутворенні і здатні зв'язувати метали змінної валентності.

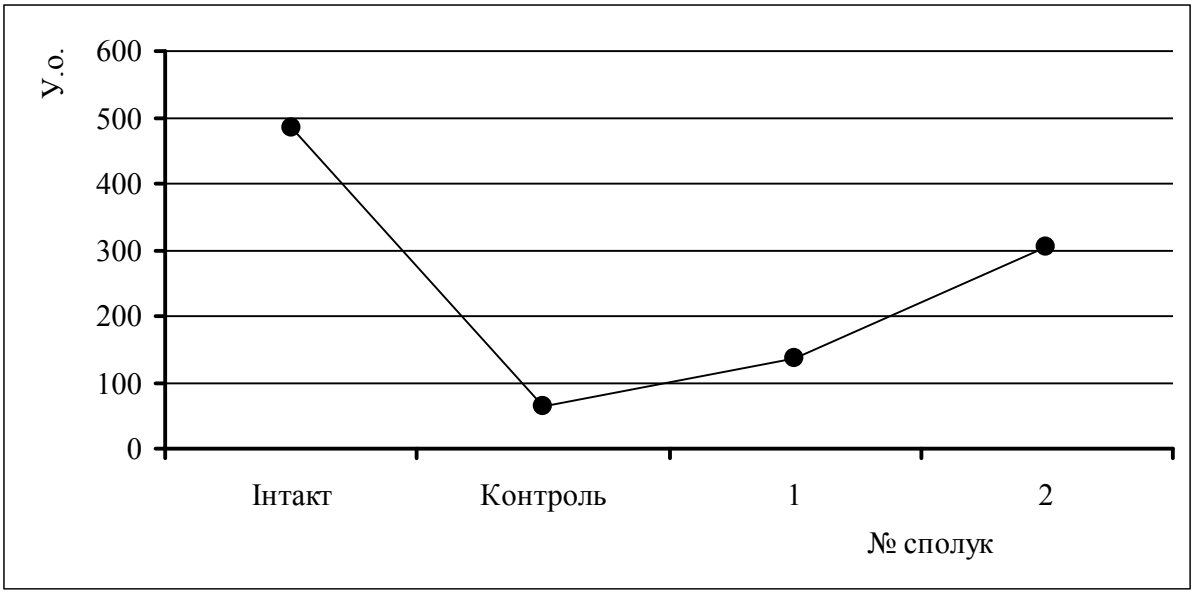


Рис. 2. Співвідношення між активністю СОД та рівнем МДА при гострому порушенні мозкового кровообігу

S-заміщені 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліни знижували гіперферментацію, із них сполука 2 за силою зниження переважала за своїм ефектом пірацетам і мала найбільший результат. За рівнем зменшення антиоксидантної та нейропротекторної дії досліджені сполуки розміщуються таким чином:

Сполука 2 > Сполука 1 > Пірацетам.

ВИСНОВКИ

1. Проаналізовано вплив карбонового ланцюга в 4-му положенні хінолінового циклу на антиоксидантну активність ряду S-заміщених 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну.
2. Показано, що S-заміщені 2-метил-4-меркапто-8-метоксихіноліну in vitro та *in vivo* (модель двосторонньої перев'язки загальної сонної артерії) виявляють властивості ефективних біорегуляторів з антиоксидантною дією і переважають еталон порівняння – пірацетам.

ЛІТЕРАТУРА

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства / Михаил Машковский. − М.: Медицина, 2005.− 1200 с.
2. Бражко О.А. Дослідження біологічної дії 4-тіопохідних хіноліну / О.А. Бражко, Л.О. Омельянчик, І.Ф. Бєленічев та ін. // Медична хімія. – 2003. – Т. 3, № 1. – С. 20 – 23.
3. Завгородній М.П. Антиоксидантна та гепатопротекторна активність натрієвих солей похідних β-(2-метилхінолін-4-ілтіо)-молочної кислоти / М.П. Завгородній, І.Ф. Бєленічев, Л.О. Омельянчик та ін. // Питання біоіндикації та екології. – Запоріжжя, 2004.- Вип. 9, № 2. – С. 149 – 157.
4. Бражко О.А. Біологічно активні похідні хіноліну та акридину з азото- та сірковмісними функціональними групами: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук: спец. 02.00.10 "Біоорганічна хімія" / Бражко Олександр Анатолійович; Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії національної академії наук України. − Київ, 2005. − 40, [1] с., включ. обкл.: іл.

5. Прозоровский В.Б. Табличный экспресс-метод определения средних эффективных мер воздействия на биологические объекты / В.Б. Прозоровский // Токс. вестник. – 1998.– № 1. – С. 28 – 32.

6. Губський Ю.І. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних сполук при ініціюванні вільно радикальних процесів у дослідах in vitro / Ю.І. Губський, В.В. Дунаєв, І.Ф. Бєленічев //Метод. рекомендації.− К.: ДФЦ МОЗ України, 2002.− 26 с.

7. Бєленічев І.Ф. Дослідження антиоксидантних властивостей в ряду похідних п'яти- та шестичленних азагетероциклів і визначення їх ефективності при ішемії головного мозку: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра біол. наук: спец. 14.03.05 "Фармакология" / Бєленічев Ігор Федорович; Інститут фармакології та токсикології. − Київ, 2003.− 35, [1] с., включ. обкл.: іл.

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. Коган В.С. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов / В.С. Коган, О.Н. Орлов, Л.Л. Прилипко. − М.: Медицина, 1998.− 287 с.

10. Перекисное окисление липидов в норме и патогенезе различных заболеваний: Сб. научн. трудов /Под ред. М.И. Агаджакова.− Ереван.− 1998.− 220 с.

11. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и методы ее определения в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело.− 1988.− № 11.− С. 678 – 681.

12. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк // Лабораторное дело.− 1988.− № 1.− С. 16 – 19.

13. Беленичев И.Ф. Изменение активности глутатионпероксидазы у больных с окклюзионными поражениями сосудов зрительного нерва / И.Ф. Беленичев, С.Ф. Максименко // Офтальмол. журн.− 1996.− № 3.− С. 150 – 153.

14. 14. Floyd R.A. Antioxidants, oxidative stress and detenerative neurological disorderes / R.A. Floyd // P.S.E.B.M. – 1999. – Vol. 222, №2.– P. 236 – 245.

15. Лакин Г.Ф. Биометрия / Георгий Лакин − М.: Высшая школа, 1990. − 352 с.

УДК 615.244:502.55(477.64 – 2)

ПОШУК ЕФЕКТИВНИХ ГЕПАТОПРОТЕКТОРІВ ЯК ЗАХИСТ ВІД НЕГАТИВНОГО ВПЛИВУ МІСТА ЗАПОРІЖЖЯ

Завгородній М.П., к. б. н., доцент, Бражко О.А., д. б. н., професор,
Омельянчик Л.О., д. фарм. н., професор, Панасенко Т.В., к. фарм. н., доцент.,
Добродуб І.В., аспірант, Богуславська О.С., студент

Запорізький національний університет

Проведений пошук ефективних гепатопротекторів як захист від негативного техногенного впливу. Розроблено препаративний метод отримання препарату „М", проведено доклінічне дослідження специфічної активності. На моделі інтоксикації печінки CCl_4 встановлено, що введення препарату „М" у дозі 1/50 LD_{50} (еталони порівняння - α-токоферол, 2,6-дитретбутил-4-метилфенол та силібор) наближає до норми рівень активності ферментів