

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ»

ПАВЛЮК ІВАН ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 616.89-008.441.3; 616.89-008.441.3-036.1-099-047.58

**НЕЙРОПРОТЕКТИВНА ДІЯ СПОЛУК L-ЛІЗИНУ ПРИ ХРОНІЧНОМУ
АЛКОГОЛІЗМІ**

14.03.05 - фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті,
м. Запоріжжя

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Бєленічев Ігор Федорович
Запорізький державний медичний університет,
завідувач кафедри фармакології та медичної рецептури

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, доцент
Ядловський Олег Євгенович
Національний медичний університет
імені О.О.Богомольця (м. Київ), доцент кафедри
фармакології;

доктор медичних наук, професор
Ходаківський Олексій Анатолійович
Вінницький національний медичний університет
імені М.І. Пирогова, професор кафедри фармакології,
завідувач Навчально-науково-дослідної лабораторії з
доклінічної оцінки лікарських засобів та
біологічно-активних речовин «Фармадар».

Захист відбудеться «06» червня 2018 р. об 11-00 годині, на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01 при ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

Автореферат розісланий «04» травня 2018 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01,
кандидат біологічних наук



І.В. Данова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Високий рівень алкоголізації населення в країнах пострадянського простору й, у тому числі, в Україні є причиною ранньої смертності працездатного населення (Самохвалов А. В., 2009; Осиченко А. С. та співавт., 2011; Шпілевий Я. В., 2012). Поряд зі значною смертністю серйозним наслідком хронічного зловживання алкоголю є порушення функцій головного мозку, а нейротоксичні пошкодження етанолом істотно впливають на соціальний статус та якість життя цієї категорії хворих і є причиною їх інвалідизації (Артемьева Т., 2010; Rehm J., 2009; Ammendola A., 2010; Manzo-Avalos S., 2012). Тому дослідження молекулярно-біохімічних уражень головного мозку при інтоксикації етанолом та розробка нових підходів до нейропротекції визначає актуальність цього дослідження з можливістю використання отриманих результатів в клінічній практиці. На жаль, базові ноотропи і нейрометаболітні препарати (пірацетам, мілдронат, цитофлафін, солі бурштинової кислоти) не завжди надають очікуваний нейропротективний ефект при алкогольному захворюванні (Петров В. М. та співавт., 2010; Fulton T., 2010; Чекман І. С. та співавт., 2012; Belenichev I. F., Kucherenko L. I., 2015). Обнадійливі результати показали нейротрофічні церебропротектори (цереброкурін, кортексин, церебролізин) і нейрометаболічний церебропротектор Тіоцетам (Беленічев І. Ф., 1999-2017; Мамчур В. Й., 2005-2016; Беленічев І. Ф., Соколик Е. П., 2012). Відома роль глутаматергічної системи в механізмах глутамат-кальцієвого каскаду, оксидативного стресу та ініціації нейроапоптозу і втрати когнітивно-мнестичних функцій (Беленічев І. Ф. та співавт., 2012). Останнім часом через призму нейропротекції розглядаються препарати, які модулюють активність таких трансмітерних систем головного мозку, як ГАМК-ергічні і глутаматергічні (Бородкіна Л. Є. та співавт., 2012; Васильєва Є. В. та співавт., 2013; Valenzuela C. F., 2012). На особливу увагу нейрофармакології заслуговує L-лізин і його похідні. L-лізин шляхом перетворення в піпеколієву кислоту підвищує афінність ГАМК бензодіазепін-рецепторного комплексу, знижує трансмітерний аутокоідоз і проявляє властивості ендogenous антиконвульсанта, нейропротектора і анксиолітика (Северьянова Л. А., 2007). Заслуговують на увагу і сполуки L-лізину - L-лізину гідрохлорид, L-лізину есцинат, N⁶- (1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид (селективний інгібітор iNOS), розроблений в НВО «Фарматрон» (Україна) (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат, що проявляють нейропротективні властивості на моделях церебральної ішемії і інтрацеребрального крововиливу (Мазур І. А. та співавт., 2009; Горбачева С. В., 2016; Leasure J. L., 2012). Вищевикладене теоретично обґрунтовує перспективність вивчення нейропротективної активності сполук L-лізину в умовах гострої і хронічної алкогольної інтоксикації і визначає актуальність даної роботи.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертація виконана відповідно до плану наукових досліджень Запорізького державного медичного університету і є фрагментом науково-дослідних робіт кафедри фармакології та медичної рецептури ЗДМУ «Молекулярно-біохімічні механізми формування мітохондріальної дисфункції нейронів головного мозку за умов гострої церебральної ішемії: нові мішені для нейропротекції» (№ держ. реєстрації 0113U000797; 2013-2015 рр.) та «HSP₇₀/HIF-1 α -опосередковані механізми ендогенної нейропротекції: розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020).

Мета і задачі дослідження: Мета - оцінити нейропротективні властивості сполук L-лізину та на основі експериментально встановлених механізмів позитивного впливу найбільш активної сполуки на морфологічні, біохімічні і функціональні порушення головного мозку в умовах експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації обґрунтувати об'єктивні можливості її використання в якості ефективного засобу із зазначеною дією.

Для реалізації поставленої мети необхідно було вирішити наступні задачі:

1. Виявити найбільш активну сполуку з нейропротективною активністю серед L-лізину гідрохлориду, L-лізину есцинату, N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду, (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату під час гострої алкогольної інтоксикації та визначити її ED₅₀ та LD₅₀.

2. Вивчити вплив найбільш активної сполуки при лікувальному и профілактичному введенні на показники неврологічних порушень (за шкалою C.P.McGraw) і когнітивно-мнестичних порушень (тест УРПУ і відкрите поле) при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації.

3. Вивчити вплив найбільш активної сполуки при лікувальному и профілактичному введенні на морфо-функціональні характеристики нейронів CA-1-зони гіпокампа (площа, густина, вміст РНК нейронів та глії, вміст апоптично змінених нейронів і вміст Vcl₂) в умовах хронічної алкогольної інтоксикації.

4. Вивчити вплив найбільш активної сполуки при лікувальному и профілактичному введенні на показники оксидативного та нітрозуючого стресу (NOS, нітротирозин, стабільні метаболіти NO, СОД, каталаза, АФГ, КФГ) в умовах хронічної алкогольної інтоксикації.

5. Вивчити вплив найбільш активної сполуки при лікувальному и профілактичному введенні на показники енергообміну (АТФ, АДФ, АМФ, лактат, піруват, малат, ГАМК-шунт) в умовах експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації.

6. Вивчити вплив найбільш активної сполуки при лікувальному и профілактичному введенні на морфо-функціональні показники ендотеліоцитів судин і капілярної сітки головного мозку (щільність, площа, вміст РНК і експресія VEGF) в умовах експериментальної хронічної алкогольної інтоксикації.

Об'єкт дослідження: молекулярно-біохімічні і морфо-гістологічні порушення в головному мозку щурів з хронічною алкогольною інтоксикацією.

Предмет дослідження: нейропротективна дія сполук L-лізину в умовах моделювання хронічної алкогольної інтоксикації.

Методи дослідження: фармакологічні, біохімічні, морфометричні, імуноферментні, гістоімунохімічні, математичної статистики і системного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. В дисертаційній роботі вперше отримані дані про нейропротективну активність сполук L-лізину - L-лізину гідрохлориду, L-лізину есцинату, N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду, (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату на моделі гострої алкогольної інтоксикації; дію даного виду активності направлено на зменшення неврологічних порушень, відновлення поведінкових реакцій, а також на зниження оксидативного стресу і нейроапоптозу. Встановлено, що (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін) за величиною нейропротективної дії перевершує досліджувані сполуки L-лізину і референс-препарат Мілдронат. Вперше на моделі хронічної алкогольної інтоксикації виявлена висока нейропротективна активність Ангіоліну при внутрішньошлунковому введенні, показано його перевагу при порівнянні з Мілдронатом. Встановлено, що Ангіолін при його лікувальному і профілактичному режимах введення в умовах хронічної алкогольної інтоксикації призводить до підвищення щільності ендотеліоцитів судин головного мозку, підвищення експресії ендотеліального фактора росту (VEGF), гальмування оксидативного стресу, підвищення аеробної продукції АТФ, підвищення щільності нейронів СА1-зони гіпокампа, гальмування нейроапоптозу, підвищення експресії антиапоптичного білка bcl-2, підвищення РНК в нейронах СА1-гіпокампа і, як наслідок, зменшення неврологічних і когнітивних порушень у експериментальних тварин.

Практичне значення одержаних результатів.

Отримані результати експериментального дослідження нейропротективної дії (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату (Ангіолін) увійшли до звіту, який представлений в ДУ «Державний експертний Центр МОЗ України» з метою створення нового лікарського препарату.

Новизна досліджень підтверджена патентами України (№ 106867 від 10.10.2014 та № 111462 від 25.04.2016). Результати дослідження впроваджені в педагогічний процес і наукову роботу Запорізького державного медичного університету, Дніпропетровської державної медичної академії, Буковинської державної медичної академії, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України»; кафедри фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету; кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету; кафедри загальної та медичної фармакології Одеського національного медичного університету,

а також до наукового процесу ДП «Державний науковий центр лікарських засобів та медичної продукції» МО України.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є особистою науковою працею автора. Робота виконана на базі Навчального медико-лабораторного центру Запорізького державного медичного університету (начальник - д.мед.н., професор Абрамов А. В.) та на кафедрі фармакології та медичної рецептури (завідувач - д.б.н., професор Беленічев І. Ф.). Разом з науковим керівником визначено мету і завдання дослідження, розроблено методичні підходи для виконання експериментальної частини дисертації. Дисертантом самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, освоєні і відтворені моделі гострої і хронічної алкогольної інтоксикації. Самостійно виконана первинна оцінка нейропротективної активності сполук L-лізину в умовах гострої алкогольної інтоксикації, а також вивчення сполуки (S) -2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін) на моделі хронічної алкогольної інтоксикації. Дисертант самостійно провів біохімічні дослідження з вивчення показників оксидативного стресу і енергетичного метаболізму головного мозку в умовах хронічної алкогольної інтоксикації, а також всі гістоморфометричні дослідження, проведена статистична обробка отриманих даних, узагальнені і проаналізовані результати досліджень, сформульовані висновки.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та висновки дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на: Всеросійській науково-практичній конференції молодих вчених «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013); Міжнародній конференції молодих вчених і I-V школах ім. академіка Н.М. Емануеля (Москва, 2013); Російському національному конгресі «Человек и лекарство» (Москва, 2014); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016» (Запоріжжя, 2016); V Національному з'їзді фармакологів України (Запоріжжя, 2017).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 14 наукових робіт, у тому числі 6 статей у фахових журналах України, що реферуються міжнародними наукометричними базами даних РІНЦ, Index Copernicus, International Google Scholar, 6 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю. Одержано 2 патенти України на винахід № 106867 від 10.10.2014, № 111462 від 25.04.2016.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 226 сторінках друкованого тексту (основний обсяг становить 151 сторінку) та складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 5 розділів особистих досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та 4 додатків. Робота проілюстрована 7 рисунками, 37 таблицями. Список використаних джерел містить 354 найменування, з них 280 кирилицею, 74 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи. Досліди виконані на 410 білих безпородних щурах масою 190-220 г, отриманих з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». При догляді за тваринами, харчуванні та проведенні експериментів керувалися базисними нормативними документами: рекомендаціями комітету з біоетики МОЗ України з експериментальної роботи з використанням тварин, рекомендаціями ВООЗ, рекомендаціями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших цілей. Дотримання етичних норм підтверджено комісією з питань біоетики ЗДМУ. Гостру алкогольну інтоксикацію (ГАІ) створювали шляхом одноразового інтрагастрального введення 25% розчину етанолу з розрахунку 22,4 г/кг. Цю кількість етанолу вважають дозою високої токсичності (такою вважають 0,8 ЛД₅₀) (Лисицький Д. С., 2013). Дана модель супроводжується психо-неврологічними змінами, а також патобіохімічними і морфогістологічними порушеннями головного мозку. Досліджувані препарати вводили тваринам через 30 хв. після введення алкоголю (лікувальний режим введення) внутрішньочеревинно одноразово: Ангіолін ((S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (субстанція, отримана на ДП «Завод хімічних реактивів», м. Харків (сертифікат якості № 1, серія № 010713; 2,5% розчин приготовлений у лабораторних умовах НВО «Фарматрон») - 50 мг/кг, L-лізину гідрохлорид (Sigma, USA, Cat. No L5626) - 100 мг/кг, L-лізину есцинат (Корпорація «Артеріум», Україна) - 0,5 мл/кг (1 мг/мл: 5 мл в ампулах), L-NIL (N⁶- (1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид), (Cat. No. 1139, Tocris Bioscience, UK) -20 мг/кг. Як референс-препарат застосовували Мілдронат (100 мг/кг, 10% розчин для ін'єкцій в ампулах), АО «Гріндекс» (Латвія), який широко застосовується при порушеннях нервової системи у хворих на хронічний алкоголізм.

Хронічну алкогольну інтоксикацію викликали щоденним внутрішньошлунковим введенням перші 10 днів - 15% розчину етанолу в дозі 4 г/кг, наступні 10 днів - 15% розчину етанолу в дозі 6 г/кг, і наступні 10 днів щурам вводили 25% розчин етанолу в дозі 4 г/кг (Пахомова А. та співавт., 2009; Беленічев І. Ф., Соколик Е. П., 2012). З 30 доби припиняли алкоголізацію і протягом 14 днів внутрішньошлунково вводили найбільш активну сполуку L-лізину (Ангіолін, таблеткова маса, приготовлена у лабораторних умовах НВО «Фарматрон») в експериментально обґрунтованій дозі та Мілдронат (250 мг/кг) АО «Гріндекс» (Латвія). В іншій постановці експерименту хронічну алкогольну інтоксикацію викликали цим самим методом протягом 30 днів, але паралельно вводили досліджувані препарати від моменту початку і до завершення алкоголізації в таких самих дозах. В кожній серії експерименту в інтактній групі було по 10 тварин, в контролі й експериментальних групах по 20 тварин. Визначення гострої токсичності досліджуваної сполуки проводили за методом Кербера в модифікації А. О. Лойт і М. Ф. Савченкова. Визначення ефективної дози перспективної сполуки проводили на моделі гострої алкогольної інтоксикації. Виразність гострого отруєння етанолом оцінювали за

«бальною системою». Для оцінки ступеня пригнічення функціонування ЦНС при дії етанолу розраховували індекс тяжкості неврологічних порушень (ІТНП) (Лисицкий Д. С., 2013). Для оцінки порушення поведінки і стану тварин після експериментальної алкоголізації визначали stroke-index (С.Р. McGrow, 1977; Чекман І. С., 2016), оцінювали вираженість орієнтовно-дослідницької активності щурів в тесті «відкрите поле» та визначали умовну реакцію пасивного уникнення (Чекман І. С., 2016). Тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг). Для біохімічних досліджень головний мозок подрібнювали в рідкому азоті до порошкоподібного стану і гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища при (2°C), що містить (в ммольях): сахарози – 250, трис-НСІ-буфера – 20, ЭДТА -1 (рН 7,4). Цитоплазматичну і мітохондріальну фракції виділяли методом диференційного центрифугування на рефрижераторній центрифугі «Sigma 3-30k» (Німеччина) при 14000 g 10 хв при +4°C. Визначення вмісту ГАМК, гліцину та глутамату проводили методом тонкошарової хроматографії (Чекман І. С., 2016). Для оцінки енергетичних ресурсів у тканині головного мозку визначався вміст аденілових нуклеотидів; спрямованість та інтенсивність гліколізу оцінювали за рівнем лактату та пірувату; окислення в циклі Кребса визначали за вмістом малату (Lundblad R. L., 2010; Чекман І. С., 2016). Для з'ясування глибини патологічного процесу і ступеню розвитку оксидативного стресу в тканині головного мозку визначали вміст продуктів окислювальної модифікації білка (ОМБ) за реакцією взаємодії окислених амінокислотних залишків із 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) (Чекман І. С., 2016). Вміст стабільних метаболітів оксиду азоту в головному мозку визначали за реакцією з реактивом Гриса (Чекман І. С., 2010). Активність NO-синтази визначали методом, в основі якого лежить стехіометричне окислення НАДФН в процесі реакції утворення NO із L-аргініну (Чекман І. С., 2016). Активність каталази визначали спектрофотометрично (Королюк М. А., 1988; Чекман І. С., 2016). Визначення активності супероксиддисмутази проводили спектрофотометрично (Чеварі С. І., 1988; Чекман І. С., 2016). Нітротирозин визначали твердофазним імуносорбентним сендвідж-методом ELISA, ELISA Kit (Cat. № НК 501-02). Для дослідження морфофункціонального стану нейронів на ротаційному мікроскопі виготовляли зрізи СА-1 зони гіпокампа товщиною 5 мікрон. Зрізи гіпокампа депарафінували і фарбували для РНК за Ейнарсоном. Для дослідження морфофункціонального стану ендотеліоцитів капілярів IV-V шарів кори й стінки судин судинної оболонки мозку, судинного сплетіння шлуночків мозку, гілок центральної мозкової та очної артерій, гістологічні зрізи забарвлювали галоціанін-хромовими квасцями за Ейнарсоном. Морфометричні дослідження проводили на мікроскопі «Axioskop» (Zeiss, Німеччина), збільшення x40. Зображення нейронів в області зони СА-1 гіпокампа, одержані на мікроскопі за допомогою високочутливої відеокамери СОНУ-4922 (СОСНУ Inc., США), вводили в комп'ютерну програмно-апаратну систему цифрового аналізу зображення VIDAS. Аналіз зображень проводили у напівавтоматичному режимі. Експресію ендотеліального фактору росту (VEGF) визначали імуногістохімічно. Як первинні антитіла використовували

IgG1 щурів до ендотеліального фактору росту щура/людини (клон СН-10), (кат. № МАВ1665). Методом імуноблотингу визначали концентрацію антиапоптичного білка bcl-2.

Результати дослідження розраховували із застосуванням стандартного статистичного пакету ліцензійної програми «STATISTICA® for Windows 6.0» (StatSoftInc., №АХХR712D833214FAN5), а також «SPSS 16.0», «Microsoft Office Excell 2003». Нормальність розподілу оцінювали за критерієм Shapiro-Wilk. Достовірність відмінностей між середніми значеннями визначали за критерієм Стьюдента при нормальному розподілі. У разі розподілу, відмінного від нормального, або аналізу порядкових змінних використовували критерій U Mann-Whitney. Для порівняння незалежних змінних в більш ніж двох вибірках застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) при нормальному розподілі або критерій Kruskal-Wallis для розподілу, відмінного від нормального. Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали відмінності $p < 0,05$ (95%).

Результати досліджень та їх обговорення

Початковими дослідженнями було встановлено, що всі досліджувані похідні L-лізину проявляють, в різного ступеня вираженості, нейропротективну дію в умовах ГАІ. Нейропротективна дія у сполук L-лізину направлена на зменшення неврологічних порушень, відновлення поведінкових реакцій (тварини швидше реагували на звукові подразники, взяття їх в руки, переверталися на живіт, починали самостійно пересуватися), а також на гальмування оксидативного стресу. За силою нейропротективної дії два похідних L-лізину - (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін) і N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлорид достовірно перевершують ефективність мілдронату, а два похідних - L-лізину есцинат і L-лізину гідрохлорид - можна порівняти з ним. Найбільш активним серед всіх досліджуваних сполук є Ангіолін. Одноразове введення Ангіоліну тваринам з ГАІ в лікувальному і, особливо, в профілактичному режимі призводить до відновлення орієнтовно-дослідницької активності і підвищує щільність нейронів СА1-зони гіпокампа, збільшує вміст в них РНК і знижує кількість нейронів з ознаками апоптозу. На моделі ГАІ встановлена ефективна доза Ангіоліну при внутрішньошлунковому введенні 100 мг/кг і його ЛД₅₀ при внутрішньошлунковому введенні щурам - 15000 мг/кг та мишам - 10309 мг / кг.

Отримані результати експериментально обґрунтовують перспективність подальших досліджень нейропротективних властивостей Ангіоліну при моделюванні хронічної алкогольної інтоксикації. Моделювання ХАІ призводило до стійких порушень ЦНС у експериментальних тварин - пригнічувалась орієнтовно-дослідницька активність, погіршувалися когнітивно-мнестичні функції, також у тварин реєстрували агресивність, тривожність і неврологічні порушення. Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково як протягом 14 діб після 30-денної ХАІ, так і, особливо, при паралельному формуванні модельної патології, призводило до нормалізації орієнтовно-дослідницької активності, збереження пам'ятного сліду в тесті УРПУ. Ангіолін значно зменшував прояви неврологічних порушень у алкоголізованих тварин: тремор, ригідність хвоста, хаотичні рухи в клітці, птоз,

гіперактивність, судомні скорочення м'язів з перших днів лікування, а також надавав анксиолітичну дію (рис. 1). Так, Ангіолін збільшував кількість горизонтальних рухів на 321% і 347%, вертикальних – на 211% і 304%, обстежень отворів - на 151 % і 368 %, збільшував латентний період УРПУ на 134-928 %%, знижував неврологічний дефіцит (на 3-4,5 балів за McGraw) ($p \leq 0,05$).

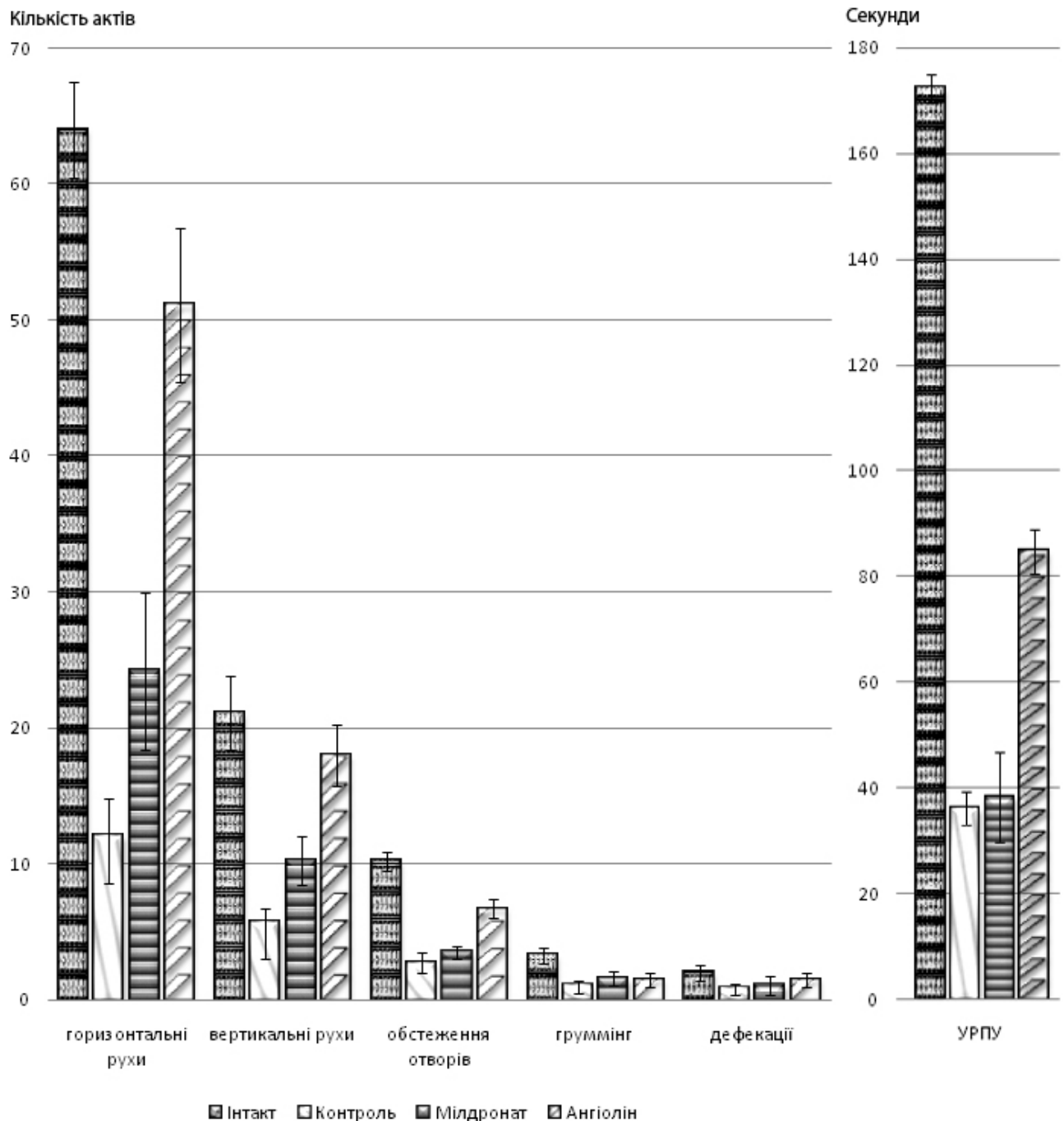


Рис. 1. Вплив Ангіоліну і Мілдронату на показники орієнтовно-дослідницької активності й поведінки тварин на 14 день лікування після моделювання 30-денної хронічної алкоголізації

Подібна дія Ангіоліну забезпечується дією молекули L-лізину, що входить до його складу, який підвищує афінність ГАМК рецепторів, обмежує глутаматну ексайтотоксичність, збільшує концентрацію ГАМК в нейронах

неокортексу, гіпокампа і лімбічної системи і має протисудомну, анксиолітичну та седативну дію (Северьянова Л. А., 2007). За збільшенням кількості горизонтальних рухів і дослідження отворів, регресу неврологічного дефіциту, а також - збереженням умовного рефлексу Ангіолін перевершує ($p \leq 0,05$) Мілдронат. Хронічна алкоголізація приводила до гіперпродукції АФК і NO, гальмування активності антиоксидантних ферментів СОД і каталази і формування оксидативного стресу, накопичення продуктів окисної модифікації білків - АФГ і КФГ в головному мозку експериментальних тварин. Ангіолін виявляв значний антиоксидантний ефект при лікувальному і профілактичному режимі введення в умовах ХАІ.

Ангіолін знижував рівень маркерів оксидативного стресу - АФГ і КФГ на 32% і 36% й 46% і 43%, на фоні підвищення активності СОД на 160% 168% і каталази на 248%, 271% по відношенню до контролю ($p \leq 0,05$). Антиоксидантні ефекти Ангіоліну забезпечуються наявністю в його структурі 3-метил-1,2,4-триазоліл-тіоацету, який є скавенджером кисневих радикалів і цитотоксичних дериватів NO (Беленічев І. Ф., 2003-2017), здатністю гальмувати утворення АФК в глутамат-кальцієвому каскаді і в біоенергетичних системах мітохондрій (Чекман І. С., 2015; Павлов С. В., 2016), а також регулювати експресію СОД (Дунаєв В. В., Тішкін В. С., 1990-2012). Відомо, що нейрони з дефіцитом СОД менш стійкі до гіпоксії, підвищених концентрацій глутамату, АФК і NO (Ванін А. Ф., 2011; Беленічев І. Ф., 2014). Антиоксидантний механізм нейропротективної дії Ангіоліну по всій видимості є одним з найважливіших, тому що оксидативний стрес відіграє роль першого плану в нейродеструкції, викликаній алкогольною інтоксикацією (Bailey S. M., 2011; Manzo-Avalos S., 2015). За вираженістю антиоксидантної дії Ангіолін достовірно перевершує Мілдронат. Моделювання ХАІ викликає стійкі порушення в системі NO головного мозку: значне підвищення активності NOS, виснаження запасів L-аргініну, гіперпродукції NO і підвищення в 8-9 разів концентрації маркера нітрозуючого стресу - ніротирозину. Хронічна алкоголізація приводить до підвищення експресії: на 1-4 добу мРНК pNOS, pNOS, а потім мРНК iNOS, iNOS, підвищення активності цього ферменту і до утворення значної кількості цитотоксичних метаболітів NO (Deng XS, 2007; Соколик Е. П., 2012; Беленічев І. Ф., Кучер Т. В., 2016). Ангіолін в лікувальному, а також в профілактичному режимі введення нормалізує основні показники нітросидергічної системи головного мозку щурів з ХАІ і гальмує нітрозуючий стрес. Так, Ангіолін знижує активність NOS, знижує вміст стабільних метаболітів NO на 54% і 67%, підвищує концентрацію L-аргініну на 289% 101% і знижує рівень маркера оксидативного стресу - ніротирозину в плазмі крові на 60% і 73% й головному мозку на 67,2 % і 73% ($p \leq 0,05$). Гіперпродукція NO і накопичення його цитотоксичних дериватів призводить до нітрозолування антиапоптичних білків bcl-2, знижуючи їх функції, а також підсилює синтез проапоптичних білків FAS і APO-1 (Болдирєв А. А., 2008; Deitrich R. A., 2011). Відомо, що Ангіолін захищає NO від АФК, запобігаючи його перетворенню в пероксин, тим самим перериваючи реакції нітрозуючого стресу (Мазур І. А., Чекман І. С., Беленічев І. Ф., 2011).

Таблиця 1

Вплив Ангіоліну і Мілдронату в лікувальному режимі введення на біохімічні показники головного мозку щурів з ХАІ

Групи тварин	NO ₂ ⁻ , мкМ/Г тканини	АТФ, мкмоль/Г тканини	малат, мкмоль/Г тканини	нітро-тирозин, нмоль/Г тканини	СОД, у.о./мг білка/ хв	КФГ, у.о./Г білка	ГАМК, мкмоль/Г тканини
Інтакт (n=10)	4,84 ±0,83	3,56 ±0,08	0,48 ±0,03	17,23 ±1,05	267,3 ±23,5	0,175 ±0,02	3,47 ±0,31
Контроль (ХАІ)(n=10)	16,90 ±1,6	1,77 ±0,05	0,37 ±0,02	144,27 ±18,5	89,7 ±4,9	0,3 ±0,02	1,23 ±0,11
Мілдронат, 250 мг/кг (n=10)	15,86 ±1,5	1,94 ±0,10	0,39 ±0,02	87,71 ±6,4	121,3 ±13,4*	0,255 ±0,015*	1,02 ±0,09
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	7,67 ±0,68* ¹	3,19 ±0,12* ¹	0,64 ±0,03* ¹	47,26 ±2,63* ¹	233,7 ±25,1* ¹	0,19 ±0,02* ¹	3,168 ±0,41* ¹

Примітка :*-p≤0,05 відносно групи контролю;

¹- p≤0,05 відносно групи, що отримувала Мілдронат

Таблиця 2

Вплив Ангіоліну і Мілдронату в профілактичному режимі введення на біохімічні показники головного мозку щурів з ХАІ

Групи тварин	NO ₂ ⁻ , мкМ/Г тканини	АТФ, мкмоль/Г тканини	малат, мкмоль/Г тканини	нітро-тирозин, нмоль/Г тканини	СОД, у.о./мг білка/ хв	КФГ, у.о./Г білка	ГАМК, мкмоль/Г тканини
Інтакт (n=10)	5,19 ±0,13	3,16 ±0,17	0,48 ±0,03	17,3 ±01,34	270,8 ±18,1	0,172 ±0,021	2,88 ±0,21
Контроль (ХАІ)(n=10)	14,4 ±0,26	1,57 ±0,15	0,39 ±0,05	157,9 ±11,2	106,1 ±7,73	0,338 ±0,028	1,12 ±0,10
Мілдронат 250 мг/кг (n=10)	11,3 ±0,48*	1,77 ±0,07	0,42 ±0,08	83,4 ±5,23*	134,7 ±14,5*	0,310 ±0,048	1,22 ±0,14
Ангіолін 100 мг/кг (n=10)	4,65 ±0,32* ¹	3,10 ±0,11* ¹	0,71 ±0,05*	42,7 ±3,65* ¹	285,3 ±15,7* ¹	0,192 ±0,023* ¹ (-43%)	2,45 ±0,22*

Примітка :*-p≤0,05 відносно групи контролю;

¹- p≤0,05 відносно групи, що отримувала Мілдронат

Моделювання ХАІ викликає стійкі порушення енергетичного метаболізму головного мозку експериментальних тварин - енергетичного дефіциту, гальмування реакцій циклу Кребса і активації анаеробного гліколізу. Так, в головному мозку тварин контрольної групи реєстрували достовірне

зниження АТФ і АДФ на фоні збільшення АМФ, підвищення рівня лактату і зниження рівня малату й пірувату. Етанол-залежний трасміттерний аутокоідоз, оксидативний і нітрузуючий стреси при хронічній алкоголізації приводять до пошкодження мембран мітохондрій, нітрозолування SH-груп білків мітохондріальної пори, призводять до формування вторинної мітохондріальної дисфункції і енергетичного дефіциту нейронів головного мозку (Sun L., 2012; Павлов С. В., 2015).

Призначення тваринам з ХАІ в лікувальному і профілактичному режимі Ангіоліну призводило до зниження енергетичного дефіциту за рахунок посилення аеробної продукції макроергів і зниження анаеробного гліколізу. Так, у тварин з ХАІ, які отримували Ангіолін, відбувалося підвищення в головному мозку АТФ на 80%, 97%, АДФ на 20%, 19%, зниження АМФ на 12%, 35%, підвищення малату на 73%, 82% і пірувату на 33%, 31% і зниження лактату на 50%, 49% в порівнянні з групою контролю ($p \leq 0,05$). Ангіолін за впливом на досліджувані показники енергетичного обміну перевершує Мілдронат ($p \leq 0,05$). Механізм дії Ангіоліну на енергетичний обмін обумовлений здатністю його структурного фрагмента - 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату обмежувати розвиток мітохондріальної дисфункції і активувати компенсаторні шунти продукції енергії, зокрема малат-аспартатний (Мазур І. А., Дунаев В. В., 1992-2011; Беленічев І.Ф., 2002-2016). Моделювання ХАІ призводило до підвищення активності ГДК і ГАМК-Т, а також зниження глутамату, ГАМК та гліцину в головному мозку. Курсове введення Ангіоліну тваринам з ХАІ призводило до підвищення ГАМК на 157% й 119%, глутамату на 112% й 50% і гліцину на 50% та 55% і зниження активності ГДК на 17% й 13% і ГАМК-Т на 32% й 32%, відповідно, по відношенню до контролю ($p \leq 0,05$) (табл. 1, 2). У крові хворих на алкогольну залежність, а також в неокортексі щурів з хронічною алкоголізацією виявлено значний дефіцит ГАМК і гліцину на тлі високої тривожності, депресії, агресивності, поведінкових порушень.

Мілдронат не проявляв достовірного впливу на показники ГАМК-ергічної системи головного мозку. Моделювання ХАІ призводить до пошкодження нейронів CA1 зони гіпокампа - зниження щільності та площі нейронів, зменшення в них концентрації РНК і значного збільшення апоптично змінених нейронів. Також було виявлено зниження концентрації в нейронах bcl-2. В основі пошкодження нейронів при хронічному алкоголізмі лежить етанол-індукована ексайтотоксичність, підвищена продукція NO на фоні експрес іNOS, активації оксидативного стресу, зниження рівня антиапоптичних білків і, в кінцевому підсумку, активації нейроапоптозу (Deng X. S., 2007; Беленічев І. Ф., Соколик Е. П., Єгоров О. М., 2011-2016).

Таблиця 3

Вплив Ангіоліну й Мілдронату в лікувальному режимі введення на морфо-функціональні показники головного мозку щурів з ХАІ

Досліджувані	Щільність	Площа	Вміст РНК	Щільність
--------------	-----------	-------	-----------	-----------

показники	нейронів (нейрон/мм ²)	нейронів (мкм ²)	(E _{оп})	апоптотичних клітин на 1мм ²
Інтакт (n=10)	1442,5±132,1	161,6±14,2	15,18±1,1	78,3±8,11
Контроль (ХАІ) (n=10)	804±80,9	111,0±7,2	9±0,7	181,6±21,0
Мілдронат, 250мг/кг (n=10)	951,1±77,2*	120±11,7 (+8%)	9,87±0,87 (+9%)	167,7±15,1
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	1201,8±105,5* ¹	151,7±15,1* ¹	14,82±1,7* ¹	112,2±12,33* ¹

Примітка :*-p≤0,05 відносно групи контролю;

¹– p≤0,05 відносно групи, що отримувала Мілдронат

Таблиця 4

Вплив Ангіоліну й Мілдронату в профілактичному режимі введення на морфо-функціональні показники головного мозку щурів з ХАІ

Досліджувані показники	Щільність нейронів (нейрон/мм ²)	Площа нейронів (мкм ²)	Вміст РНК (E _{оп})	Щільність апоптотичних клітин на 1 мм ²
Інтакт (n=10)	1443,2±32,9	163,6±9,2	14,8±0,76	78,2±12,5
Контроль (ХАІ) (n=10)	897,0±69,9	110,3±8,63	9,4±0,99	167,1±12,7
Мілдронат, 250мг/кг (n=10)	1082,3±88,9*	120,0±6,3	9,5±0,64	142,2±10,9
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	1411,1±61,0* ¹	160,1±10,8* ¹	16,7±0,97* ¹	81,2±5,1* ¹

Примітка :*-p≤0,05 відносно групи контролю;

¹– p≤0,05 відносно групи, що отримувала Мілдронат

Введення тваринам з ХАІ, в лікувальному і профілактичному режимі, Ангіоліну призводило до підвищення щільності нейронів СА1-гіпокампа на 49,3% і 57%, їх площі на 36% і 45%, збільшення в них вмісту РНК на 64% 77% і зниження щільності апоптично змінених клітин на 38%, 51% щодо контролю (p ≤ 0,05). Ангіолін також збільшував вміст в нейронах bcl-2 на 460% 311% (p ≤ 0,05) щодо контролю. ХАІ приводила до зниження щільності та площі гліальних клітин СА1-гіпокампа і зниження в них РНК. Ангіолін підвищував щільність гліальних клітин на 38,7% і 23,2%, їх площі на 36% і 37% і підвищував концентрацію в них РНК на 61% і 86% в порівнянні з групою контролю (p ≤ 0,05). Ангіолін за впливом на досліджувані морфо-функціональні показники нейронів і гліальних клітин СА1-гіпокампу перевершує Мілдронат (p ≤ 0,05) (табл. 3, 4). Введення Ангіоліну тваринам після моделювання ХАІ надавало протективний ефект на ендотелій капілярів IV-V шарів кори і стінки судин головного мозку, що проявлялося збільшенням щільності ядер

ендотеліоцитів на 38% і 42%, площі ядер на 21% і 22% і підвищенням в них концентрації РНК на 37% і 41%, збільшенням щільності проліферуючих ендотеліоцитів на 47% і 142% і підвищенням експресії VEGF на 88% і 367% в порівнянні з контролем ($p \leq 0,05$). VEGF являє собою гіпоксично індукований ангіогенний пептид з нейротрофічними ефектами (табл. 5). Тому, фармакологічна модуляція експресії VEGF є перспективним напрямком нейропротекції (Zachary I., 2005; Beazley-Long N., 2013) Мілдронат не впливав на морфо-функціональні показники ендотеліоцитів капілярів і стінки судин головного мозку.

Таблиця 5

Вплив Ангіоліну й Мілдронату в лікувальному режимі введення на морфо-функціональну характеристику ендотеліоцитів судин головного мозку щурів з ХАІ

Досліджувані показники	Щільність ядер на 1 мм ² стінки судин	РНК в ядрах, E _{оп}	Щільність проліферуючих клітин на 1 мм ² кори	Концентрація (VEGF), E _{іф}
Інтакт (n=10)	887±14	0,294±0,003	771±26	0,78±0,01
Контроль (ХАІ) (n=10)	613±17	0,211±0,001	461±22	0,51±0,02
Мілдронат, 250мг/кг (n=10)	637±11	0,207±0,001 (-2%)	437±21 (-5%)	0,50±0,02
Ангіолін, 100 мг/кг (n=10)	850±12* ¹	0,293±0,001* ¹	677±23* ¹	0,96±0,02* ¹

Примітка :*- $p \leq 0,05$ відносно групи контролю;

¹– $p \leq 0,05$ відносно групи, що отримувала Мілдронат

Отримані результати свідчать про те, що ендотеліопротективна дія Ангіоліну може бути важливою ланкою його нейропротективної дії в умовах ХАІ.

Таким чином, в результаті проведених досліджень було виявлено сполуку L-лізину – (S) -2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін), яка проявляє найбільш виражену нейропротективну дію в умовах алкогольної інтоксикації. Нейропротективна дія Ангіоліну в умовах ХАІ спрямована на гальмування оксидативного і нітрозативного стресу, нормалізацію енергетичного метаболізму головного мозку, гальмування нейроапоптозу в СА1-гіпокампі та активацію експресії bcl-2, протекцію ендотеліоцитів судин головного мозку та підвищення експресії VEGF, що, в підсумку, призводить до поліпшення неврологічного статусу і поведінкових реакцій експериментальних тварин. Механізм цієї дії обумовлений здатністю метаболіту L-лізину - піпеколієвої кислоти обмежувати трасмітерний аутокоідоз (Северьянова Л. А., 2007) і властивостями 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-

тіоацетату активувати комплексаторні мітохондріальні-цитозольні шунти енергії, інактивувати цитотоксичні форми NO, гальмувати NO-залежний механізм нейроапоптозу і підвищувати біодоступність цього трансмітера (Мазур І. А., 2012; Belenichev I. F., 2015); також за рахунок антиоксидантних властивостей Ангіолін здатний впливати на АФК- і SH-SS-залежні механізми Red / Охі регуляції і транскрипції (Чекман І. С., Мазур І. А., 2010), що може призводити до підвищення експресії VEGF і ряду цитопротективних білків.

Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням для подальшого вивчення Ангіоліну з метою створення на його основі нейропротективного препарату для лікування алкогольних захворювань.

ВИСНОВКИ

У дисертаційному дослідженні наведено нове вирішення актуальної наукової задачі фармакології, яке полягає в експериментальному обґрунтуванні доцільності застосування найбільш активної сполуки L-лізину - (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату (Ангіолін) як нейропротективного засобу для лікування алкогольної хвороби.

1. В результаті первинного скринінгу нейропротективної активності серед чотирьох сполук L-лізину на моделі гострої алкогольної інтоксикації виявлено сполуку з найбільш вираженою бажаною дією - сполука (S) -2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5 тіоацетат (Ангіолін), яка відноситься до V класу токсичності (ЛД₅₀ при внутрішньошлунковому введенні щурам -15000 ± 211 мг/кг).

2. Введення тваринам протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації, а також профілактично паралельно 30-добовій алкоголізації внутрішньошлунково Ангіоліну в експериментально обґрунтованій дозі 100 мг/кг призводило до покращення показників орієнтовно-дослідницької діяльності на 321-368 %%, збільшення латентного періоду УРПУ на 134-928 %%, зменшення прояву неврологічної симптоматики (на 3-4,5 балів за McGraw).

3. Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково (100 мг/кг) протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації, а також профілактично паралельно 30-добовій алкоголізації призводило до збільшення щільності нейронів СА-1 зони гіпокампа на 49-57%%, зменшення щільності апоптично змінених нейронів на 38-51%%, підвищення експресії білка bcl-2 на 460-500%.

4. Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково (100 мг/кг) протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації, а також профілактично паралельно 30-добовій алкоголізації призводило до зменшення оксидативного і нітрозативного стресу - АФГ на 32-46%% і КФГ на 36-43%%, стабільних метаболітів NO - на 54-67%% і активності NO-синтази на 59-68%%, нітротирозину - на 67-73%% на фоні підвищення активності СОД на 160-168%%, каталази - на 248-271 %% .

5. Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково (100 мг/кг) протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації, а також профілактично паралельно 30-добовій алкоголізації призводило до нормалізації окисного метаболізму головного мозку - підвищення вмісту АТФ на 80-97%%, малату - на 73-82%% і пірувату на 31-33%%, а також підвищення гальмівних нейротрансмітерів - ГАМК на 119-157%% і гліцину на 50-55%%.

6. Курсове введення Ангіоліну внутрішньошлунково (100 мг/кг) протягом 14 діб після 30-денної алкогольної інтоксикації призводило до підвищення щільності ендотеліоцитів капілярної сітки кори головного мозку на 38% і судинної стінки судин мозку на 42%, підвищувало вміст РНК в ендотеліоцитах на 37% і 41% відповідно, а також збільшувало щільність проліферуючих ендотеліоцитів в цих судинах на 47% і 142% відповідно, а також призводило до підвищення експресії фактора росту ендотелію (VEGF) в капілярній мережі і в судинах мозку на 88% і 367% відповідно.

7. Ангіолін в умовах хронічної алкогольної інтоксикації при лікувальному і профілактичному режимах введення достовірно перевищує референс-препарат Мілдронат за такими показниками нейропротективної активності, як щільність нейронів і частка апоптично змінених нейронів СА-1 зони гіпокампа, рівень антиапоптичного білка bcl-2, концентрація АТФ та експресія фактора росту ендотелію (VEGF).

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Павлюк И. В. Влияние Ангиолина на морфо-функциональные показатели СА-1 зоны гиппокампа и процессы нейроапоптоза при моделировании хронической алкогольной интоксикации при лечебном режиме введения / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, А. В. Абрамов, Л. И. Кучеренко // Вісник проблем біології і медицини, Український науково-практичний журнал – 2016. – вип.1, Т.1(126). – С.130-136. *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

2. Pavlyuk I. V. Antioxidant Modulation of NO-Dependent Mechanisms of Oxidative Stress Initiation in Brain of Rats Subjected to Chronic Alcohol Intoxication / I. V. Pavlyuk, I. F. Belenichev, L. I. Kucherenko // Biological Markers Guided Therapy. – NIKARI Ltd. – 2016. – Vol. 3, №1. – P. 177-184. *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

3. Павлюк И. В. Сравнительная оценка нейропротективного действия производных L-лизина в условиях острой алкогольной интоксикации / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко // Вісник проблем біології і медицини, Український науково-практичний журнал. – 2016. – Вип.4, Т 1(133). – С. 117-122. *(Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

4. Pavlyuk I. V. Pharmacological effects on oxidative stress NO-dependent mechanisms in the brain under chronic alcohol intoxication: Angiolin antioxidant effects/ I. V. Pavlyuk, I. F. Belenichev, L. I. Kucherenko // *American Scientific Journal*. – 2016. – № 1(11). – P. 85-88 (*Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації*).

5. Павлюк И. В. Фармакокоррекция последствий нейротоксических поражений при тяжелых формах острых отравлений этанолом / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, А. В. Абрамов // «Світ медицини та біології». – 2016. – №4 (58). – С. 93-98. (*Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації*).

6. Павлюк И. В. Фарамакокоррекция Ангиолином нарушений энергетического метаболизма в головном мозге крыс вследствие хронической алкогольной интоксикации / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко // «Світ медицини та біології». – 2017 – № 1 (59). – С. 90-94. (*Особистий внесок дисертанта: виконання частини експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації*).

7. Пат. 106867 Україна, МПК А61К 31/4196 (2006.01), А61Р25/28 (2006.01), А61Р25/32 (2006.01). Спосіб корекції неврологічних порушень при хронічній алкогольній інтоксикації. / І. В. Павлюк, І. Ф. Беленічев, О. О. Нагорна, Л. І. Кучеренко, М. О. Авраменко, І. А. Мазур; заявник ТОВ НВО «Фарматрон». – № а 2014 07033; заявл. 23.06.2014; опубл. 10.10.2014. Бюл. № 19. (*Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних*).

8. Пат. 111462 Україна, МПК А61К 31/4196 (2006.01), А61Р25/28 (2006.01), А61Р25/32 (2006.01). Застосування (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату як активної основи лікарських засобів для профілактики та лікування порушень життєзабезпечуючих функцій ЦНС при важких формах гострого отруєння етанолом. / І. В. Павлюк, Л. І. Кучеренко, І. Ф. Беленічев, І. А. Мазур, О. С. Бідненко; заявник ТОВ НВО «Фарматрон». – № 2016 00367; заявл. 16.01.2016; опубл. 25.04.2016. Бюл. № 8. (*Особистий внесок дисертанта: проведення експерименту, статистична обробка отриманих даних*).

9. Павлюк И. В. Создание метаболитотропных эндотелиопротекторов - фокус на «Ангиолин» / И. В. Павлюк, Н. В. Парнюк, О. И. Беленичева // Первая Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств», Москва, 3-5 июня 2013 г. – Москва, 2013. – С. 13.

10. Павлюк И. В. Молекулярные аспекты нейропротективного действия нового препарата «Ангиолин» при формировании хронической алкогольной интоксикации у крыс. / И. В. Павлюк // *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики*. 2013 р. – Запоріжжя, 2013. – С. 30.

11. Павлюк І. В. Red/Ox – зависимые механизмы нейроапоптоза при депривации системного уровня восстановленного глутатиона *in vitro* HSP₇₀ – опосредованные нейропротективные свойства тиольного антиоксиданта «Ангиолин» / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, И. А. Мазур, Н. В. Парнюк, Н. В. Бухтиярова, Е. В. Однокоз // Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты. Международная конференция молодых ученых и I-V школа им. академика Н.М. Эмануэля 1-4 октября Москва 2013. – С. 272.

12. Павлюк І. В. Влияние Тиоцетама на показатели нитрозирующего стресса в головном мозге животных с хронической алкогольной интоксикацией / И. В. Павлюк, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, И. А. Мазур, Т. В. Кучер // Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» Сборник материалов конгресса. Москва 7-11 апреля 2014 г. Москва, 2014. – С. 206.

13. Павлюк І. В. Влияние Ангиолина на показатели митохондриальной дисфункции головного мозга у крыс после формирования хронической алкогольной интоксикации. / И. В. Павлюк // Тези доповідей «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2016» 12-13 травня 2016 р. – Запоріжжя, 2016. – С. 41.

14. Павлюк І. В. Профилактический и лечебный нейропротективные эффекты таблеток Ангиолин при курсовом введении животным с хронической алкогольной интоксикацией. / И. В. Павлюк, И. А. Мазур, И. Ф. Беленичев, Л. И. Кучеренко, Т. Ю. Винниченко // V Національний з'їзд фармакологів України. 18-20 жовтня 2017 р. – Запоріжжя, 2017. – С. 84.

АНОТАЦІЯ

Павлюк І. В. Нейропротективна дія похідних L-лізину при хронічному алкоголізмі. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ, 2018.

В дисертаційній роботі вперше отримані дані про нейропротективну активність сполук L-лізину - L-лізину гідрохлориду, L-лізину есцинату, N⁶-(1-іміноетил) L-лізину дигідрохлориду, (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетату на моделі ГАІ, дію даного виду активності, спрямовану на зменшення неврологічних порушень, відновлення поведінкових реакцій, а також на зниження оксидативного стресу і нейроапоптозу. Виявлено сполуку з найбільш вираженою нейропротективною активністю - (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат (Ангіолін). Вперше встановлено, що Ангіолін в умовах ХАІ призводить до підвищення щільності ендотеліоцитів судин головного мозку, підвищення експресії ендотеліального фактора росту (VEGF), гальмування оксидативного стресу, підвищення аеробної продукції АТФ, підвищення щільності нейронів СА1-зони гіпокампа, гальмування нейроапоптозу, підвищення експресії антиапоптичного білка bcl-2, підвищення РНК в нейронах СА1-гіпокампа і, як наслідок, зменшення неврологічних і когнітивних порушень у експериментальних тварин.

Ключові слова: алкогольна інтоксикація, нейропротекція, (S)-2,6-діаміногексанової кислоти 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тіоацетат, нейроапоптоз, оксидативний та нітрозуючий стрес, VEGF, bcl-2.

SUMMARY

Pavlyuk I. V. Neuroprotective effect of L-lysine derivatives in chronic alcoholism. - Manuscript.

Thesis for a Candidate degree in biological sciences in specialty 14.03.05 - Pharmacology. - State enterprise "Institute of Pharmacology and Toxicology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, 2018.

The aim of the thesis was to study the neuroprotective properties of L-lysine compounds on the basis of experimentally proved mechanisms of the positive effect of the most active compound on structural and functional disorders of the brain under experimental chronic alcohol intoxication (CAI) to substantiate the objective possibilities of its use as an effective agent with this action.

The compound with the most pronounced neuroprotective activity - (S)-2,6-diaminohexanoic acid 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5 thioacetate (Angiolin), which belongs to the V toxicity class (MLD50 in intragastrically administration to rats -15000±211 mg/kg) was found among the L-lysine hydrochloride of L-lysine aescinat, N⁶- (1- iminoethyl) L-lysine dihydrochloride, (S) -2,6 diaminohexanoic acid 3-methyl-1,2,4-triazolyl -5-thioacetate in acute alcohol intoxication, and its median effective doze (MED50) and median lethal dose (MLD50) were determined.

Course administration of Angiolin intragastrically both within 14 days after the 30-day CAI, and, especially, in parallel formation of the model pathology, led to the normalization of the orienting-research activity, the preservation of a memorable trace in the Conditionally reflexive passive avoidance test. Angiolin significantly reduced the manifestations of neurologic disorders in alcoholized animals: tremor, tail rigidity, chaotic movements in the cell, ptosis, hyperactivity, convulsive muscle contractions from the first days of treatment, and also had an anxiolytic effect.

Course administration of Angiolin intragastrically (100 mg/kg) within 14 days after a 30-day alcohol intoxication, and prophylactically parallel to 30-day alcoholization led to a decrease in oxidative and nitrosative stress - AFH (aldehyde-phenylhydrazones) at 32-46 %% and KPH (ketophenylhydrazones) at 36-43%%, NO stable metabolites at 54-67 %% and NO synthase activity at 59-68 %% , nitrotyrosine at 67-73 %% against an increase in SOD (superoxide dismutase) activity by 160-168 %% , catalase at 248-271%%.

Course administration of Angiolin intragastrically (100 mg/kg) within 14 days after a 30-day alcohol intoxication, and prophylactically parallel to 30-day alcoholization led to the normalization of the oxidative metabolism of the brain - an increase in the ATP (adenosine triphosphate) content by 80-97 %% , malate by 73-82 %% and pyruvate by 31-33 %% , as well as an increase in inhibitory neurotransmitters - GABA by 119-157 %% and glycine by 50-55 %%.

Course administration of Angiolin intragastrically (100 mg/kg) within 14 days after a 30-day alcohol intoxication led to an increase in the density of endotheliocytes

of the capillary net of the brain cortex by 38% and the vascular wall of the brain vessels by 42%, increase in the RNA content in endotheliocytes by 37% and 41%, respectively; increased the density of proliferating endotheliocytes in these vessels by 47% and 142%, respectively, and also to upregulation of Vascular endothelial growth factor (VEGF) in the capillary net and in the brain vessels by 88% and 367% respectively.

Neuroprotective action of Angiolin under CAI aimed to inhibition of oxidative and nitrosative stress, normalization of brain energy metabolism, inhibition of neuroapoptosis in CA1-hippocampus and activation of bcl-2 expression, protection of endothelial brain vessels and upregulation of VEGF, which, in turn, lead to improvement of the neurological status and behavioral responses in experimental animals. The mechanism of this action derived from the ability of metabolite of L-lysine - pipercolic acid to limit transmitting autacoidoses and ability of 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate to activate compensatory mitochondrial-cytosolic energy shunts, to inactivate cytotoxic NO forms, to inhibit NO dependent mechanism of neuroapoptosis and increase the bioavailability of this transmitter. Also, due to the antioxidant properties Angiolin can affect AOS (active oxygen species) and SH-SS-dependent mechanisms of Red/Oxi regulation and transcription, which may cause upregulation of VEGF and the number of cytoprotective proteins.

The studies were carried out and the results confirmed that Angiolin under chronic alcohol intoxication with therapeutic and prophylactic administrations significantly exceeds the reference drug Mildronate according to such parameters of neuroprotective activity as the density of neurons and the proportion of apoptically altered CA-1 neurons of the hippocampal zone, the level of anti-apoptotic bcl-2 protein, concentration of ATP and expression of Vascular endothelial growth factor (VEGF).

2 patents for invention were received in Ukraine based on the study results.

Key words: Angiolin, L-lysine hydrochloride, L-lysine N⁶- (1- iminoethyl) L-lysine dihydrochloride, (S) -2,6-diaminohexanoic acid 3-methyl-1,2,4-triazolyl-5-thioacetate, apoptosis, oxidative stress, antioxidant system depression, inhibitory neurotransmitters deficiency.

АННОТАЦИЯ

Павлюк И. В. Нейропротективное действие производных L-лизина при хроническом алкоголизме. На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.05 - фармакология. - ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», Киев, 2018.

Впервые получены данные о нейропротективной активности соединений L-лизина - L-лизина гидрохлорида, L-лизина эсцината, N⁶- (1-иминоэтил) L-лизина дигидрохлорида, (S) -2,6-диаминогексановой кислоты 3-метил -1,2,4-триазолил-5-тиоацетата на модели ОАИ. Действие данного вида активности направлено на уменьшение неврологических нарушений, восстановление поведенческих реакций, а также на снижение оксидативного стресса и нейроапоптоза. Выявлено соединение с наиболее выраженной

нейропротективной активностью - (S)-2,6-диаминогексановой кислоты 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат (Ангиолин). Установлено, что Ангиолин в условиях ХАИ приводит к повышению плотности эндотелиоцитов сосудов головного мозга, повышению экспрессии эндотелиального фактора роста (VEGF), торможению оксидативного стресса, повышению аэробной продукции АТФ, повышению плотности нейронов СА1-зоны гиппокампа, торможению нейроапоптоза, повышению экспрессии антиапоптотического белка bcl-2, повышению РНК в нейронах СА1-гиппокампа и, как следствие, уменьшению неврологических и когнитивных нарушений у экспериментальных животных.

Ключевые слова: алкогольная интоксикация, нейропротекция, (S)-2,6-диаминогексановой кислоты 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиоацетат, нейроапоптоз, оксидативный и нитрозирующий стресс, VEGF, bcl-2.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АДФ	– аденозиндифосфат
АМФ	– аденозинмонофосфат
АТФ	– аденозинтрифосфат
АФГ	– альдегідфенілгідразон
АФК	– активні форми кисню
ГАІ	– гостра алкогольна інтоксикація
ГАМК	– гамма-аміномасляна кислота
ГДК	– глутаматдекарбоксилаза
ДНК	– дезоксирибонуклеїнова кислота
ЗДМУ	– Запорізький державний медичний університет
ЕД ₅₀	– середня ефективна доза
ІТНП	– індекс тяжкості неврологічних порушень
КФГ	– кетондинітрофенілгідразон
ЛД ₅₀	– середньо смертельна доза
РНК	– рибонуклеїнова кислота
СОД	– супероксиддисмутаза
УРПУ	– умовна реакція пасивного уникнення
ХАІ	– хронічна алкогольна інтоксикація
ЦНС	– центральна нервова система
NOS	– синтаза оксиду азоту
Vcl-2	– антиапоптичний білок
VEGF	– фактор росту ендотелію

Підписано до друку 03.05.2018. Гарнітура TimesNewRoman
Папір друкарський. Формат 60×90 1/16. Умовн. друк. арк. 0,83
Наклад – 100 прим. Замовлення № 7731.
Надруковано з оригінал-макету в типографії
Запорізького державного медичного університету
69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського, 26.