

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

НОСАЧ СВІТЛАНА ГРИГОРІВНА

УДК: 615.21.014.4: 547.857.3

**ЦІЛЕСПРЯМОВАНИЙ ПОШУК НЕЙРОПРОТЕКТИВНИХ СПОЛУК З
АНТИОКСИДАНТНИМ МЕХАНІЗМОМ ДІЇ СЕРЕД ПОХІДНИХ
КСАНТИНІВ**

14.03.05.- фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ–2020

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Запорізькому державному медичному університеті,
м. Запоріжжя

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

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук
Ларіонов Віталій Борисович,
Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського
НАН України, м. Одеса, завідувач лабораторії
фізико-хімічної фармакології

доктор медичних наук, професор
Горчакова Надія Олександрівна,
Національний медичний університет імені О.О.
Богомольця, м. Київ, професор кафедри
фармакології

Захист відбудеться «4» березня 2020р. 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 ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», за адресою: 03057, м. Київ, вул. Антона Цедіка, 14.

Автореферат розісланий « » _____ 2020року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.550.01,
кандидат біологічних наук

І.В. Данова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. На сьогоднішній день судинні захворювання головного мозку продовжують залишатися найважливішою медико-соціальною проблемою сучасного суспільства. Зменшення тривалості життя прямо пов'язано із зростанням числа нейродеструктивних захворювань, які мають місце при соматичних пошкодженнях (гіпоксія, гіпоглікемія, черепно-мозкова травма, мозкові інсульти) [Juan M. Sanchez.,2017; Kasabova-Angelova A,2018]. Ці захворювання знижують і соціальну активність людини. Сучасний арсенал нейропротективної терапії не задовольняє всіх вимог клініцистів. Тому вдосконалення заходів діагностики та лікування нейродеструктивних захворювань – одне з найважливіших завдань сучасної медицини [Черний В.И., 2012; João P., 2016; Беленічев І.Ф., 2018]. Дослідженнями останніх десятиріч встановлено, що однією з ланок патогенезу нейродеструкції головного мозку є гіперпродукція активних форм кисню (супероксидрадикал, гідроксил-радикал, пероксинітрит-аніон, гіпохлорид-аніон тощо) біоенергетичними і нейрохімічними системами клітини, що призводить до окислювальної модифікації і деструкції білків, ліпідів і нуклеїнових кислот. [Губский Ю.И., 2008; Dixon S.J. 2014; Беленічев І.Ф., 2019]. Подібні порушення змінюють білкові та ліпідні фрагменти мембран нейронів, ініціюють апоптичні процеси та розвиток запальних реакцій, погіршують чутливість і специфічність рецепторів, генерацію, створення і провідність нервового імпульсу, порушують синаптичну провідність і, врешті, призводять до розвитку когнітивного дефіциту або загибелі мозку [Szabadfi K., 2014 ;Ванин А.Ф., 2015]. Вищевикладене є обґрунтовуванням застосування як антиоксидантів, так і нейропротекторів з вираженою антиоксидантною дією в терапії нейродеструктивних захворювань. Дослідженнями останніх 35 років проведеними в ЗДМУ і НФАУ була виявлена висока антиоксидантна, кардіопротективна, антингинальна та протиішемічна активності в ряду похідних ксантину [Прийменко Б.А., 1977-2010; Гармаш С.Н., 1983; Самура Б.А., 1982-2014; Тишкин В.С.,1989; Александрова Е.В.,2006-2018; Романенко Н.И.,1982-2018]. Таким чином, пошук нейропротекторів серед похідних ксантиніл-7-ацетатних і ксантиніл-8-тіоацетатних кислот та 3-R-гідроксиметилксантинів є актуальним та перспективним і має теоретичну та практичну значимість.

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-1α-опосередковані механізми ендогенної нейропротекції:

розробка підходів до її фармакологічної регуляції» (№ держ. реєстрації 0117U000658; 2017-2020).

Мета і задачі дослідження: На основі скринінгових дослідів *in vitro* та *in vivo* виявити в ряду похідних ксантину найбільш активну сполуку з антиоксидантною активністю, встановити її нейропротективні властивості, особливості дії та переваги перед референс-препаратами.

Виходячи з поставленої мети були визначені наступні задачі:

1. Провести скринінг антиоксидантної дії *in vitro* в ряду 52 сполук похідних ксантинів 7-ацетатних і ксантиніл-8-тіоацетатних кислот та 3-R-гідроксиметилксантинів. Встановити серед них залежність «структура-дія» і виявити найбільш активну сполуку.

2. Визначити гостру токсичність (ЛД₅₀) та ефективну дозу (ЕД₅₀) сполуки-лідера.

3. Вивчити вплив сполуки-лідера на виживання тварин з двобічною перев'язкою загальних сонних артерій і внутрішньомозкового введення аутокрові та вираженість у них неврологічних порушень за шкалою Р. McGraw.

4. Вивчити вплив сполуки-лідера на показники оксидативного стресу(АФГ, КФГ, нітротирозин), антиоксидантної системи (СОД, каталаза, ГПР) та нітроксидергічної системи (активність NOS, нітрити) при двобічній перев'язці загальних сонних артерій та внутрішньомозковому введенні аутокрові.

5. Вивчити вплив сполуки-лідера на показники енергетичного обміну головного мозку (швидкість відкриття МП, АТФ, АДФ, АМФ, малат, ізоцитрат, лактат, СДГ, НАД-МДГ) при двобічній перев'язці загальних сонних артерій та внутрішньомозковому введенні аутокрові.

6. Вивчити вплив сполуки-лідера на морфо-функціональні показники і апоптоз нейронів та глії IV-V шарів кори головного мозку при двобічній перев'язці загальних сонних артерій та внутрішньомозковому введенні аутокрові.

Об'єкт дослідження: фармакологічна корекція гострого порушення мозкового кровообігу.

Предмет дослідження: антиоксидантна та нейропротективна активність похідних ксантиніл-7-ацетатних і ксантиніл-8-тіоацетатних кислот та 3-R-гідроксиметилксантинів.

Методи дослідження: фармакологічні, біохімічні, морфометричні, імуноферментні, гісто-імуно-хімічні, методи математичної статистики і системного аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше отримані результати про антиоксидантну активність 52 сполук похідних ксантиніл-7-ацетатних і ксантиніл-8-тіоацетатних кислот, та 3-R-гідроксиметилксантинів. Визначено, що гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-ацетатної кислоти (С-3) в дослідях *in vitro*(за інгібуванням NO, за інгібуванням окислювальної модифікації білка, та за інгібуванням Fe²⁺-залежного ВРО) за силою

антиоксидантної активності перевершує референс-препарати (тіотриазолін, дибунол і N-ацетилцистеїн).

Вперше на моделях ГПМК (двобічній перев'язці загальних сонних артерій та внутрішньомозковому введенні аутокрові) встановлена нейропротективна активність С-3, дія якої спрямована на гальмування оксидативного нітрозуючого стресу, нейроапоптозу, підвищення щільності нейронів IV-V шарів кори головного мозку, активність антиоксидантних ферментів, активацію компенсаторних шунтів продукції АТФ, як наслідок, зменшення летальності та неврологічних порушень у експериментальних тварин. Встановлено перевагу С-3 перед тіотриазоліном, цитиколіном і мексидолом.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати експериментального дослідження нейропротективної сполуки гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-ацетатної кислоти яка є обґрунтуванням для подальшого поглибленого дослідження сполуки в якості потенціального лікарського препарату для комплексної терапії мозкових інсультів. Показана перспективність пошуку нових антиоксидантів і нейропротекторів в ряду похідних ксантініл-7-ацетатних и ксантініл-8-тіоацетатних кислот та 3-R-гідроксиметилксантінів.

Новизна досліджень підтверджена патентами України. Результати дослідження впровадженні в педагогічний процес і наукову роботу кафедри фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету, Дніпропетровської державної медичної академії, Буковинського державного медичного університету, кафедри загальної та медичної фармакології Одеського національного медичного університету, кафедри фармакології та медичної рецептури Харківського національного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно проведений патентно-інформаційний пошук та аналіз наукової літератури за даною темою. Робота виконана на базі Навчального медико-лабораторного центру ЗДМУ атестованого МОЗ України № 033/18 (керівник - 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, самостійно дисертантом виконана експериментальна частина дисертації, опановані і відтворені моделі гострого порушення мозкового кровообігу та внутрішньомозкового крововиливу. Самостійно проведено скринінг серед 52 сполук з антиоксидантною активністю серед похідних ксантинів *in vitro*. Також дисертантом самостійно виконані імуноферментні, біохімічні, морфометричні методи дослідження та проведено порівняльний аналіз результатів, а також статистична обробка експериментальних даних.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та висновки дисертаційної роботи оприлюднені та обговорені на: Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Церебральна недостатність:

морфогенез, нейропротекція та інтенсивна терапія» (м.Запоріжжя, 2012); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Церебральна недостатність: морфогенез, нейропротекція та інтенсивна терапія» (м.Запоріжжя, 2012); Восьмій міжнародній науково-практичній конференції «Розвиток наукових досліджень 2012» (м.Полтава 2012); Всеросійській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фармакологическая нейропротекция» (Санкт-Петербург 2013); 73Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації - 2013» (м.Запоріжжя 2013); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації - 2014» (м.Запоріжжя 2014); The Ukrainian 2014; Восьмій національній науково-практичній конференції з міжнародною участю «Активные формы кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека» (м.Смоленск 2014); XXVIIth International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function with PET (Vancouver, Canada 2015); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я-2016» (м.Запоріжжя); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю, пам'яті професора В.В.Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології» (м.Запоріжжя-2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації-2016» (м.Запоріжжя-2016); Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвячена дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації-2017» (м.Запоріжжя-2017); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині» (м.Запоріжжя-2019).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 26 наукових робіт, у тому числі 7 статей у фахових журналах України, 19 тез у матеріалах з'їздів, конгресів та конференцій з міжнародною участю. Одержано 2 патенти України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота викладена на 224 сторінках друкованого тексту та складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, 6 розділів досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Робота проілюстрована 14 рисунками, 37 таблицями. Список використаних джерел містить 292 найменування, з них 192 кирилицею, 100 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи. Для досліджень антиоксидантних властивостей було обрано 52 органічні сполуки, похідні ксантиніл-7-ацетатних і ксантиніл-8-тіоацетатних кислот та 3-R-гідроксиметилксантинів, синтезованих на

кафедрі біохімічної хімії ЗГМУ під керівництвом проф. Е.В.Александрової. У наших дослідженнях застосовували методи оцінки антиоксидантної активності (АОА) сполук *in vitro*, які відрізняються за механізмом ініціації вільнорадикальних процесів, субстратами окислення і маркерними продуктами. АОА сполук при неферментативному ініціюванні ВРО тестували за ступенем зниження МДА в суспензії яєчних ліпопротеїдів при додаванні солей Fe^{2+} . АОА сполук при інгібуванні NO тестували за ступенем гальмування окиснення аскорбінової кислоти при 265нм. Індукцію NO проводили опроміненням водних розчинів нітрит нітропрусида (10мМ) і аскорбінової кислоти (40мМ) перед джерелом світла (300 Вт) з довжиною хвилі 425нм [Губський Ю.І. 2002; Чекман І.С., 2016]. АОА сполук за інгібуванні окисної модифікації білка, викликаного реактивом Фентона, оцінювали за ступенем інгібування утворення 2,4-динітрофенілгідрозонів альдегідних і карбоксильних груп [Губський Ю.І. 2002; Чекман І.С., 2016]. Визначення АОА сполук в умовах «нітрозуючого стресу» оцінювали за ступенем інгібування утворення 2,4-динітрофенілгідрозонів альдегідних і карбоксильних груп і за підвищенням активності СОД у супернатанті головного мозку білих щурів. Для моделювання нітрозуючого стресу використовували динітрозольний комплекс заліза (II) -цистеїна (DNIC) [Губський Ю.І. 2002; Чекман І.С., 2016]. Всі досліджувані речовини і референс-препарати вводили в інкубаційну систему в концентраціях, відповідних їх молекулярним масам. Експериментальну частину роботи виконували на 453 білих безпорідних щурах масою 190-240 г, отриманих з розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України». При догляді за тваринами, харчування та проведення експериментів керувались базисними нормативними документами: рекомендаціями комітету з біоетики МОЗ України з експериментальної роботи та використання 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. ГПМК моделювали шляхом незворотньої двобічної окклюдії загальних сонних артерій. [McGrawC.P., 1975; Чекман І.С., 2016].

Внутрішньомозковий крововилив ВК моделювали шляхом введення 0,1 мл аутокрові, узяті із хвостової вени, на 100 гр ваги тварини в область внутрішньої капсули і стріопалідарних ядер головного мозку тварини з використанням стереотаксичної техніки [Ярош О.К., 2005; Grotta J.C, 2007]. Визначення гострої токсичності найбільш активної сполуки проводили за методом Кербера в модифікації А.О. Лойт и М.Ф. Савченкова. Визначення ефективної дози найбільш активної сполуки проводили на моделі однібічної окклюдії загальної сонної артерії. Досліджувану сполуку і препарати порівняння вводили протягом 4 та 18 діб один раз на добу у відповідних дозах - найбільш активну сполуку (С-3, гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-ацетатної кислоти) в експериментально обґрунтованій дозі 100мг/кг; тіотриазолін 50 мг/кг (100 мг таблетки ПАТ «Київмедпрепарат») [Чекман

И.С., 2014], мексидол 200 мг/кг (125 мг таблетки, «НПК Фармасофт») [С.К. Акшулаков С.К., 2006]; цитіколін 100 мг/кг (500 мг таблетки, «ТОВ Астрафарм») [Secades J. J., 2016]. Для оцінки порушення поведінки і стану тварин після експериментального ГПМК (при двобічній перев'язці загальних сонних артерій та внутрішньомозковому введенні аутокрові) визначали щодня тяжкість неврологічного порушення у балах за шкалою stroke-index С.Р. McGraw, а також реєстрували загибель та розраховували відсоток летальності тварин. [McGraw С.Р., 1977; 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 та гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища при (2° С), що містить (в ммоль): сахароза - 250, трис-НСІ-буфер - 20, ЕДТА - 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° С. Для оцінки енергетичних ресурсів у тканині головного мозку визначався вміст аденілових нуклеотидів; спрямованість та інтенсивність гліколізу оцінювали за рівнем лактату; окислення в циклі Кребса визначали за вмістом малату [Hohorst Н.Ж., 1970; Чекман І.С., 2016], ізоцитрату та активністю сукцинатдегідрогенази та НАДН-малатдегідрогенази [Lundblad R. L., 2010; Чекман І.С., 2016]. Функціональний стан мітохондрій оцінювали фотометрично на спектрофотометрі Libra S 32 РС по відкриванню мітохондріальної пори (МП) [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) [Halliwell В, 1999; 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 знаходиться стехіометричне окислення НАДФН в процесі реакції утворення NO із L-аргініну [Чекман І.С., 2016]. Визначення активності супероксиддисмутази, каталази і глутатіонпероксидази проводили спектрофотометрично [Чевари С.И. 1988; Чекман І. С., 2016]. Нітротирозин визначали твердофазним імуносорбентним сендвіч - методом ELISA, ELISA Kit (Cat. № НК 501-02) на повноплашковому імуноферментному аналізаторі (SIRIO S, Італія). Для дослідження морфофункціонального стану нейронів на ротаційному мікротомі виготовляли зрізи IV-V шарів сенсомоторної зони фронтальної кори товщиною 5 мікрон. Зрізи депарафінували і фарбували галоціонін хромовими галунами по Ейнарсону для специфічного виявлення РНК. Морфометричні дослідження проводили на мікроскопі Axioskop (Zeiss, Германия). Для визначення експресії c-fos білка в області IV-V шарів кори було використано імуногістохімічний метод непрямої імунофлюоресценції.

Статистична обробка даних наукових досліджень проводилась з використанням пакету програм «STATISTICA® for Windows 6.0»

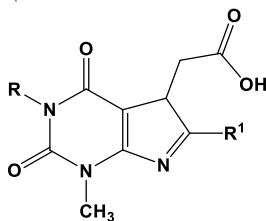
(StatSoftInc., №AXXR712D833214FAN5), а також «SPSS 16.0», «Microsoft Office Excell 2003». Перед застосуванням статистичних критеріїв проводилася перевірка гіпотези про нормальний закон розподілу випадкових величин (за критерієм Shapiro-Wilk та Колмогорова-Смірнова). За умов нормального розподілу встановлення достовірності міжгрупових відмінностей по отриманим даним експериментів проводилося за допомогою параметричного t-критерію Стьюдента. У випадку, коли дані не відповідали законам нормального розподілу, порівняльний аналіз проводили за допомогою непараметричного *U* - критерію Мана-Уїтні. Порівняння груп за якісною ознакою проводили за допомогою критерію χ^2 з аналізом таблиць спряженості. Для порівняння незалежних змінних у 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.

Пошук АОА *in vitro* проводили серед 52 сполук похідних ксантиніл-7-ацетатних і ксантиніл-8-тіоацетатних кислот та 3-*R*-гідроксиметилксантинів (рис.1), синтезованих на кафедрі біологічної хімії ЗГМУ під керівництвом проф. К.В.Александрової.

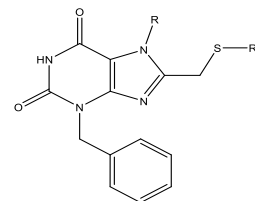
похідні ксантиніл-

7-ацетатних кислот



похідні ксантиніл-

8-метилтіоацетатних кислот



похідні 3-*R*-гідроксиметилксантинів

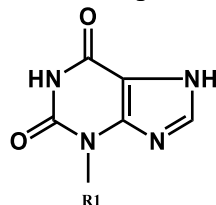


Рис.1. Структурні формули похідних ксантину

Фармакологічним скринінгом АОА *in vitro* серед 52 сполук похідних ксантину виявлено найбільш активну сполуку під шифром С-3 - гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-ацетатної кислоти, що показав найбільш виразні властивості на всіх трьох моделях та може виступати в ролі протектора СОД. За силою АОА сполука С-3 достовірно перевищує ацетилцистеїн, дибунол, емоксипін. При аналізі одержаних результатів можемо зробити висновок, що на АОА досліджуваних сполук впливає природа замісників в положеннях 7

та 8. [Губський Ю.І. 2002; Чекман І.С., 2016]. Найбільш вираженою АОА володіли сполуки, що містять в 8 положенні вторинну аміногрупу, що дає можливість пов'язувати NO з утворенням відповідних N-нітрозозамінів. Також на АОА досліджуваних сполук впливає наявність іліденгідразинового фрагменту в молекулі, який за рахунок $C = N$ зв'язку надає їм властивості «спінової» пастки NO. ЛД₅₀ сполуки С-3 при внутрішньошлунковому введенні щурам, складає $2100 \pm 142,8$ мг/кг (IV класу токсичності). На моделі ГПМК встановлена ефективна доза С-3 при внутрішньошлунковому введенні 100 мг/кг. Курсове введення С-3 (100 мг/кг) щурам з перев'язкою загальних сонних артерій і ВК привело до зниження летальності на 62% і на 55%. Сполука С-3 значно зменшувала прояви неврологічних порушень у тварин з ГПМК: птоз, тремор, кругові рухи, парези, паралічі. Так, сполука С-3 знижувала неврологічний дефіцит (на 11-12,4 балів по McGraw С.Р.) ($p \leq 0,05$).

Таблиця 1

Вплив С-3, тіотриазоліну, мексидола і цитіколіну на біохімічні показники нейродеструкції в мозку щурів на 4-ту добу після двобічної перев'язки загальних сонних артерій

Групи тварин	Нітрогирозин, нмоль/г білка	НАДН-МДГ мкмоль/мг/хв	СОД, у.о./мг білка/хв	NOS, нмоль/мг білка/хв	АТФ, мкмоль/г тканини	Відкриття пори циклоспорин-А-чутливе поглинання
1	2	3	4	5	6	7
ХО, n=10	23,7±1,12	1,77±0,10	288,7 ± 17,2	2,23 ± 0,15	2,01±0,12	0,018 ± 0,001
ОНМК (контроль) n=14	147,3±8,3	0,88±0,03	93,7 ± 7,11	7,23 ± 0,57	1,07±0,07	0,146 ± 0,012
ОНМК + тіотриазолін (50 мг/кг) n=14	72,2±4,2*	1,75 ± 0,07*	298,4 ± 18,8*	5,12 ± 0,33	1,52±0,07*	0,053 ± 0,002*
ОНМК + мексидол (200 мг/кг) n=14	106,2±9,7*	1,12 ± 0,08	177,8 ± 9,8*	6,45± 0,57	1,33±0,12	0,072 ± 0,005*
ОНМК + цитіколін (100 мг/кг) n=10	138,6±12,2	0,091 ± 0,04	119,3 ± 10,1	4,88 ± 0,21*	1,22 ± 0,01*	0,117 ± 0,006*
ОНМК + С-3 (100 мг/кг) n=16	64,2±5,7* ^{2,3}	1,82 ± 0,12* ^{2,3}	322,3±18,7* ^{2,3}	4,14 ± 0,28* ²	1,82±0,05* ^{2,3}	0,042± 0,003* ^{2,3}

Примітки: *— $p < 0,05$ С-3 відповідно до контрольної групи, ¹— $p < 0,05$ С-3 відповідно до групи, яка отримувала тіотриазолін, ²— $p < 0,05$ С-3 відповідно до групи, яка отримувала мексидол, ³— $p < 0,05$ відповідно до групи, яка отримувала цитіколін.

Моделювання ГПМК призводить до збільшення продукції АФК та ініціації оксидативного стресу. Вільні радикали і стабільні цитотоксичні

продукти оксидативного стресу в нервовій тканині в умовах ішемії призводять до десенситизації рецепторів, мітохондріальної дисфункції втрати нейроном функціональної активності. Нами були отримані дані, які свідчать про те, що у головному мозку тварин з ГПМК на 4-ту добу після операції спостерігалось збільшення в головному мозку продуктів окисної модифікації білка (ОМБ) – АФГ на 85,6% і КФГ на 85,4%, а також специфічного маркера нітрозуючого стресу - нітротирозина на 84%(табл. 1). Призначення сполуки С-3 тваринам з перев'язкою загальних сонних артерій призвело до зниження рівня маркерів оксидативного стресу - АФГ і КФГ на 49 % і 65 %, нітротирозина на 53% на фоні підвищення активності СОД на 243% і НАДН-МДГ на 106,8% (Табл.1). Активація окисної продукції енергії під дією С-3 забезпечувало підвищення рівня АТФ у головному мозку тварин з ГПМК на 70 %, на тлі підвищення рівня АДФ на 108% та зниження рівня АМФ на 55% по відношенню до контролю ($p < 0,05$). Також при введенні дослідної сполуки С-3 було помітне зменшення відкриття мітохондріальної пори, а саме зниження на 71%, це свідчить про ефективний бар'єр розвитку порушення функцій мітохондріальних мембран.

Введення сполуки С-3 призводить до нормалізації порушень нітроксидергічної системи головного мозку при відтворенні моделі ВК – зменшення активності NOS на 47%, вмісту нітритів на 47,5%, нітротирозину на 37% ($p < 0,05$) (Табл.2). Відомо, що при ГПМК $ONOO^-$ і OH^- беруть участь в окисній модифікації тирозинкінази, СОД та інших ферментів, які беруть участь в утилізації глутамату в астроглії, модифікують bcl-2, знижуючи його функції, а надлишок NO підсилює синтез проапоптотичних білків FAS і APO-1.

Антиоксидантний механізм є домінуючим в нейропротективній дії сполуки С-3 та забезпечується здатністю його структури виступати у якості спінової пастки NO і, тим самим, гальмувати NO-залежні механізми пошкодження ферментів (в т.ч. СОД, СДГ і т.д), мембран і мітохондрій, експресію проапоптотичних факторів [Ванин А. Ф., 2011; Беленичев И.Ф., 2018]. Показана здатність С-3 виступати в ролі протектора СОД в нейронах, що може призвести до підвищення їх стійкості до ішемії [Belenichev I.F.2018]. За вираженістю антиоксидантної дії С-3 перевершує тіотриазолін, мексидол та цитиколін.

Моделювання ГПМК призводить до дискоординації в циклі Кребса, некомпенсаторної активації гліколізу і енергодефіциту. Гіперпродукція АФК і NO при ішемії призводить до модифікації білкових структур мітохондріальної пори, підвищенню її проникнення, виходу в цитозоль проапоптотичних білків та формування дисфункції мітохондрій [Беленичев И.Ф; Павлов С. В., 2015]. Призначення сполуки С-3 тваринам з перев'язкою загальних сонних артерій и ВК призводило до підвищення АТФ на 70% і 50% , АДФ на 108% і 18%, та зниження АМФ на 55% і 25%, підвищення малату на 130% і 100%, ізоцитрату на 54% і 76%, СДГ на 80% і 56%, НАД-МДГ на 106% і 109%($p < 0,05$) і зниження лактату на 47% і 35% ($p < 0,05$). Також сполука С-3 зменшує швидкість відкриття пори мітохондрій головного мозку

на 71% і 74% ($p < 0,05$) (Табл.2). Механізм енерготропної дії С-3 реалізується за рахунок антиоксидантних властивостей і зменшення NO-пошкодження мітохондрій і збереження її функціональної активності, а також за рахунок активації компенсаторних шляхів синтезу АТФ. За силою енерготропної дії С-3 перевершує тіотриазолін, мексидол та цитіколін.

Таблиця 2

Вплив С-3, тіотриазоліну, мексидола і цитіколіну на біохімічні показники нейродеструкції в мозку щурів на 4-ту добу після ВК

Групи тварин	Нитрогирозин, нмоль/г білка	НАДН-МДГ мкмоль/г ткани/хв	СОД, у.о./мг білка/хв	NOS, нмоль/мг білка/хв	АТФ, мкмоль/г ткани	Відкриття пори (циклоспорин-А-чутливе поглинання)
1	2	3	4	5	6	7
ХО, n=10	21,3±1,34	1,75±0,12	292,7 ± 12,6	2,77 ± 0,21	2,83 ± 0,03	0,017 ± 0,001
ВК(контроль) n=10	112,3±7,21	0,91±0,05	123,6 ± 7,2	6,45 ± 0,37	1,73 ± 0,01	0,121± 0,01
ВК + тіотриазолін (50 мг/кг) n=10	68,7±4,21*	1,87 ± 0,09*	237,3 ± 17,2*	4,17 ± 0,33*	2,47 ± 0,01*	0,044± 0,003*
ВК + мексидол (200 мг/кг) n=11	78,7±5,65*	1,65 ± 0,06*	191,5 ± 9,71*	5,13 ± 0,45	2,44± 0,02*	0,054± 0,004*
ВК + цитіколін (100 мг/кг) n=11	87,4±7,22*	1,11 ± 0,05	134,8 ± 15,1	6,11 ± 0,45	2,12 ± 0,01*	0,087± 0,007*
ВК + С-3 (100 мг/кг) n=12	54,9±4,2* ^{1,2,3}	1,91 ± 0,11* ^{2,3}	241,8 ± 12,1* ^{2,3}	3,38 ± 0,14* ^{1,2,3}	2,61 ± 0,01* ^{1,2,3}	0,031± 0,002* ^{1,2,3}

Примітки: *— $p < 0,05$ С-3 відповідно до контрольної групи, ¹— $p < 0,05$ С-3 відповідно до групи, яка отримувала тіотриазолін, ²— $p < 0,05$ С-3 відповідно до групи, яка отримувала мексидол, ³— $p < 0,05$ відповідно до групи, яка отримувала цитіколін.

Проведені нами морфометричні дослідження на 4-18 добу після двобічної перев'язки загальних сонних артерій та ВК показало виражені нейродеструктивні зміни в головному мозку експериментальних тварин. Моделювання ГПМК призводило до достовірного зменшення щільності нейронів в корі порівняно з інтактними тваринами. При цьому відзначалося достовірне зменшення площі тіл нейронів і зниження в них вмісту РНК та підвищення щільності апоптотичних клітин у порівнянні з інтактними тваринами. ГПМК істотно не впливало на щільність гліальних клітин в корі головного мозку, але викликала достовірне збільшення площі гліоцитів з підвищенням в них вмісту РНК. Це свідчило про компенсаторне підвищення

функціонального стану гліоцитів у відповідь на ішемічне ураження мозку. Варто відзначити, що уже на 4 ту добу експериментальної терапії сполукою С-3 щільність і площа нейронів збільшилась ($p < 0,05$) стосовно до контролю у 20% і 8,3% відповідно, а концентрація РНК на 28% (табл. 3).

Таблиця 3

Вплив С-3, тіотриазоліну, мексидола і цитіколіну на морфо-функціональні показники нейронів IV-V шарів кори головного мозку щурів з двобічної перев'язки загальних сонних артерій

Групи тварин	Щільність нейронів, клітин/мм ²	Вміст РНК в нейронах, Еоп	Щільність апоптотичних клітин на 1 мм ²	
	4-доба	4-доба	4-доба	18-доба
ХО, n=10	1281±34	11,17±0,12	107±9	110 ± 7
Ішемія (контроль) n=14	1065±27	9,69 ±0,15	294±18	287 ± 18
Ішемія+тіотриазолін (50 мг/кг) n=14	1081 ± 29	11,26±0,16*	162±16*	112 ± 10*
Ішемія + мексидол (200 мг/кг) n=14	1182 ±24*	11,76±0,11*	174±11*	128 ± 13*
Ішемія + цитіколін (100 мг/кг) n=10	1069 ± 38	11,37±0,8*	438±29*	153 ± 18*
Ішемія+С-3 (100 мг/кг) n=16	1278 ±17* ^{1,2,3}	12,4±0,2* ^{1,2,3}	149 ±5* ^{1,2,3}	107 ± 9* ^{2,3}

Примітки: *— $p < 0,05$ С-3 відповідно до контрольної групи, ¹— $p < 0,05$ С-3 відповідно до групи, яка отримувала тіотриазолін, ²— $p < 0,05$ С-3 відповідно до групи, яка отримувала мексидол, ³— $p < 0,05$ відповідно до групи, яка отримувала цитіколін.

Важливим моментом нейропротективної дії сполуки С-3 є зниження щільності апоптотичних клітин на 49,3 % та на 62,7 % на 4-ту та 18-ту добу. С-3 показує позитивний вплив на морфо-функціональні показники нейронів і глії IV-V шарів кори головного мозку щурів при ВК. Введення сполуки С-3 призводить до підвищення щільності нейронів на 10 %, площі нейронів на 9% ($p < 0,05$), а також до підвищення вмісту РНК на 34% на 4-ту добу після ВК і до зменшення щільності апоптотичних нейронів на 14,6% 43,3% відповідно на 4 і 18-у добу після перев'язки ($p < 0,05$) (табл. 4).

Вплив С-3, тіотриазоліну, мексидола і цитіколіну на морфо-функціональні показники нейронів IV-V шарів кори головного мозку щурів з ВК

Групи тварин	Щільність нейронів, клітин/мм ²	Вміст РНК в нейронах, Еоп	Щільність апоптотичних клітин на 1 мм ²	
	4-доба	4-доба	4-доба	18-доба
ХО, n=10	1276 ± 11	11,87 ± 0,11	81 ± 7	82 ± 9
ВК (контроль) n=10	1087 ± 11	8,77 ± 0,07	144 ± 11	157 ± 11
ВК + тіотриазолін (50 мг/кг) n=10	1127 ± 7*	11,33 ± 0,12*	132 ± 5*	102 ± 10*
ВК + мексидол (200 мг/кг) n=11	1123 ± 8*	9,97 ± 0,14*	130 ± 7*	120 ± 11*
ВК + цитіколін (100 мг/кг) n=11	1092 ± 9	9,71 ± 0,02*	143 ± 14	131 ± 10*
ВК + С-3 (100 мг/кг) n=12	1197 ± 5* ^{1,2,3}	11,76 ± 0,11* ^{2,3}	123 ± 4* ^{1,3}	89 ± 6* ^{1,2,3}

Примітки: *— $p < 0,05$ С-3 відповідно до контрольної групи, ¹— $p < 0,05$ С-3 відповідно до групи, яка отримувала тіотриазолін, ²— $p < 0,05$ С-3 відповідно до групи, яка отримувала мексидол, ³— $p < 0,05$ відповідно до групи, яка отримувала цитіколін.

Також С-3 підвищує площу гліальних клітин на 10% і 14% ($p < 0,05$) відповідно моделям ГПМК на 4-ту добу і вміст в них РНК на 2.96% і 4.46% 18-ту добу ($p < 0,05$). Підвищення РНК в нейронах і глії під дією сполуки С-3 свідчить про зростання функціональної активності клітин, активації генів і синтезу білка. [Абрамов А.В., 2008]. У сполуки С-3 виявлена здатність підвищувати експресію гена *c-fos* в умовах церебральної ішемії (підвищення щільності *c-fos*-позитивних нейронів в 1.5- 1.1 рази на 4-ту добу відповідно моделям ГПМК і в 1.6- .0.9 рази на 18-ту добу) ($p < 0,05$). За ступенем впливу на морфо-функціональні показники нейронів і глії кори головного мозку сполука С-3 перевершує тіотриазолін, мексидол та цитіколін.

Нейропротективна дія С-3 в умовах ГПМК спрямована на гальмування нітрозуючого та оксидативного стресу, зниження загибелі нейронів кори головного мозку, підвищення продукції АТФ мітохондріально-цитозольними шунтами і, як наслідок, на зменшення летальності та неврологічних порушень у експериментальних тварин. В основі нейропротективної дії С-3 лежить його антиоксидантний механізм, а саме: здатність зв'язувати NO і тим самим переривати АФК-залежні механізми нейроапоптозу, порушення енергопродукуючої функції мітохондрій і пошкодження СОД. Отримані результати є експериментальним обґрунтуванням для подальшого вивчення

сполуки С-3 з метою створення на її основі нейропротективного препарату для лікування мозкових інсультів.

ВИСНОВКИ

В дисертації, присвяченій актуальній задачі сучасної фармакології, створення ефективних медикаментозних засобів для лікування гострих порушень мозкового кровообігу на основі проведених дослідів *in vitro* і *in vivo* в ряду похідних 3-алкіл (арил, аралкіл) ксантину експериментально обґрунтована доцільність застосування після закінчення доклінічних та клінічних досліджень гідразиду 8-бензиламінотеофілініл-7-оцтової кислоти (сполука С-3) в якості нейропротектора з антиоксидантним механізмом дії.

1. У скринінгових дослідженнях *in vitro* серед 52 похідних 3-алкіл (арил, аралкіл) ксантину виділено сполуку - гідразид 8-бензиламінотеофілініл-7-оцтової кислоти (С-3), яка за силою антиоксидантної дії перевершує референтні препарати - N-ацетилцистеїн, емоксипін і при внутрішньошлунковому введенні щурам відноситься до IV класу токсичності.

2. Аналіз взаємозв'язку «структура - дія» серед 52 похідних 3-алкіл (арил) ксантину показав, що наявність і сила антиоксидантної активності залежить від характеру замісника в положенні 7 і 8 ксантинового біциклу. Так, найбільш активною серед досліджуваних сполук була група 8-амінозамещених гідразидів ксантинами-7-ацетатних кислот.

3. Внутрішньошлункове введення С-3 в експериментально обґрунтованій дозі (100 мг/кг) протягом 18 діб щурам з двобічною оклюзією сонних артерій і ВК призводило до зниження летальності тварин в гострий період на 62%, зменшення неврологічного дефіциту (на 11-12,4 балів за шкалою С.Р. McGraw).

4. Введення С-3 тваринам з двобічною оклюзією сонних артерій і ВК приводило до поліпшення морфо-функціональних показників нейронів сенсомоторної зони кори на 4-ту добу експерименту (підвищення щільності на (20% і 10%), збільшення РНК на (28%-34%), зменшення кількості апоптичних і некротично змінених клітин на 4-у добу на (49,3% і 14,6 %) і на 18 добу на (62,7% і 43,3%) , підвищення с-Fos-позитивних клітин на 18 добу в 1,6-0.9 рази.

5. Введення С-3 щурам з двобічною оклюзією сонних артерій і ВК призводило на 4-ту добу експерименту до гальмування оксидативного і нітрозативного стресу - зниження рівня нітротирозину на (53,7%-37,2%), АФГ на (49.4%-59%), КФГ на (66%-63%), нітрит-аніону на (63%-47%), на тлі підвищення активності антиоксидантних ферментів - СОД на (243%-95%), каталази на (147%-78%), і ГПР на (121%-82%), в головному мозку.

6. Введення С-3 щурам з двобічною оклюзією сонних артерій і ВК призводило на 4-ту добу експерименту до позитивних змін показників енергетичного метаболізму головного мозку - збільшувало рівень АТФ на

(70%-50%), малата на (130%-100%), знижувало рівень лактату на (47%-35%), на тлі підвищення активності МДГ на (107%-109%), СДГ на 80%-56%.

7. За силою нейропротективної активності сполука С-3 перевершує цитиколін і мексидол (щодо зниження нітротирозину, АФГ, нейроапоптозу, підвищення щільності нейронів, АТФ, малата, МДГ, СОД і каталази) і тіотриазолін (щодо підвищення АТФ, щільності нейронів, гальмування відкриття МП).

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Носач С.Г. Новые производные 3-бензил ксантина как возможные модуляторы уровня оксида азота. / Дьячков М.В., Шкода А.С., Александрова Е.В., Беленичев И.Ф., Носач С.Г. // Вестник новых медицинских технологий. - 2013. Т. XX, №2. С. 386–388. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації).*

2. Носач С.Г. Изучение кардиопротективных свойств новых производных 3-бензилксантина (соединений А-10, А-12 И А148). / Шкода А.С., Дьячков М.В., Александрова Е.В., Беленичев И.Ф., Носач С.Г. // Вестник новых медицинских технологий. - 2013. Т. XX, №3. С.114–116. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації).*

3. Носач С.Г. Пошук нейропротекторів з енерготропними властивостями в ряду похідних ксантину. / Александрова Е.В., Беленичев И.Ф., Левіч С.В., Юрченко Д.М., Шкода О.С. Носач С.Г. // Медична хімія.- 2014. Т. 16, №4 (61). С. 85 – 88. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації).*

4. Svitlana G. Nosach New xanthine derivative B-YR-2 as antioxidant modulator of post-stroke damage of sensorimotor cortex neurons in rats. / Igor F. Belenichev, Katherine V. Aleksandrova, Svitlana G. Nosach, Sergey V. Levich, Darja M. Yurchenko, Andrey V. Abramov, Nina V. Buchtiayarova, Elina V. Suprun // Elixir Pharmacy 76 (2014).- P.28286-28292. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації).*

5. Носач С.Г. Влияние производного ксантина –соединения С-3 на морфофункциональные показатели нейронов сенсомоторной зоны коры головного мозга при моделировании внутримозгового кровоизлияния. / Носач С.Г., Беленичев И.Ф., Шкода А.С., Александрова Е.В. // Фармакологія та лікарська токсикологія. - 2015. №2 (43). С.37–42. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації).*

6. Носач С.Г. Антиоксидантний механізм нейропротективного действия производного 3-метилксантина (соединения С-3) в условиях внутримозгового кровоизлияния. / Носач С.Г., Беленичев И.Ф., Александрова Е.В., Левич С.В., Рыженко В.П. // Фармакологія та лікарська токсикологія. - 2016. №1 (47). С. 31–38. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення результатів, підготовка статті до публікації).*

7. S.G. Nosach Some Aspects of Neuroprotective Action of a New Derivative of 3-Methylxanthine (Compound C-3) Under Conditions of Acute Disorder of Cerebral Circulation (ADCC) Modeling by Ischemic Stroke Type./ I.F. Belenichev, S.G. Nosach, I.B. Samura and S.V. Levich // Biological Markers and Guided Therapy, Articles in Press in Vol. 5, 2018, no. 1, P. 63 – 73. *(Особистий внесок: набір матеріалу, виконання експериментальних досліджень, узагальнення та статистична обробка результатів, підготовка статті до публікації).*

8. Патент України на корисну модель № 82191 (51) МПК С07D 473/00 (2013.01). Водорозчинні солі 3-бензил(феніл)-8-гідроксиметилксантинів, які виявляють антиоксидантну дію. / Дячков М.В., Шкода О.С., Александрова К.В., Беленичев І.Ф., Носач С.Г. заявник Запорізький державний медичний університет. –№ u 201301306 заявл.04.02.2013. публ.25.07.2013, Бюл. № 14. *Внесок дисертанта: участь в проведенні експериментальної частини роботи, аналіз літературних джерел.*

9. Патент України на корисну модель № 86772 (51) МПК С07D 473/00 (2013.01). Н-пропіловий естер 3-бензил-7-(2-оксо-2-фінелетил)-ксантиніл-8-метилацетатної кислоти, який виявляє антиоксидантну дію. / Дячков М.В., Шкода О.С., Александрова К.В., Беленичев І.Ф., Носач С.Г. заявник Запорізький державний медичний університет. –№ u 201308688 заявл. 10.07.2013; публ.10.01.2014. Бюл.№1. *Внесок дисертанта: участь в проведенні експериментальної частини роботи, аналіз літературних джерел.*

10. Носач С.Г Модуляція нітросидергічної системи у дослідях *in vitro* різними концентраціями 3-арил(аралкіл)-8-гідроксиметилксантинів. / Александрова К.В., Беленичев І.Ф., Дячков М.В., Бухтіярова Н.В., Шкода О.С., Носач С.Г., Білоконь Л.Є. // Патологія / Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Церебральна недостатність: морфогенез, нейропротекція та інтенсивна терапія», (11-12 жовтня 2012, Запоріжжя). Запоріжжя, 2012. (26) С .118.

11. Носач С.Г Поетапний скринінг сполук нейропротективної активності серед ксантиніл-7-ацетатних кислот та їх функціональних похідних. / Александрова К.В., Юрченко Д.М., Беленичев І.Ф., Бухтіярова Н.В., Носач С.Г., Макоїд О.Б., Біленький С.А. // Патологія / Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Церебральна

недостатність: морфогенез, нейропротекція та інтенсивна терапія – 2012», (11-12 жовтня 2012, Запоріжжя). Запоріжжя, 2012. (26) С .119-120.

12. Носач С.Г. Біохімічні дослідження *in vitro* антиоксидантної активності серед похідних ксантиніл-7-ацетатних та ксантиніл-8-тіоацетатних кислот. / Юрченко Д.М. , Александрова К.В., Беленичев І.Ф., Носач С.Г., Романенко М.І. // Матеріали восьмої міжнародної науково-практичної конференції «Розвиток наукових досліджень– 2012», (19-21 листопада 2012, Полтава). Полтава, 2012. С.105-108.

13. Носач С.Г. Цілеспрямований пошук сполук – нейропротекторів серед похідних 7-ацетатних та ксантиніл-8-тіоацетатних кислот. / Юрченко Д. М., Носач С.Г. // Тези доповідей 72 Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвячена Дню науки «Медицина та фармація ХХІ століття – крок у майбутнє», (19-20 квітня 2012, Запоріжжя). Запоріжжя, 2012 (9) С. 233.

14. Носач С.Г. Пошук нових NO-модуляторів серед 7-заміщених похідних 3-арил(аралкіл)-8-гідроксиметилксантинів. / Дячков М.В., Носач С.Г. // Тези доповідей 73 Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвячена Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2013», (16-17 травня 2013, Запоріжжя). Запоріжжя, 2013. (12) С. 13.

15. Носач С.Г. Пошук сполук антиоксидантної дії серед похідних 8-аміноксантинів. / Юрченко Д.М., Носач С.Г. // Тези доповідей 73 Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвячена Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2013», (16-17 травня 2013, Запоріжжя). Запоріжжя, 2013. (12) С. 42-43.

16. Носач С.Г. Поиск соединения с нейропротекторными свойствами среди производных ксантинил-7- этановой кислоты. / Юрченко Д.М., Носач С.Г., Александрова К.В., Беленичев И.Ф. // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Фармакологическая нейропротекция», посвященная 90-летию Отдела нейрофармакологии им.С.В. Аничкова Института экспериментальной мецицины СЗО РАМН (18-21 сентября 2013, Санк-Петербург). Санк-Петербург, 2013. С. 158.

17. Носач С.Г. Влияние антиоксиданта производного ксантина Б-ЮРА-2 на ранний ответ генома в условиях моделирования острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК). / Носач С.Г. Левич С.В. Иваненко Т.В. //Збірка тез Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2014». (15-16 травня 2014 м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2014. С. 26.

18. Носач С.Г. Поиск модуляторов NO в ряду производных 3-арил(аралкил)-8-метилксантинов. / Носач С.Г., Левич С.В., Беленичев И.Ф., Александрова Е.В. // Сборник тезисов Восьмой национальной научно-практической конференции с международным участием «Активные формы

кислорода, оксид азота, антиоксиданты и здоровье человека», (25 – 29 мая 2014, г. Смоленск), Смоленск, 2014. С. 152-153.

19. Носач С.Г. Вплив нових похідних ксантину на біохімічні показники ішемічного пошкодження кардіоміоцитів в умовах експериментального інфаркту міокарда. / Юрченко Д. М., Александрова К.В., Левіч С.В., Дячков М.В., Носач С.Г., Крісанова Н.В., Рудько Н.П.// Матеріали XI Українського біохімічного конгресу.// (6 – 10 жовтня 2014, Київ), 2014/ The Ukrainian Biochemical Journal Київ: КНУ ім. Т.Шевченка, 2014. Т 86, №5 С. 155.

20. Носач С.Г. Поиск соединений с нейропротективными свойствами среди производных ксантина. / Носач С.Г. // Збірка тез Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації–2015», (14-15 травня, м. Запоріжжя), Запоріжжя, 2015 С .31.

21. Носач С.Г. Изучение антиоксидантных и нейропротективных свойств производных ксантина при моделировании внутримозгового кровоизлияния. / Носач С.Г. // Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної медицини – в практику охорони здоров'я – 2016», (24-25 березня 2016, м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2016. С.66-68.

22. Носач С.Г. Використання похідних ксантину для антиоксидантної модуляції постінсультних уражень нейронів сенсомоторної зони кори у щурів. / Левіч С.В., Носач С.Г. / Збірка тез Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю «Сучасні аспекти медицини і фармації–2016», (12-13 травня 2016, м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2016. С .222.

23. Носач С.Г. Дослідження нейропротективних властивостей 1,3,8,-тризаміщеного ксантиніл-7-ацетогідразду в умовах внутрішньо мозкового крововиливу. / Носач С.Г., Беленічев І.Ф., Левіч С.В., Бухтіярова Н.В. // Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю, пам'яті професора В.В. Дунаєва «Фундаментальні та клінічні аспекти фармакології», (24-25 листопада 2016, Запоріжжя). Запоріжжя, 2016. С. 60.

24. Носач С.Г. Антиоксидантные механизмы нейропротективного действия производного 3-метилксантина (соединения С-3) в условиях внутримозгового кровоизлияния. / Носач С.Г. // Тези доповідей Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів з міжнародною участю, присвячена Дню науки «Сучасні аспекти медицини і фармації – 2017», (11-12 травня 2017, м. Запоріжжя). Запоріжжя, 2017. С .31.

25. Nosach S. Influence of 3-methylxanthine derivative on the morphological and functional characteristics of neurons of sensorimotor cortex of rats with experimental intracerebral hemorrhage. / I.Belenichev, K.Aleksandrova, A. Shkoda, S. Levich, S. Nosach // XXVII International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism and Function & XII International Conference on

Quantification of Brain Function with PET June 27th-30th 2015, Vancouver, Canada p.858

26. Носач С.Г. Вплив гідразид 8-бензиламінотеофілілін-7-оцтової кислоти (С-3) на показники нітрозуючого стресу і нейроапоптозу при експериментальному ГПМК. / Беленічев І.Ф., Носач С.Г. // Збірка тез Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасні питання молекулярно-біохімічних досліджень та лабораторного скринінгу у клінічній та експериментальній медицині», (11 –12 квітня 2019, м. Запоріжжя) Запоріжжя, 2019. С. 44-45.

АНОТАЦІЯ

Носач С.Г. Цілеспрямований пошук нейропротективних сполук з антиоксидантним механізмом дії серед похідних ксантинів.– Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ - 2020.

Вперше отримані результати про антиоксидантну активність 52 сполук похідних ксантиніл-7-ацетатних і ксантиніл-8-тіоацетатних кислот та 3-R-гідроксиметилксантинів. Визначено, що гідразид 8-бензиламінотеофілілін-7-ацетатної кислоти (С-3) в дослідях *in vitro* (за інгібуванням NO, за інгібуванням окислювальної модифікації білка, та за інгібуванням Fe²⁺-залежного ВРО) за силою антиоксидантної активності перевершує референс-препарати (тіотриазолін, дибунол і N-ацетилцистеїн).

Вперше на моделях ГПМК (двобічної перев'язки загальних сонних артерій та внутрішньомозкового введення аутокрові) встановлена нейропротективна активність С-3, яка спрямована на гальмування оксидативного нітрозуючого стресу, нейроапоптозу, підвищення щільності нейронів IV-V шарів кори головного мозку, активність антиоксидантних ферментів, активацію компенсаторних шунтів продукції АТФ, як наслідок, зменшення летальності та неврологічних порушень у експериментальних тварин. Встановлено перевагу С-3 перед тіотриазоліном, цитіколіном і мексидолом. Нейропротективна дія С-3 в умовах ГПМК спрямована на гальмування нітрозуючого та оксидативного стресу, зниження загибелі нейронів кори головного мозку, підвищення продукції АТФ мітохондріально-цитозольними шунтами і, як наслідок, на зменшення летальності та неврологічних порушень у експериментальних тварин. В основі нейропротективної дії С-3 лежить його антиоксидантний механізм, а саме здатність зв'язувати NO і тим самим переривати АФК-залежні механізми нейроапоптозу, порушення енергопродукуючої функції мітохондрій і пошкодження СОД.

Ключові слова: похідні 3-алкіл (арил, аралкіл) ксантину, антиоксидантна і нейропротективна дія, ішемія головного мозку.

SUMMARY

Nosach S.G. Purposeful search for neuroprotective compounds with an antioxidant mechanism of action among xanthine derivatives. – Manuscript.

The dissertation for the degree of candidate of biological sciences, specialty 14.03.05 "Pharmacology". State Institution "Institute of Pharmacology and Toxicology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv - 2020.

The dissertation is devoted to the actual task of pharmacology - the search for new effective medicamentous remedies for violations of cerebral circulation on the basis of derivatives of 3-alkyl (aryl, aralkyl) xanthine. In vitro studies (inhibition of NO, protein oxide modification and Fe²⁺ dependent free radical oxidation (FRO), and also the evaluation of the efficacy of the compound under the conditions of simulation of acute cerebrovascular accident were performed in 52 samples of xanthine derivatives of 8-benzylamino-thiophenyl-7-acetic acid hydrazide (C-3) and experimentally substantiated application as a neuroprotector with an antioxidant mechanism of action. It was established that the compound C-3 belongs to the IV class of toxicity: LD₅₀ in the intragastric administration of rats is 2100 ± 142.8 mg/kg. In order to determine further studies of the most promising compound of S-3-hydrazide 8-benzylaminoteo-filillin-7-acetate, and taking into account the parameters of its acute toxicity, an effective dose of the compound has been experimentally determined. The effective dose of C-3 was determined on the model of a one-sided ligation of the common carotid artery (acute disorder of blood flow) of rats. According to all experimental parameters (determination of nitrotyrosine, BB-CPK) the effective dose of C-3 is a dose of 100 mg/kg of animal weight.

It was found that intragastric administration of C-3 at a dose of 100 mg/kg on the 4th and 18th days in rats with bilateral ligation of common carotid arteries and intracerebral hemorrhage leads to a decrease in the mortality of animals in the acute period on the 4th day by 62% and 75%, and on the 18th day of a late acute period by 75% and 68% in the simulation of ICH, as well as the reduction of the neurological deficit (by 11-12.4 points on the scale of C.P. McGraw).

In acute disorders of cerebral circulation by ischemic and hemorrhagic type of stroke there is an increase in the production of active oxygen forms and the initiation of oxidative stress. The primary production of active oxygen forms due to transducer autocoidosis results in oxidative modification of proteinic ion fragments, in particular Ca-channels, calcium overload of mitochondria, and violation of their energy-producing function. The administration of C-3 leads to inhibition of oxidative and nitrosating stress – reducing the level of nitrotyrosin on the 4th day by 53.7% and 37.1%, respectively, APH by 49% and 58%, KPH by 65% and 63%, nitrite anion by 63%-47%, against the background of increased activity of SODs by 243% and 95%, catalase by 147% 78%, and GPx by 121% and 82.3% in the brain of rat with occlusion of carotid arteries and intracerebral hemorrhage.

Free radicals and stable cytotoxic products of oxidative stress in the nerve tissue under conditions of ischemia result in desensitization of the receptors, mitochondrial dysfunction of the loss of neuron functional activity. We found that the introduction of C-3 to rats with bilateral occlusion of carotid arteries and intracranial hemorrhage on the 4th day of the experiment positively influenced on the parameters of energy metabolism of the brain – increase of the level of APH by 70% and 50.8%, malate by 130% and 100%, decrease of the level of lactate by 47% and 35% against the background of increased activity of MDG by 106% and 109%, SDG by 80% and 56%. According to a number of indicators of neuroprotective action, 8-benzylaminotheophyllinyl-7-acetic acid hydrazide exceeds cyticoline, mexidol and tiotriazolin.

Morphometric studies have shown that ischemia modeling and the injection of autologous blood into the inner brain capsule resulted in a significant decrease in neuron density of the sensorimotor zone of the cerebral cortex compared with intact animals, both on the 4th and on the 18th day of the experiment. At the same time there was a significant decrease in the area of neuronal bodies, a decrease in the content of RNA in the neurons of 26% relative to the pseudo-operated group of animals at the same time of observation. The course assignment of the C-3 compound leads to improvement of morpho-functional parameters of the neurons of the sensorimotor zone of the cortex on the 4th day of the experiment after the occlusion of the carotid arteries and intrahepatic hemorrhage, increasing the density of neurons of the brain by 20% and 10%, increasing the RNA of the brain neurons by 37% and 34% respectively, a decrease in apoptotic and necrotic changes in cells on the 4th day by 49% and 14% compared with the control group. There was an increase in c-Fos-positive cells on the 18th day in 1.5-0.9 ($p < 0.05$) times. Thus, course administration of 1,3-dimethyl-8-N-benzylaminoxanthin-7-acetic acid hydrazide (C-3) at a dose of 100 mg/kg intragastrically in rats with experimental intracerebral hemorrhage has a significant neuroprotective effect.

The practical value of the results is obtained. The results obtained from the experimental study of the neuroprotective compound of hydrazide 8-benzylaminotheophyllinyl-7-acetate acid are the justification for further in-depth study of the compound as a potential drug for the complex therapy of stroke. The prospect of finding new antioxidants and neuroprotectors in the series of derivatives of xanthinyl-7-acetate and xanthinyl-8-thioacetate acids and 3-R-hydroxymethylxanthines is performed.

The novelty of researches is confirmed by the patents of Ukraine. The results of the research are introduced into the educational and scientific work of the Department of Pharmacology and Medical Recipes of the Zaporizhzhya State Medical University, the Dnipropetrovsk State Medical Academy, the Bukovina State Medical University, the Department of General and Medical Pharmacology of the Odessa National Medical University, the Department of Pharmacology and Medical Recipes of the Kharkiv National Medical University.

Key words: derivatives of 3-alkyl (aryl, aralkyl) xanthine, biological action, antioxidant and neuroprotective action, ischemia of the brain.

АННОТАЦИЯ

Носач С.Г. Целенаправленный поиск нейропротективных соединений с антиоксидантным механизмом действия среди производных ксантинов. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.05 - фармакология. - ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», Киев - 2020.

Впервые получены результаты об антиоксидантной активности среди 52 производных ксантинил-7-ацетатных и ксантинил-8-тиоацетатных кислот и 3-R-гидроксиметилксантинов. Было определено, что 8-бензиламинотеофинилин-7-уксусная кислота (С-3) в опытах *in vitro* (по ингибированию NO, по ингибированию окислительной модификации белка и по ингибированию Fe²⁺-зависимого СРО) по силе антиоксидантной активности превосходит референс-препараты (тиотриазолин, дибунол и N-ацетилцистеин).

Впервые на моделях ОНМК (двухсторонней перевязке общих сонных артерий и внутримозгового введения аутокрови) установлена нейропротективная активность С-3, действие которого направлено на торможение оксидативного, нитрозирующего стресса, нейроаптоза, повышение плотности нейронов IV-V слоев коры головного мозга, активность антиоксидантных ферментов, активацию компенсаторных шунтов продукции АТФ, как следствие, уменьшение летальности и неврологических нарушений у экспериментальных животных. Установлено преимущество С-3 перед тиотриазолином, цитиколином и мексидолом. Нейропротективное действие С-3 в условиях ОНМК направлено на торможение нитрозирующего и оксидативного стресса, снижение гибели нейронов коры головного мозга, повышение продукции АТФ митохондриально-цитозольными шунтами и, как следствие, уменьшение летальности и неврологических нарушений у экспериментальных животных. В основе нейропротективного действия С-3 лежит его антиоксидантный механизм, а именно связывание NO и тем самым прерывание АФК-зависимых механизмов нейроаптоза, нарушения энергопродуцирующей функции митохондрий и повреждения СОД.

Ключевые слова: производные 3-алкил(арил, аралкил) ксантина, антиоксидантное и нейропротективное действие, ишемия головного мозга.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АДФ – аденозин-5-дифосфорна кислота
 АМФ – аденозин-5-монофосфорна кислота
 АОА – антиоксидантна активність
 АТФ – аденозин-5-трифосфорна кислота
 АФГ – альдегідфенілгідрозони
 АФК – активні форми кисню
 БАР– біологічно активні речовини
 ВВ-КФК– мозкова ізоформа креатинфосфокінази
 ВК – внутрішньомозковий крововилив
 ВРО– вільнорадикальне окиснення
 ГЕБ– гематоенцефалічний бар’єр
 ГПМК– гостре порушення мозкового кровообігу
 ГПР – глутатіонпероксидаза
 КФГ – карбоксилфенілгідрозони
 МДА – малоновий диальдегід
 МДГ-малатдегідрогеназа
 НАД – нікотинаміддинуклеотид
 НАДФ – нікотинаміддинуклеотидфосфат
 ОМБ – окисна модифікація білка
 СДГ – сукцинатдегідрогеназа
 СОД – супероксиддисмутаза
 ХО – хібнооперовані
 ЦНС – центральна нервова система
 NO-монооксид азота
 NOS – синтаза монооксида азота
 ONOO- пероксинітрит

Підписано до друку // Гарнітура Times New Roman
 Папір друкарський. Формат 60×90 1/16. Умовн. друк. арк. 1,83.
 Наклад – 100 прим. Замовлення № 8026.
 Надруковано з оригінал-макету в типографії
 Запорізького державного медичного університету
 69035, м. Запоріжжя, пр. Маяковського 26