

Р.О. Щербина, В.В. Парченко, С.В. Павлов, О.І. Панасенко, Е.Г. Книш, І.Ф. Беленічев

НЕЙРОПРОТЕКТИВНА АКТИВНІСТЬ S-ПОХІДНИХ 1,2,4-ТРИАЗОЛУ

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: S-похідні 1,2,4-тріазолу, нейропротективна активність.

Ключевые слова: S-производные 1,2,4-триазола, нейропротективная активность.

Key words: S-derivatives 1,2,4-triazole, neuroprotective activity.

Досліджено нейропротективну активність S-похідних 1,2,4-тріазолу. Встановлено, що вказані сполуки впливають на виживаність тварин, вміст аденилових нуклеотидів, показники вуглеводного обміну в головному мозку, окислювальну модифікацію білка в головному мозку на фоні ГПМК, активність антиоксидантних ферментів.

Исследована нейропротективная активность S-производных 1,2,4-триазола. Установлено, что указанные соединения влияют на выживаемость животных, содержание адениловых нуклеотидов, показатели углеводного обмена в головном мозге, окислительную модификацию белка в головном мозге на фоне ГПМК, активность антиоксидантных ферментов.

Neuroprotective activity of S-derivatives of 1,2,4-triazoles have been investigated. It was revealed that compounds affects on animals survival, contents of adenylic nucleotides, indexes of carbohydrate metabolism in the brain, oxidative modification of protein in the brain against the background of SVCB, on activity of antioxidant enzymes.

Останніми роками відзначається зростання поширеності судинних захворювань, у тому числі гострих порушень мозкового кровообігу. Ішемічне пошкодження головного мозку супроводжується важкими неврологічними розладами, зокрема, порушенням когнітивних, моторних, вербальних та інших функцій ЦНС. Щороку в світі переносять інсульт близько 6 млн осіб. Спостерігається поширення інсульту у осіб працездатного віку (до 65 років). Згідно з міжнародними епідеміологічними дослідженнями (World Development Report), у світі від інсульту щороку помирають 4,7 млн осіб. У більшості країн інсульт посідає 2–3 місце в структурі загальної смертності населення, в нашій країні – друге, поступаючись лише кардіоваскулярній патології. Інсульт посідає перше місце серед причин стійкої втрати працездатності [1,2].

При ішемічному ураженні мозку, в результаті зниження мозкового кровотоку, відбувається порушення функції дихального ланцюга мітохондрій і енергетичного обміну, глутаматна «ексайтотоксичність», порушення іонного гомеостазу клітини з підвищенням внутрішньоклітинного вмісту іонів кальцію, лактат-ацидозом, активацією внутрішньоклітинних ферментів, підвищенням синтезу NO, розвитком оксидативного стресу, експресією генів, аноксичною деполяризацією мембран і смертю клітини [3,4].

Тому пошук методів фармакологічної корекції цих порушень, а також препаратів, що знижують ступінь нейродегенерації при ішемії мозку, є актуальним завданням сучасної фармакології [5].

Дослідженнями останніх років встановлено, що в умовах ішемії головного мозку активних форм кисню (АФК), за допомогою активації редоксичутливих каскадів синтезу чинників ядерної транскрипції білка, підсилюють експресію прозапальних цитокінів, беруть участь у формуванні локального запального осередку в головному мозку, тим самим підсилюючи явища набряку головного мозку, ініціюють

явища апоптозу і некрозу [6–9]. Отже, доцільним є включення в комплексну терапію мозкових інсультів препаратів з вираженою антиоксидантною дією, що переривають каскад вільно-радикальних реакцій.

МЕТА РОБОТИ

Вивчення нейропротективної активності нових S-похідних 1,2,4-тріазолу.

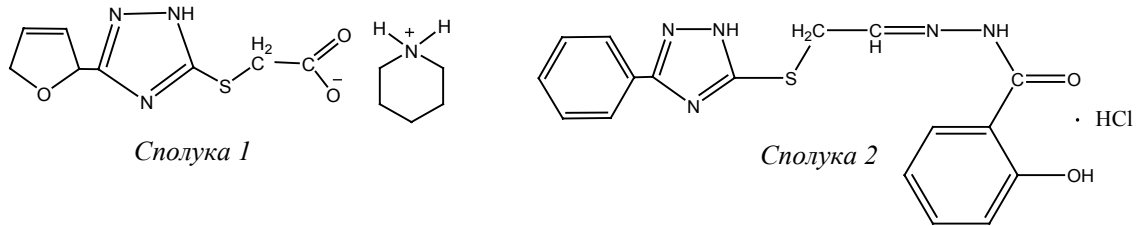
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальну частину виконано на білих щурах лінії Вістар обох статей масою 150–200 г, яких розподілено на 4 групи (інтактні тварини, тварини з ГПМК, тварини з ГПМК + сполука 1, тварини з ГПМК+ сполука 2). Усі тварини утримувались на стандартному раціоні харчування віварію, при природній зміні дня і ночі. Щурів отримано з інституту фармакології і токсикології АМН України. Всі експериментальні процедури та оперативні втручання здійснено відповідно до «Положення про використання тварин у біомедичних дослідженнях» [10].

Двобічну перев'язку загальних сонних артерій виконано під етамінал-натрієвим наркозом (40 мг/кг) з використанням хірургічного доступу шляхом виділення сонних артерій і одномоментного накладення на них шовкової лігатури [10].

Для вивчення дії препаратів окремим групам тварин внутрішньоочеревинно вводили водні розчини піперидиній 2-(5-фуран-2-іл)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)-ацетат (сполука 1, *рис. 1*) та 2-гідрокси-N'-(2-(3-феніл-1H-1,2,4-тріазол-5-ілтію)-етилліден)-бензоілгідразиду гідрохлорид (сполука 2, *рис. 1*) у дозі 50 мг/кг.

З метою вивчення результатів фармакокорекції, у експериментальних тварин через 4 доби після операції забирався головний мозок. Для біохімічних досліджень використано лобові долі кори. Для біохімічних досліджень тканини мозку гомогенізували на холоді в сольовому ізотонічному середовищі (0,15 М КCl) при температурі +4°C, за допомогою скляного гомогенізатора (у співвідношенні



Сполука 1

Сполука 2

тканина – сольовий розчин 1:40). Після цього методом диференціального центрифугування виділено цитозольну фракцію (15000 g). Екстракцію ліпідів проводили за методом Кейтса [11]. Безбілковий екстракт отримували додаванням точної наважки гомогената тканини мозку в хлорну кислоту (0,6 М) з подальшою нейтралізацією 5 М розчином калій карбонату.

Стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю СОД, каталази, глутатіонпероксидази (ГПР), рівнем α -токоферолу, показниками окислювальної модифікації білка в тканинах головного мозку [11–13].

Стан вуглеводно-енергетичного обміну визначали за рівнем найбільш важливих інтермедіантів – АТФ, АДФ, АМФ [10]. Про ішемічне пошкодження тканин головного мозку судили за гіперферментомією креатинфосфокінази (ВВ-КФК) [13].

Визначення активності СОД проведено за методикою, описаною Чеварі зі співавт. [12]. СОД конкурує з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидрадикали, що утворюються внаслідок аеробної взаємодії НАДН і феназинметасульфату (ФМС). Внаслідок цієї реакції НСТ відновлюється до гідразинтетразолію. За наявності СОД відсоток відновлення НСТ змінюється. Активність СОД виражали в у.о./мг білка/хв.

Активність каталази визначали спектрофотометрично [14]. Каталаза, що знаходиться в пробі, розкладає гідроген пероксид; залишок пероксиду визначали за реакцією з амоній молібдатом. Активність ферменту оцінювали за мірою розкладання водню пероксид. Активність каталази виражали в мкат/мг білка/хв.

Активність ГПР визначали за методикою [11]. ГПР за допомогою глутатіону відновленого (ГSH) відновлює гідроперекис третбутилу. Залишок відновленого третбутилу визначали за інтенсивністю забарвлення з натрій нітропрусидом, що має максимум поглинання при довжині хвилі 540 нм. Активність ГПР оцінювали за спадом ГSH. Активність ГПР виражали в мкмоль ГSH/мг білка/хв.

Вміст α -токоферолу визначали спектрофотометрично [14]. α -токоферол відновлює Fe^{3+} до Fe^{2+} в еквівалентному

співвідношенні. Fe^{2+} , у свою чергу, утворює забарвлений комплекс α, α' -дипіридиллом з максимумом поглинання при довжині хвилі 540 нм. Вміст α -токоферолу виражали в мкм/г тканини.

Показники окислювальної модифікації білка в тканинах головного мозку визначали за В. Halliwell [14]. При взаємодії окислених амінокислотних залишків з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ) утворюються 2,4-динітрофенілгідразони (альдегідні й карбоксильні угруповання амінокислотних залишків). Для альдегідфенілгідразонів спектр поглинання зареєстровано при довжині хвилі 274 нм, а для карбоксифенілгідразонів – при 363 нм. При довжині хвилі 254, 272 і 280 нм визначали ступінь дефрагментації білка.

Активність ВВ-КФК визначали після поділу на сефадексі ДЕАЕ-А-50 по оптичним тестом Варбурга [11]. Принцип методу: креатинфосфокіназа каталізує наступну реакцію: креатинфосфат + АДФ $\xrightarrow{КФК}$ креатин + АТФ. Креатин, що утворюється в процесі реакції, може бути визначений у реакції з α -нафтолом. Активність ферменту прямо пропорційна креатину, що утворився. Активність ВВ-КФК виражали в мкм/л/год.

Неврологічний дефіцит у тварин визначали за шкалою stroke – index С.Р. McGrow. Важкість стану визначали за сумою відповідних балів: до 3 – легкий ступінь, від 3 до 7 – середній, від 7 і вище – тяжкий. Відзначали парези, паралічі кінцівок, тремор, манежні рухи, птоз, положення на боці, рухливість як прояв неврологічного дефіциту; розглядали утримування шурів на стрижні діаметром 15 см, що обертався (швидкість 3 об./хв). Тварин тестували щодня, виставляючи суму балів [15].

Статистичну обробку даних проводили за допомогою параметричного критерію t-Стьюдента з використанням програм «Biostat» і MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Двобічна перев'язка загальних сонних артерій спричиняла тяжкі неврологічні зміни у тварин (паралічі, парези, птоз) з максимальним проявом через 4 доби. Так, у ці терміни спостереження в групі нелікованих тварин середній бал за

Таблиця 1

Вплив сполук 1 і 2 на виживаність і розвиток неврологічного дефіциту тварин у різні терміни після ГПМК

Група тварин	Середній бал за шкалою С.Р. McGrow				К-ть тварин, що вижили на 4-у добу, %
	Через 24 години	Через 48 годин	Через 72 години	4-а доба	
Контроль (ГПМК)	16,5±1,32	17±1,59	19,12±0,52	16,66±1,02	32
Сполука 1	12,73±1,24	10,15±0,75	8,52±0,68	6,63±0,42	68
Сполука 2	13,55±2,02	11,5±2,18	9,2±0,67	9,8±0,3	54

Примітка: * – $p < 0,05$ відносно контролю.

Таблиця 2

Вплив сполук 1 і 2 на вміст аденілових нуклеотидів (мкм/г тканини) у головному мозку й активність ВВ-КФК (мМ/л/г) у сироватці крові тварин через 4 доби після ГПМК

Група тварин	АТФ	АДФ	АМФ	ВВ-КФК
Інтактні тварини	2,01±0,04	0,513±0,01	0,131±0,002	0,043±0,001
Тварини з ГПМК	1±0,02	0,21±0,01	0,21±0,008	0,126±0,001
Тварини з ГПМК + сполука 1	1,13±0,01	0,25±0,02	0,234±0,004	0,12±0,003
Тварини з ГПМК+ сполука 2	1,52±0,01*	0,35±0,006*	0,161±0,002*	0,096±0,005*

Примітка: * – p<0,05 відносно контролю.

Таблиця 3

Вплив сполук 1 і 2 на показники вуглеводного обміну в головному мозку на 4 доби після ГПМК

Група тварин	Піруват мкмоль/г тканини	Лактат мкмоль/г тканини	Малат мкмоль/г тканини
Інтактні тварини	0,43±0,006	2,65±0,09	0,24±0,008
Тварини з ГПМК	0,19±0,04	9,11±0,36	0,99±0,004
Тварини з ГПМК + сполука 1	0,25±0,006	6,54±0,13	0,17±0,005
Тварини з ГПМК + сполука 2	0,38±0,006*	6,85±0,15*	0,16±0,004*

Примітка: * – p<0,05 відносно контролю.

Таблиця 4

Вплив сполук 1 і 2 на окислювальну модифікацію білка в головному мозку тварин на 4 доби після ГПМК

Група тварин	Продукти ОМБ, у.о./г білку	
	АФГ (270 нм)	КФГ (363 нм)
Інтактні тварини	5,58±0,31	8,54±0,33
Тварини з ГПМК	18,5±0,55	29,53±2,5
Тварини з ГПМК + сполука 1	14,6±0,38	23,7±0,53
Тварини з ГПМК + сполука 2	12,9±0,35*	18,7±0,55*

Примітка: * – p<0,05 відносно контролю.

шкалою С.Р. McGrow складав 17,66, що відповідає тяжкому ступеню неврологічної симптоматики (табл. 1). Через 4 доби в контрольній групі вижило 30% тварин.

Біохімічні дослідження показали, що двостороння перев'язка загальних сонних артерій призводить до типових ішемічних порушень: дефіциту макроергічних фосфатів, дискоординації в циклі Кребса, активації анаеробного гліколізу, розвитку оксидативного стресу.

Варто відзначити, що введення сполук 1 і 2 призводило

до підвищення рівня АТФ на фоні зниження АМФ, що є прооксидантом (табл. 3).

В умовах моделювання ГПМК виявлено підвищення альдегідних (АФГ) і карбоксильних (КФГ) продуктів ОМБ у тканинах мозку щурів на 4 доби. Одним із механізмів АОА дії сполук 1 і 2 є їх позитивний вплив на АОА систему головного мозку. Так, при введенні цих сполук спостережено підвищення активності основних АО-ферментів: СОД, каталази і ГПР.

Найбільш важливою ланкою антиоксидантної дії досліджуваних сполук в умовах ГПМК є гальмування окислювальної модифікації білка. Подібна дія характерна для найбільш активних вторинних нейропротекторів. Багато авторів відносять окислювальну модифікацію білка до найбільш важливої ланки патогенезу ішемії головного мозку, внаслідок того, що окислення білкових макромолекул рецепторів та іонних каналів призводить до порушення генерації, передачі й розпізнавання нервового імпульсу, порушення функціональної активності нейронів і, врешті, до розвитку неврологічного й когнітивного дефіциту [7,8,14].

ВИСНОВКИ

Вивчено нейропротективну активність S-похідних 1,2,4-тріазолу. В результаті дослідження встановлено, що сполуки 1 і 2 проявляють помірну нейропротективну активність.

Таблиця 5

Вплив сполук 1 і 2 на активність антиоксидантних ферментів і вміст α-токоферолу у головному мозку на 4 доби після ГПМК

Група тварин	СОД, у.о./мг білка/хв.	Каталаза, мкат/мг білка/хв	ГПР, мкмоль/мг білка/хв	α-токоферол, мкмоль/г тканини
Інтактні тварини	258,4±3,7	10,7±0,22	9,67±1,58	4,37±0,06
Тварини з ГПМК	39,7±6,57	2,8±0,21	35,6±1,73	2,34±0,15
Тварини з ГПМК + сполука 1	54,3±3,6	3,05±0,11	43,12±1	2,43±0,04
Тварини з ГПМК + сполука 2	87,2±1,54*	4,05±0,23	48,97±2,54*	2,83±0,05*

Примітка: * – p<0,05 відносно контролю.



ЛІТЕРАТУРА

1. *Iadecola C.* Mechanisms of cerebral ischemic damage / *Iadecola C.* // *Cerebral ischemia.* – New Jersey: Humana Press, 1999. – P. 3–33.
2. *Зозуля І.С.* Гострі порушення мозкового кровообігу як критичні стани в невропатології / *І.С. Зозуля, В.І. Боброва.* // *Укр. неврологічний журнал.* – 2006. – №1. – С. 5–8.
3. *Гусев Е.И.* Проблема инсульта в России / *Гусев Е.И.* // *Инсульт.* – 2003. – №9. – С. 3–7.
4. *Беленичев І.Ф.* Антиоксидантна система захисту організму (огляд літератури) / *Беленичев І.Ф., Губський Ю.І., Левицький С.Л. та ін.* // *Совр. пробл. токсикол.* – 2002. – №3. – С. 24–31.
5. *Brann D.W.* Neurotrophic and neuroprotective effects of estrogen: Basic mechanisms and clinical implications / *Brann D.W., Dhandapani K., Wakade C., Mahesh V.B., Khan M.M.* // *Steroids.* – 2007. – Vol. 72. – P. 381–405.
6. *Полевик И.В.* Церебропротективные эффекты эмоксипина при моделировании мозговых сосудистых расстройств / *Полевик И.В.* // *Фармакол. вісн.* – 1999. – №5. – С. 29–33.
7. *Беленичев И.Ф.* Митохондриальная дисфункция при церебральной патологии. Нейропротекция Цереброкурином / *Беленичев И.Ф., Колесник Ю.М., Павлов С.В., Абрамов А.В., Бухтиярова Н.В.* // *Международный неврологический журнал.* – 2008. – №4 (20). – С. 23–29.
8. *Беленичев И.Ф.* Рациональная нейропротекция / *Беленичев И.Ф., Черный В.И., Колесник Ю.М., Павлов С.В.* – Донецк: ИД Заславский, 2009. – 260 с.
9. *Лю Б.Н.* Кислородно-перекисная концепция апоптоза и возможные варианты его механизма / *Лю Б.Н.* // *Усп. совр. биологии.* – 2001. – Т. 121, №5. – С. 488–501.
10. *Стефанов О.В.* Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. реком. / *Стефанов О.В.* – К.: Авіцена, 2002. – 527 с.
11. *Прохорова М.И.* Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / *Прохорова М.И.* – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1982. – 272 с.
12. *Чевари С.* Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах в клетки и метод определения ее в биологических материалах / *Чевари С., Чаба И., Секей И.* // *Лаб. дело.* – 1988. – №11. – С. 678–681.
13. *Захарова Н.Б.* Тонкослойная хроматография нуклеотидов эритроцитов на пластинках «Силуфол» / *Захарова Н.Б., Рубин В.И.* // *Лаб. дело.* – 1980. – №12. – С. 735–738.
14. *Halliwell B.* Molecular Biology of free Radicals in Human Diseases / *Halliwell B.* – London: St. Lucia: OICA, 1999. – 410 p.
15. *McGrow C.P.* Experimental Cerebral Infarction Effects of Pentobarbital in Mongolian Gerbils / *McGrow C. P.* // *Arch. Neurol.* – 1977. – Vol. 34, №6. – P. 334–336.

Відомості про авторів:

Щербина Р.О., асистент каф. токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.

Парченко В.В., к. фарм. н., доцент каф. токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.

Павлов С.В., к. біол. н., ст. викладач каф. фармакології та медичної рецептури ЗДМУ.

Панасенко О.І., д. фарм. н., професор, зав. каф. токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.

Книш Є.Г., д. фарм. н., професор, зав. каф. УЕФ ЗДМУ.

Беленичев І.Ф., д. біол. н., професор, зав. каф. фармакології та медичної рецептури ЗДМУ.

Адреса для листування:

Щербина Роман Олександрович. 69035, м. Запоріжжя, пр-т Маяковського, 26, каф. токсикологічної та неорганічної хімії.

Тел. (0612) 34 22 61.

E-mail: rsherbyna@mail.ru

Рецензенты: проф. С.И. Коваленко
д. фарм. н. Л.О. Омелянчик
Поступила в редакцию 12.10.2010 г.