

## ВИВЧЕННЯ АНТИРАДИКАЛЬНОЇ ТА МІТОПРОТЕКТИВНОЇ ДІЇ РЯДУ ОРИГІНАЛЬНИХ 7-АРИЛАЛКІЛ-8-ГІДРАЗИНОПОХІДНИХ 1,3-ДИМЕТИЛКСАНТИНУ

©Д. Б. Коробко

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»

**РЕЗЮМЕ.** У статті представлені результати вивчення впливу ряду нових 7-арилалкіл-8-гідразинопохідних теофіліну на процеси вільнорадикального окиснення (ВРО). Показано, що більшість з перевірених сполук пригнічують утворення активних форм кисню на різних моделях ініціювання ВРО. Для найбільш активних сполук було проведено визначення мітопротективної дії. Встановлені деякі закономірності в ряду «структура речовини – біологічна активність».

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** вільнорадикальне окиснення, 7-арилалкіл-8-гідразинопохідні теофіліну, емоксипін, *N*-ацетилцистеїн, тіотриазолін, мітохондріальні пори

**Вступ.** Кисень – невід’ємна умова існування більшості живих організмів, що забезпечує енергопродукуючі механізми аеробних реакцій та ферментативно-метаболічну активацію всіх функцій. Активні форми кисню, які утворюються в результаті даних реакцій, у нормі підтримують життєдіяльність організму на необхідному рівні, в тому числі за рахунок утворення різноманітних есенціальних продуктів. Запальні процеси, хімічні отруєння, іонізуюче випромінювання, ендотоксикози тощо призводять до виснаження антиоксидантних резервів і активації вільнорадикального ліпідопереокиснення. Тому розробка високоефективних та малотоксичних антиоксидантів з різноманітними механізмами дії, які здатні усувати порушення й відновлювати реципроникність одночасно в декількох сигнальних внутрішньоклітинних системах – актуальна проблема сучасної медицини і фармакології [1].

**Метою роботи** було вивчення антирадикальної та мітопротективної активності ряду оригінальних 7-арилалкіл-8-гідразинопохідних теофіліну.

**Матеріал і методи дослідження.** Для неописаних раніше продуктів утилізації 7-арилалкіл-8-гідразинотеофілінів в методиках *in vitro* було

вивчено антиоксидантну активність (АОА) й мітопротективну дію. В якості референс-препаратів використовувались емоксипін, *N*-ацетилцистеїн і тіотриазолін. Оцінку АОА одержаних речовин з метою з’ясування ступеня впливу на рівень продуктів ВРО проводили на наступних моделях: гальмування автоокиснення адреналіну в адренохром, за інгібуванням  $\text{NO}^{\cdot}$ -радикалу та за інгібуванням окисної модифікації білка [2–4]. Статистична обробка результатів досліджень виконана на базі наукової лабораторії кафедри фармакології з медичною рецептурою (завідуючий кафедрою – д. біол. н., проф. І. Ф. Беленічев) Запорізького державного медичного університету.

**Результати й обговорення.** Більшу частину широко використовуваних лікарських препаратів антиоксидантної дії складають антиоксиданти (АО) прямої дії, які мають безпосередніми антирадикальними властивостями, що можуть бути виявлені в тестах *in vitro*. Аналіз наявних літературних даних дозволяє згрупувати АО прямої дії в п’ять основних категорій: донори протону, полієни, каталізатори, пастки радикалів та комплексоутворювачі [5]. Даний поділ зручно використовувати під час пошуку та первинного скринінгу нових АО прямої дії з певним (заданим) механізмом дії.

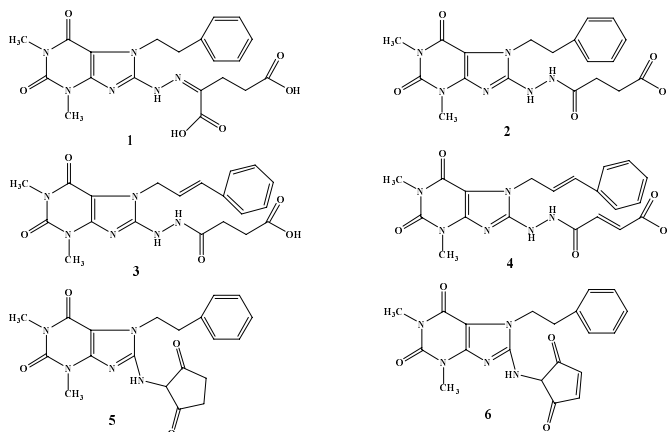


Рис. 1. Нові синтезовані 7,8-дизаміщені похідні теофіліну, які в складі своїх молекул містять функціональні групи, що відповідають за прояв антиоксидантних властивостей.

Неферментативна реакція автоокиснення адреналіну в адренохром в лужному середовищі супроводжується накопиченням супероксидрадикалу. В біологічних системах швидкість даного процесу залежить від активності ферменту супер-

оксиддисмутази, але в хімічній системі *in vitro* ця реакція може бути застосована для кількісної оцінки АОА досліджуваних сполук.

Результати експериментальних випробувань наведені в таблиці 1 та на рисунку 2.

Таблиця 1. Антиоксидантна активність синтезованих речовин ( $10^{-6}$  M) *in vitro* (n = 5) за інгібуванням супероксидрадикалу ( $M \pm m$ )

Шифр сполуки	Оптична густина, А	АОА, %
Інтакт	0,045 ± 0,0008	–
<b>1</b>	0,08 ± 0,002* <sup>†</sup>	60,0
<b>2</b>	0,145 ± 0,002*	27,5
<b>3</b>	0,175 ± 0,006*	12,5
<b>4</b>	0,065 ± 0,001* <sup>†</sup>	67,5
<b>5</b>	0,145 ± 0,004*	27,5
<b>6</b>	0,085 ± 0,002* <sup>†</sup>	57,5
Контроль	0,2 ± 0,001	–
Емоксипін	0,163 ± 0,006*	18,5

Примітки:

- \* – p < 0,05 по відношенню до контролю;
- <sup>†</sup> – p < 0,05 по відношенню до емоксипіну.

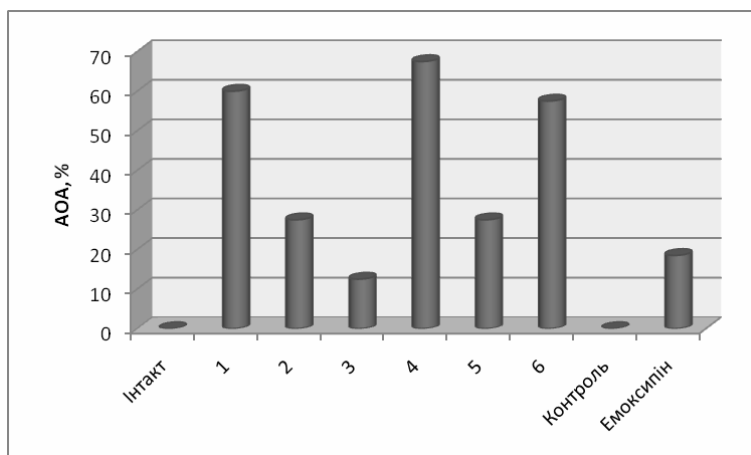


Рис. 2. Антиоксидантна активність синтезованих речовин ( $10^{-6}$  M) *in vitro* (n = 5) за інгібуванням супероксидрадикалу ( $M \pm m$ ).

Дані, наведені в таблиці 1 та проілюстровані на рисунку 2, свідчать про збільшення в контрольній хімічній системі супероксидрадикалу майже в 4,5 рази, порівняно з інтактом. Введення досліджуваних сполук в усіх випадках призвело до зменшення даного показника. Найбільшу активність проявили речовини, що містять фенетильний або 3-фенілалільний радикали та залишки гідразонопентандіонової, гідразинілоксобутен-2-ової кислот чи аміномалеїнімідний фрагмент в 7 та 8 положеннях відповідно (**1**, **4**, **6**). Сполука **4** за вираженістю антиоксидантного ефекту перевищила препарат порівняння емоксипін в 3,65 рази.

Фотоіндукція водних розчинів натрію нітропрусида супроводжується накопиченням NO<sup>•</sup>-радикалу, що оцінюється за ступенем гальмування окиснення розчинів кислоти аскорбінової за показниками екстинції проб при 265 нм.

Результати експериментальних випробувань наведені в таблиці 2 та на рисунку 3.

Результати визначення величини АОА на даній моделі дозволили ідентифікувати сполуки-лідери. Ними знову виявились речовини **1**, **4**, **6**. Найбільша активність зафіксована для сполук **1** та **4**, яка перевищує ефективність *N*-ацетилцистеїну більше ніж в 3,5 рази.

Окисну модифікацію білка (ОМБ) моделювали в гомогенаті мозку щурів лінії Вістар з використанням реактиву Фентона. Оцінку АОА синтезованих сполук здійснювали шляхом кількісного визначення окиснених амінокислотних залишків білків за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином при 363 нм.

Результати експериментальних випробувань наведені в таблиці 3 та на рисунку 4.

Таблиця 2. Антиоксидантна активність досліджуваних сполук ( $10^{-6}$  M) *in vitro* (n = 5) за інгібуванням NO<sup>•</sup>-радикалу (M ± m)

Шифр сполуки	Оптична густина, А при 265 нм	АОА, %
<b>1</b>	0,202 ± 0,001* <sup>+</sup>	65,7
<b>2</b>	0,47 ± 0,002*	20,0
<b>3</b>	0,52 ± 0,002*	11,8
<b>4</b>	0,202 ± 0,003* <sup>+</sup>	65,7
<b>5</b>	0,43 ± 0,002*	27,1
<b>6</b>	0,25 ± 0,01* <sup>+</sup>	57,6
Контроль	0,59 ± 0,03	–
N-ацетилцистеїн	0,48 ± 0,002*	18,6

Примітки:

- \* – p < 0,05 по відношенню до контролю;
- + – p < 0,05 по відношенню до N-ацетилцистеїну.

Таблиця 3. Антиоксидантна активність досліджуваних речовин ( $10^{-6}$  M) *in vitro* (n = 5) за інгібуванням окисної модифікації білка (M ± m)

Шифр сполуки	АФГ, у.о./г	АОА, %	КФГ, у.о./г	АОА, %
Інтакт	1,07 ± 0,002	–	1,37 ± 0,02	–
<b>1</b>	4,87 ± 0,02* <sup>+</sup>	52,0	2,41 ± 0,01* <sup>+</sup>	65,0
<b>2</b>	7,54 ± 0,03*	24,4	5,68 ± 0,03	17,4
<b>3</b>	7,87 ± 0,02	21,0	5,26 ± 0,03	23,5
<b>4</b>	4,87 ± 0,02* <sup>+</sup>	52,0	2,41 ± 0,02* <sup>+</sup>	65,0
<b>5</b>	8,87 ± 0,06	10,8	6,00 ± 0,03	12,6
<b>6</b>	5,8 ± 0,01* <sup>+</sup>	42,0	3,34 ± 0,01* <sup>+</sup>	52,0
Контроль	9,95 ± 0,07	–	6,87 ± 0,002	–
Емоксипін	7,0 ± 0,002*	30,0	4,87 ± 0,01*	30,0

Примітки:

- \* – p < 0,05 по відношенню до контролю;
- + – p < 0,05 по відношенню до емоксипіну.

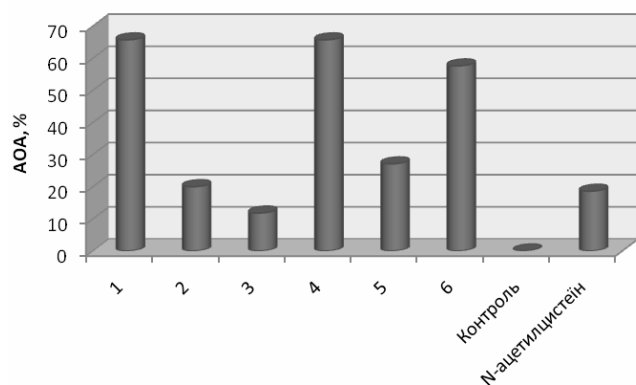


Рис. 3. Антиоксидантна активність досліджуваних сполук ( $10^{-6}$  M) *in vitro* (n = 5) за інгібуванням NO<sup>•</sup>-радикалу (M ± m).

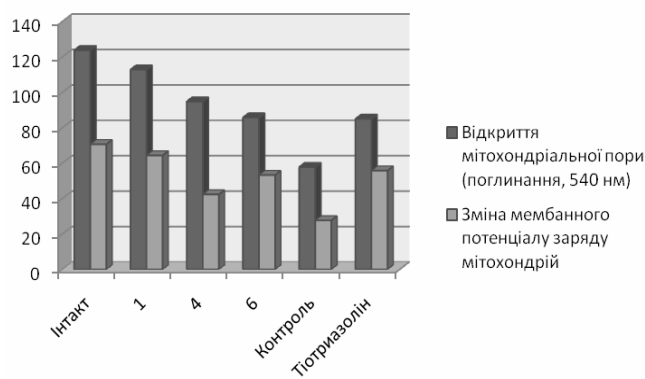


Рис. 4. Антиоксидантна активність досліджуваних речовин ( $10^{-6}$  M) *in vitro* (n = 5) за інгібуванням окисної модифікації білка (M ± m).

Аналіз одержаних даних зі спонтанної ОМБ показав, що в гомогенаті відмічається достовірне підвищення рівня продуктів вільнорадикального окиснення (вміст АФГ і КФГ збільшується у 10,6–9,3 та 5,8–5,0 раза відповідно, порівняно з інтактом). За умов використання в експерименті досліджуваних речовин ці показники були набагато меншими. В черговий раз значну вираженість антиоксидантного захисту, на рівні 42,0–65,0 %, виявили сполуки **1**, **4** та **6**.

Для найактивніших сполук вперше було проведено визначення мітопротективної дії. Вираженість останньої встановлювали за здатністю випробовуваних речовин запобігати відкриттю мітохондріальних пор (МП) і знижувати мітохондріальний потенціал Ш.

Відкриття МП визначають за довжини хвилі 540 нм і 25 °C при постійному перемішуванні протягом 25 хв визначення мітохондріального потенціалу проводять з сафраніном О (9 мкМ на про-

бу) за різницею світлопоглинання при 515 і 525 нм [6].

Результати експериментальних випробувань наведені в таблиці 4 та на рисунку 5.

Таблиця 4. Мітопротективна активність досліджуваних сполук ( $10^{-5}$  M) *in vitro* (n = 5) при NO-індукованому відкритті мітохондріальних пор (M ± m)

Шифр сполуки	Відкриття мітохондріальної пори (поглинання, 540 нм)	Зміна мембранного потенціалу заряду мітохондрій ( $\psi$ )
Інтакт	123,8 ± 9,7	70,7 ± 11,1
<b>1</b>	112,87 ± 8,2*	64,4 ± 2,1*
<b>4</b>	94,87 ± 3,2*	42,4 ± 2,2*
<b>6</b>	85,80 ± 2,1*	53,3 ± 3,1*
Контроль	57,8 ± 1,41	27,7 ± 2,13
Тіотриазолін	85,0 ± 7,2*	55,8 ± 1,0*

Примітки: \* – p < 0,05 по відношенню до контролю.

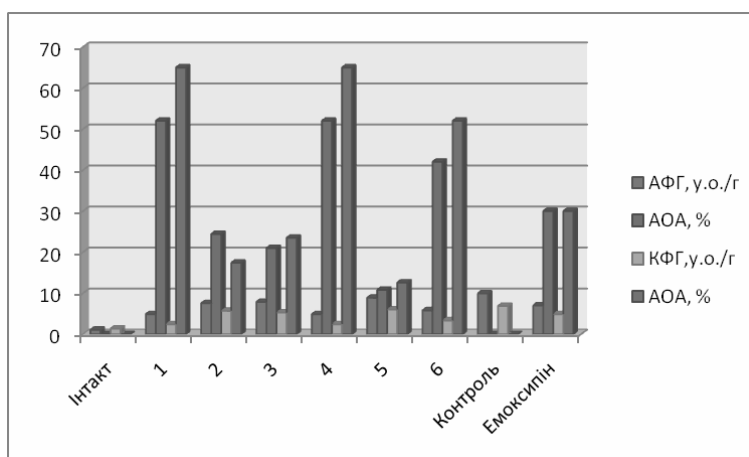


Рис. 5. Мітопротективна активність досліджуваних сполук ( $10^{-5}$  M) *in vitro* (n = 5) при NO-індукованому відкритті мітохондріальних пор (M ± m).

Кінцевий етап фармакологічних випробувань із використанням в якості еталону порівняння відомого мембраностабілізуючого засобу «Тіотриазолін» підтвердив правильність обраного напрямку наукових досліджень. Серед перевірених 7-арилалкіл-8-гідразинопохідних теофіліну ідентифіковано сполуку-лідера (**1**), яка за вираженістю мітопротективної дії перевищує широко використовуваний у медичній практиці оригінальний вітчизняний цито-(гепато-, кардіо-) протектор в 1,3 раза.

**Висновки.** 1. Більшість перевірених сполук у значній мірі пригнічують утворення активних форм кисню на різних моделях ініціювання ВРО.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Киричек Л. Т. Молекулярные основы окислительного стресса и возможности его фармакологической регуляции / Л. Т. Киричек, Е. О. Зубова // Международный медицинский журнал. – 2004. – № 1. – С. 144–148.

2. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних сполук при ініціюванні вільнорадикальних процесів у досліді *in vitro*: метод. реком. / [Ю. І. Губський, В. В. Дунаєв, І. Ф. Беленічев та ін.]. – Київ: ДФЦ МОЗ України, 2002. – 26 с.

3. Halliwell V. Free radical in Biology and Medicine /

2. Ідентифіковано «leader compound» (речовина **1**), яка на всіх використаних моделях за вираженістю дії значно переважала референс-препарати.

3. Встановлені деякі закономірності в ряді «структура речовини – біологічна активність».

**Перспективи подальших досліджень** будуть спрямовані на вивчення для представлених вище сполук **1–6** антиамнестичної дії (в умовах ретроградної амнезії) та антигіпоксичної активності.

V. Halliwell, M. C. Yutteridge // Oxford: Clarendon Press. – 1999. – 320 p.

4. Зайцев В. Г. Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия / В. Г. Зайцев, О. В. Островский, В. И. Закревский // Эксперим. клин. фармакол. – 2003. – Т. 66, № 4. – С. 66–70.

5. Доклиническое изучение специфической активности потенциальных нейропротективных препаратов: метод. реком. / [И. С. Чекман, Ю. И. Губский, И. Ф. Беленічев и др.]. – К.: ГФЦ МОЗ України, 2010. – 81 с.

Огляди літератури, **оригінальні дослідження**, погляд на проблему

## **STUDING ANTIRADICAL AND MITOPROTECTIVE ACTIONS OF SOME OF THE ORIGINAL 7-ARYLALKYL-8-HYDRAZINE DERIVATIVES OF 1.3-DIMETHYLYXANTHINE**

©**D. B. Korobko**

*SHEI «Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky of MPH of Ukraine»*

**SUMMARY.** The results of studying the influence of some original 7-arylalkyl-8-hydrazine derivatives of theophylline on free radical oxidation processes (ROP). It was shown that most of the tested compounds inhibit the formation of reactive oxygen species on various models of initiation ROP. For the most active compounds was carried determining mitoprotective action. Established some patterns in the series «structure of matter – biological activity».

**KEY WORDS:** free radical oxidation, 7-arylalkyl-8-hydrazine derivatives of theophylline, emoxypin, N-acetylcysteine, thiotriazolin, mitochondrial pore.

Отримано 17.04.2014