

Міністерство охорони здоров'я України
Одеський державний медичний університет

На правах рукопису

Беленічев Ігор Федорович

**Вивчення антиоксидантних властивостей в ряду похідних
п'яти- і шестичленних азогетероциклів в умовах моделювання
ішемічних і реперфузійних пошкоджень тканин головного мозку.**

14. 03. 08-фармакологія

Автореферат

дисертації на здобуття вченого ступеня

доктора біологічних наук.

Одеса-1996

№ 85 826

Дисертацією є рукопис
Робота виконана у Запорізькому державному медичному
університеті.

Наукові консультанти: Академік АТК України Доктор
фармацевтичних наук, професор
Мазур Іван Антонович.
Доктор медичних наук, професор
Дунаєв Віктор Володимирович
Доктор медичних наук, професор
Філімонов Володимир Іванович

Офіційні опоненти: Доктор медичних наук, професор
Воскресенський Олег Миколайович
Доктор біологічних наук, доцент
Карпов Леонід Михайлович
Доктор медичних наук, професор
Бобирев Віктор Миколайович

Провідна організація: Кримський державний медичний університет
Захист відбудеться: „ 19 “ листопада 1996 р. у _____ годині
на засіданні Спеціалізованої вченої ради
Д 05.04.02 при Одеському Державному
медичному університеті
(270100, м. Одеса, пров. Валіховський, 2)

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеського
державного медичного університету

Автореферат розісланий: „ 15 “ лютого 1996 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої вченої ради,
доктор медичних наук, професор

Л.С.Годлевський

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00760089 (U)

АВ - 35,826

Актуальність проблеми.

Захворювання, патологічну основу яких складає ішемічне „пошкодження“ тканин головного мозку - одна з найбільш актуальних проблем сучасної медицини. Широке розповсюдження, високий рівень захворювання, смертності та інвалідизації населення промислорозвинутих країн диктує наполегливу необхідність удосконалення заходів профілактики і лікування даного виду патології (Р.Г.Оганов, 1980; Н.В.Верещагин, 1987; Г.П.Меркулова, 1984; С.Л.Леонтева, 1987).

Захворюваність цими видами патології продовжує зростати. Має місце тенденція до „омолодження“ цих захворювань (О.Р.Виницкий, 1987; Д.Г. Герман, 1980; А. Kreindler, etal 1984).

На сьогодні накопичено величезний фактичний матеріал з етіології, патогенезу і медикаментозної терапії гострих порушень мозкового кровообігу (Б.К.Видерхольд, 1985; К.И.Погодаев, 1986; М.А.Полякова, 1988; В.А.Шток, 1988; А.Р.Рахимжанов, 1989).

Відповідно до сучасних уявлень про патогенез гострих порушень мозкового кровообігу, однією з найважливіших ланок його є порушення метаболізму тканин головного мозку, що приводить до утворення активних форм кисню і подальшого розвитку вільнорадикально-перекислого окислення ліпідів. Цей факт логічно передбачає застосування антиоксидантів в комплексній терапії захворювань, пов'язаних з ішемією головного мозку. Останнім часом широке застосування знаходять антиоксидантні засоби дібунол, α -токоферол (О.Н.Воскресенский, 1987 ; М.В.Биленко , 1988 ; Т. Kiely, 1988, J. Raloff, 1989).

Однаке, виявлений у них ряд побічних ефектів і низька ефективність обмежують їх застосування в практичній медицині (М.В.Биленко; В.А.Портягина, 1989).

На сьогодні простежується перспективність створення речовин, що взаємодіють не лише з ліпідними радикалами, тобто прямих антиоксидантів, але й речовин- інгібіторів активних форм кисню.

ЛНБ ім. В. Стефаника
м. Київ, Україна

Разом з тим, і в теоретичному і в практичному плані ще не ясна роль порушень окремих лімітуючих ланок і компенсаторних метаболічних шляхів в ініціалі і розвитку вільнорадикально-перекисного окислення ліпідів при ішемії. Тому другим, не менш важливим напрямком у створенні антиоксидантних засобів є пошук речовин, які реактивують антиоксидантну ферментну систему і блокують деякі компенсаторні шляхи метаболізму (Л.А.Лещинский, 1989; S. Wemes et al, 1988).

В цьому плані на особливу увагу заслуговують речовини, похідні 1,2,4-тріазолу і хіназоліну.

Похідні 1,2,4- тріазолу і хіназоліну володіють високою протимікробною, противірусною, анальгетичною, нейролептичною, антигістамінною, бронхолітичною активністю (Л.Н.Яхонтов, 1985; С.С.Либерман, 1988; R.H.Khan et al, 1987; R. K. Robins et al, 1978).

Дослідженнями співробітників Запорізького медичного університету і Української фармацевтичної академії встановлено, що похідні 1,2,4-тріазолу , 4-аміно- 1,2,4- тріазолу і 4-аміно-4-оксохіназоліну володіють вираженими ефектами на обмінні процеси в організмі, проявляючи анаболічну, ростостимулюючу, антигіпоксичну, ранозагоюючу активність (И.А.Мазур, 1987; В.В.Дунаев, 1988; В.Р.Стец, 1988; Р.С.Синяк, 1989; С.М.Дроговоз, 1989).

Повідомлялось про наявність у речовин даного класу антиоксидантних властивостей (С.М.Дроговоз, 1990; Т.Ф.Сарбаш, 1990).

Одначе, механізм їх антиоксидантної дії не вивчений. Не проведені порівняльні дослідження „структура-дія“ в ряду похідних похідні 1,2,4-тріазолу і хіназоліну. В літературі відсутні дані про антиоксидантну і протиішемічну властивість S- і N-заміщених похідні 1,2,4- тріазолу і 4-аміно-4-оксохіназоліну. Вищеперелічене обумовлює перспективність пошуку речовин з антиаксидантною активністю, з метою створення на їх основі лікарських препаратів, в ряду 1,2,4- тріазолу і хіназоліну.

Мета і завдання дослідження

Метою даної праці є здійснення пошуку речовин з антиоксидантною активністю в ряду 1,2,4- триазолу і хіназоліну, виявити закономірності „структура-дія“, вивчити можливість їх застосування при гострому порушенні мозкового кровообігу: провести доклінічні і біохімічні дослідження при клінічному застосуванні найбільш ефективних сполук. Відповідно до поставленої мети були визначені наступні завдання:

1. Здійснити вибір експериментальних моделей ішемічного пошкодження тканин головного мозку, що адекватно відтворюють активацію вільнорадикально-перекисного окислення ліпідів і способів ініціювання вільнорадикальних процесів в умовах *in vitro*.

2. Провести пошук речовин з антиоксидантною активністю в ряду похідних 3-метил-1,2,4-триазоліл-5- α -тіокарбонічних кислот, їх солей, ефірів, гідразидів, 1-алкіл (карбоксіалкіл)-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолія бромідів, 3-метил-1,2,4-триазоліл-4- аміно-5-тіонів, 3- пропіл-1,2,4-триазолія -5- α -тіокарбонічних кислот, 3-пропіл-1,2,4-триазолія-5- тіоалкілів, а також 4-оксо (4-аміно) хіназоліну і 6-нітро-4-оксохіназоліну в дослідах *in vitro* в умовах ферментативного і неферментативного ініціювання ПОЛ і по інгібуванню супероксидрадикала.

3. Вивчити гіпотетичний механізм антиоксидантної дії перспективних сполук, виявити можливі закономірності „структура-дія“.

4. Сполуки ,що виявили найбільш виражений антиоксидантний ефект в дослідах *in vitro* , вивчити на моделі гострого порушення мозкового кровообігу з оцінкою їх протиішемічної і церебропротективної дії.

5. Провести оцінку антиоксидантного і протиішемічного ефекту похідних 1,2,4-триазолу не лише в лікувально-профілактичному режимі,але й в період гострої ішемії і реперфузії, а також при інфузійному способі застосування.

6. Провести доклінічні випробування сполуки АЕ-401 /0,25% розчин для ін'єкцій/ в якості антиоксидантного і антиадренергічного засобу і

провести біохімічні дослідження в клінічному застосуванні „Тіотріазолін“ /2,5% розчин для ін'єкцій/ в якості протиішемічного засобу при ішемічній оптикопатії і тромбозу ділянок центральної вени сітківки.

Наукова новизна і теоретична значущість

В роботі застосована оригінальна методологія фармакобіохімічних досліджень ішемічного пошкодження тканин головного мозку і активації вільнорадикально-перекисного окислення ліпідів. Вперше в єдиній експериментальній постановці вивчена антиоксидальна активність 120 сполук -похідних 3- метил-1,2,4-тріазоліл-5- α -тіокарбонових кислот, 3-пропіл-1,2,4-тріазоліл-5-тіонів,1-алкіл-/карбоксіалкіл/-4-бензиліденаміно-1,2,4-тріазолію броміда, 3 метил-1,2,4-тріазоліл-4аміно-5 тіонів і 4-аміно-; 4 оксохіназоліну, 6-нітро-4-амінохіназоліну в дослідженнях *in vitro* при ферментативному і неферментативному ініціюванні ПОЛ і по інгібуванню супероксидрадикала в умовах цілісного організму при експериментальному гострому порушенні мозкового кровообігу. Виявлені речовини за силою антиоксидантного і протиішемічного ефекту, що перевершують відомі фармакологічні аналоги, які широко використовуються в медицині.

Одержані дані про механізм антиоксидантної дії похідних 3- метил-1,2,4-тріазоліл-5- α -тіокарбонових кислот їх солей, ефірів і гідразидів,1-алкіл-/карбоксіалкіл/-4-бензиліденаміно-1,2,4-тріазолію броміду, 4-аміно-;4-оксохіназоліну, 6-нітро-4-амінохіназоліну при гострому порушенні мозкового кровообігу.

Встановлено, що дані сполуки реалізують свій антиоксидантний ефект на ініціальних етапах вільнорадикально-перекисного окислення ліпідів, реактивують антирадикальні і антиперекисні ферменти, захищають запаси ендогенних антиоксидантів, тим самим захищаючи структурно-функціональну цілісність клітин при ішемії. В механізмі антиоксидантної дії вивчених сполук лежить їх спроможність реагувати з активними формами кисню і вільними радикалами, а також гальмувати основні

шляхи утворення активних форм кисню при ішемії за рахунок нормалізації основних ланок вуглеводно-енергетичного обміну і неспецифічного антиадренергічного ефекту.

В експерименті визначена висока протиішемічна і антиоксидантна ефективність досліджених речовин не лише в лікувально-профілактичному режимі, але й при призначенні в період гострої ішемії і реперфузії. Розроблено спосіб їх інфузійного застосування в умовах ішемії і реперфузії головного мозку. Виявлено певну закономірність „структура-дія“, встановлено основні функціональні групи, що обумовлюють антиоксидантну і протиішемічну дію досліджених речовин. Одержані результати дають основу для подальшого цілеспрямованого синтезу високоєфективних антиоксидантів.

Практична цінність роботи.

Розроблено двохетапну систему цілеспрямованого пошуку речовин з антиоксидантною активністю *in vitro* - *in vivo* .

Апробовані і модифіковані методи визначення антиоксидантної активності в дослідах *in vitro* при ферментативному і неферментативному ініціюванні перекисного окислення ліпідів. Розроблено метод оцінки речовин з антиоксидантною активністю, діючих на початкових етапах вільнорадикально-перекисного окислення ліпідів по інгібуванню супероксидрадикала. Удосконалено методи визначення малонового діальдегіду, α -токоферола, активності супероксиддисмутази, каталази і глутатіонредуктази. Розроблено спосіб інтеркаротидного введення антиоксидантів для захисту головного мозку при операціях на брахіоцефальних артеріях. Проведено доклінічні дослідження (β - фенілетил -4/ п-диметиламінобензиліденаміно/ -1,2,4-тріазолію броміду / „Івренол“ - 0,25% розчин для ін'єкцій/ в якості антиоксидантного і антиадренергічного засобу. Проведено біохімічні дослідження при клінічному застосуванні тіотріазоліну /2,5% розчин для ін'єкцій/ в якості протиішемічного засобу при ішемічній оптикопатії і тромбозу ділянок

центральної вени сітківки.

Основні положення, винесені на захист

1. Експериментальні моделі гострого порушення мозкового кровообігу, викликані однобічною перев'язкою загальної сонної артерії і введенням аутокрові в ділянку внутрішньої капсули, які викликають різні порушення різних лімітуючих ланок обміну речовин, а також деяких компенсаторних метаболічних шляхів, що ведуть до активації вільнорадикально-перекисного окислення ліпідів, адекватно клінічним виявленням гострих порушень мозкового кровообігу, що дозволяє використовувати ці методи для фармакологічного скринінгу нових сполук.

2. Певні „фактори ризику“ по-різному впливають на протікання і ступінь тяжкості розвитку гострого порушення мозкового кровообігу, що дозволяє істотно підвищити ефективність профілактичних заходів.

3. Окремі представники похідних 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5- α -тіокарбонових кислот, 1-алкіл-/карбоксіалкіл-/4-бензиліденаміно-1,2,4-тріазолію броміда, 3-метил-1,2,4-тріазоліл-4-аміно-5-тіонів і 4-оксо-; 4-амінохіназоліну і 6-нітро-4-оксохіназоліну гальмують процеси вільнорадикально-перекисного окислення ліпідів в досліджах *in vitro* при ферментативному і неферментативному ініціюванні і по інгібуванню супероксидрадикалу, перевершуючи за силою ефекту стандартні антиоксиданти.

4. Похідні 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5- α -тіокарбонових кислот їх солей, ефірів і гідразидів, 1-алкіл-/карбоксіалкіл-/4-бензиліденаміно-1,2,4-тріазолію броміду, 4-аміно-; 4-оксохіназоліну, 6-нітро-4-амінохіназоліну виявляють виражений антиоксидантний і протиішемічний ефект при експериментально викликаному гострому порушенні мозкового кровообігу, як в лікувально-профілактичному режимі, так і в період гострої ішемії та реперфузії.

5. Короткочасна інтеркародитна інфузія деякими похідними 1,2,4-тріазолу і хіназоліну в період ішемії та реперфузії головного мозку.

надають високий захисний ефект.

6. Курсове призначення „Тіотріазолін“ /2,5% розчин для ін'єкцій/ хворим з ішемічною оптикопатією і тромбозом ділянок центральної вени сітківки викликало гальмування процесів перекисного окислення ліпідів, нормалізувало основні ланки вуглецево-енергетичного обміну, покращило офтальмологічний статус хворих /підвищення гостроти зору, поля зору, чутливість зорового аналізатора/, покращило гемодинамічну характеристику головного мозку.

Апробація роботи

Матеріали дисертації доповідались і обговорювались на :

Всесоюзном совещании по транспорту кислорода и антиоксидантным системам /г.Гродно, 1989 г./, Объединенной конференции рационализаторов и изобретателей научных и лечебных медицинских учреждений /г.Запорожье, 1989, 1990г./, Всесоюзной конференции „Пикамилон-новый цереброваскулярный и ноотропный препарат“ /г.Уфа, 1989г./, IV Всесоюзном съезде патофизиологов /г.Кишинев, 1989г./, Всесоюзной конференции „Стресс и иммунитет“ /психонейроиммунология/ г.Ростов-на-Дону, 1989г./, Межреспубликанской научно-практической конференции „Синтез, фармакология и клинические аспекты новых психотропных и сердечно-сосудистых средств /г.Волгоград, 1989г./, Конференции молодых ученых медиков Запорожского медицинского института и Запорожского института усовершенствования врачей /г.Запорожье, 1990г./, VI Республиканском съезде фармакологов УССР /г.Харьков, 1990г./, XV конференции по клинической фармакологии /г.Волгоград, 1990г./, XIII з'їзді фізіологічного товариства ім. І. П. Павлова /Харків, 1990 р./, Пленуме Всероссийского общества фармацевтов /г.Владимир, 1991г./, Симпозиуме-совещании „Коррекция сердечно-сосудистых нарушений в клинике и эксперименте“ /г.Винница, 1999г./, IV научном съезде специалистов по клинической лабораторной диагностике республики

Беларусь /г.Гродно, 1991г./ Всесоюзной конференции „Фармакология гипоксических состояний“ /г.Гродно, 1991г./ Международной конференции „нейрофармакология на рубеже двух тысячелетий“ /г.Санкт-Петербург, 1992г./ Всеукраинском симпозиуме с международным участием „Биохимия стресса и пути повышения эффективности лечения заболеваний стрессорной природы“ /г.Запорожье, 1992г./ Науково-практичній конференції „Фізіологія і патологія перекисного окислення ліпідів, гемостазу та імуногенезу“ /м.Полтава, 1993 р./ 2 Всероссийский съезд сердечно-сосудистых хирургов /г. С-Петербург, 1993г./ 1 Конгресі світової федерації українських фармацевтичних товариств /м.Львів,1994р./

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 64 роботи, в тому числі 14 авторських свідотств.

Впровадження результатів у практику

Результати досліджень внесено до планів впровадження Запорізького медичного університету, 9 міської лікарні і обласної багатопрофільної лікарні /м.Запоріжжя/.

Препарат „Івренол“ /2,5% розчин для ін'єкцій/ має дозвіл Фармакологічним комітетом України для застосування в ветеринарній практиці як антиоксидантний засіб. Результати клінічного впровадження „Тіотріазоліну“ /1,0 і 2,5% розчин для ін'єкцій/ оформлено методичними вказівками й інформаційними листами.

Структура дисертації

Дисертація викладена на 381 сторінках машинописного тексту. Складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, п'яти розділів експериментальної частини, підсумку, загальних висновків і списку літератури, що нараховує 415 назв. Робота ілюстрована 5 схемами, 10 малюнками, 112 таблицями.

Декларація конкретного особистого внеску дисертанта у розробку наукових результатів, що виносяться на захист

Дисертантом самостійно відтворені моделі ішемічного і геморагічного інсульту, гострої ниркової гіпертензії, емоційно-больового стресу. Проведено пошук речовин з антиоксидантною активністю серед 120 сполук похідних 1,2,4 тріазолу і хіназоліну в дослідах *in vitro* на трьох моделях ініціювання вільнорадикального окислення.

Вивчені зміни вуглецево-енергетичного обміну, активність реакцій вільнорадикального окислення, кислотно-лужного стану при моделюванні ішемічної патології головного мозку

Проведені дослідження антиоксидантної, протиішемічної активності сполук ряду 1,2,4 тріазолу і хіназоліну на моделі гострого порушення мозкового кровообігу.

Досліджена антиадренергічна активність деяких сполук похідних 1,2,4 тріазолу.

Самостійно одержані результати динаміки змін біохімічних показників крові хворих з ішемічними оптикопатіями і тромбозом гілок центральної вени сітківки при курсовому призначенні 1,0 і 2,5% розчину „Тіотріазоліна“.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження складається з двох розділів - дослідів *in vitro* і в умовах цілісного організму.

В роботі використовувалися три групи методів оцінки антиоксидантної активності /АОА/ *in vitro*, які відрізняються по механізмі ініціювання вільнорадикального окислення /ВРО/ :

- методи оцінки АОА при ферментативному ініціюванні ВРО;
- методи оцінки АОА при неферментативному ініціюванні ВРО;
- методи оцінки АОА по інгрибуванню супероксидрадикала.

Ферментативне моделювання ВРО проводили шляхом додавання надлишку НАДФ.Н₂ в гомогенати тканини мозку білих щурів (Д.І.А1-

Timimi, T.L.Dormandy, 1977). АОА оцінювали по мірі гальмування утворення кінцевого продукту ВРО - малонового діальдегіду /МДА/.

Неферментативне ініціювання ВРО моделювали в залежності від яєчних ліпопротеїдів шляхом додавання FeSO_4 /Г.І.Клебанов, 1988/. АОА оцінювали по мірі інгібування утворення кінцевого продукту ВРО - малонового діальдегіду /МДА/. Індукцію супероксидракалу моделювали при аутоокисленні адреналіну в адренохром в дуже лужному середовищі (И.Ф.Беленичев, 1993). АОА оцінювали по мірі гальмування утворення адренохрому. Досліджувані речовини додавали в систему до ініціювання ВРО в кількості кратних до їхніх молекулярних мас.

Друга частина дослідження виконана на 1200 білих щурів лінії Вістар, масою 220-260 грамів, 500 білих мішей, масою 15-20 грамів і 50 безпородних собак, масою 10-20 кг. Всі тварини обох статей утримувалися на стандартному раціоні віварію.

Експериментальні дослідження проводилися з використанням загальноприйнятих на сьогоднішній час моделей експериментального порушення мозкового кровообігу-одно-та двобічної перев'язки загальної сонної артерії і введення аутокрові, здобутої з хвостової вени у щурів, до ділянки внутрішньої капсули, згідно координатам стереотаксичного атласу (Y Uot, 1959).

Операції проводилися під нембуталовим наркозом /40 мг/ кг для щурів і 4,0 мг/кг для собак

З метою вивчення механізмів біохімічної дезадаптації тканин головного мозку моделювалися стани, які провокували його ішемічне пошкодження /фактори ризику/:

а/ Гіпертензію моделювали нефроектомією праворуч і накладанням лігатури на ліву нирку (Х.М.Марков, 1970). Через місяць у експериментальних тварин були виявлені точно виражені ознаки гіпертензії, підтверджені електрофізіологічно і морфологічно.

б/ Емоційно-больовий стрес моделювали по Десідорато (1972).

в/ Операцію на „сухий“ сонній артерії моделювали шляхом тимчасового накладання лігатури на зовнішню сонну артерію /30 хвилин/, з наступною 45-хвилинною реперфузією (В.Н.Клименко, 1994).

Для біохімічних досліджень тканини, що вивчалися, гомогенізувалися на холоді у сольовому ізотонічному середовищі охолоджений до +4 С 0,15М КСІ. за допомогою скляного гомогенізатора у співвідношенні 1:40 Після виділення ядер і незруйнованих клітин /1000д/, методом диференційного центрофугування / АС-25, Німеччина /15000д/, виділялася цитозольна фракція.

Екстракцію ліпідів проводили методом Кейтса. Безбілковий екстракт одержували додаванням точної наважки гомогенату тканини в хлорну кислоту (0,6М), з наступною нейтралізацією 5,0 М K_2CO_3 .

Інтенсивність вільнорадикального окислення оцінювалося по накопиченню в тканинах початкових, проміжних і кінцевих продуктів цього процесу—дієнових кон'югатів неетерифіційованих жирних кислот (В.С.Коган, 1986), трієнкетонів (М.В.Биленко, 1989), малонового діальдегіда (Л.И.Андреева с соавт., 1988).

Стан антиоксидантної системи організму оцінювався по активності супероксиддисмутази (С.Чевори, 1986), каталази (М.А.Королюк с соавт., 1988), глутатіонредуктази (М.И.Прохорова, 1982), глутатіонпероксидази (А.Р.Гаврилова с соавт., 1986), а також по рівню α -токоферолу (J.Віегу, I. Feels, 1968) у нашій модиф (И.Ф.Беленичев, 1992).

Стан вуглецево-енергетичного обміну і циклу Кребса визначався по рівню глюкози (R.Keilin, G.Hartree у модиф. Э.М.Тупиковой, 1982), аденілових нуклеотидів (Н.Б.Захарова, Н.В.Рубин, 1980), лактата (Н.У. Hohorst, 1970), пірувата (R.Yor, W.Danprecht 1970), малата (Н.У. Hohorst, 1970). В якості біохімічного критерію ішемічного пошкодження тканин головного мозку використовувався рівень церебрспецифічного ізоензима креатинфосфокінази /ВВ-КФК/, який виділяли з сироватки крові методом колоночної хроматографії на ДЕАЕ-сефадексі А-50

(Г.А.Яровая, 1982).

Результати клінічного застосування нового антиоксиданту „Тіотриазолін“ одержані на кафедрі офтальмології Запорізького інституту удосконалення лікарів (зав.доцент. С.Ф.Максименко).

З цією метою було обстежено 80 хворих з ішемічними оптикопатіями і 64 хворих з тромбозом ділянок центральної вени сітківки.

Відповідно з програмою досліджень у хворих визначалось у крові: у сироватці-активність ізоформ КФК, вміст малонового діальдегіду, тріенкетонів, дієнових кон'югатів та α -токоферолу, у еритроцитах - вміст лактату, пірувату, малату, аденілових нуклеотидів.

Контроль за станом гемодинаміки здійснювався методом ультразвукової доплерографії з використанням блоку „Spectrador-3“, апарату „Labodor“ фірми „ДМ“ /Франція/.

Отримані результати досліджень оброблялись статистичним методом досліджень (В.Ю.Урбах, 1975).

Дослідження КЛС проводилось на мікроаналізаторі ОР 210/3 /Угорщина/, в основі якого покладено мікрометод Аступа з використанням принципу Зіггард-Андерсена.

Амінокислотний аналіз спиртових екстрактів з замороженої в рідкому азоті тканини головного мозку /вільні амінокислоти/ і гідролізату тієї ж тканини здійснювався на аналізаторі типу ААА 991 /Чехія/ в біохімічній лабораторії ЦНПТІМЕЖ /м.Запоріжжя/.

Для визначення кількості мікроелементів точну навантажку тканини обробляли за методом Стас-Отто і визначали мікроелементи на атомно-емісійному спектрометрі 1V 38 Plus /Франція/ в лабораторії заводу „Весна“ /м.Запоріжжя/.

Для визначення пульсового кровонаповнення щурам вживляли електроди у зони досліджуваних ділянок по загальноприйнятій методиці за допомогою стереотаксичного приладу. Реєстрація реограми відбувалась на 4-х каналному електроенцефалографі ЕЕГПІ-4-02. Про пульсове

кровонаповнення в дослідній ділянці головного мозку робили висновок по співвідношенню до величини реорграфічної (P_i) хвилі до величини калібровочного сигналу (М.М.Ковальов, 1979).

Для оцінки стану структури лобної і вискової частки кори головного мозку щурів і для думки про характер морфологічних змін в утворенні головного мозку, що вивчається, використовувався гістологічний метод дослідження (О.В.Волкова, Ю.К.Елецкий, 1982).

Результати та їх обговорення

Моделювання експериментального ГПМК, викликаного однічною перев'язкою загальної сонної артерії і введення аутокрові в ділянку внутрішньої капсули, викликало істотні зміни гемодинаміки і кисневого режиму мозкової тканини.

Дані реоенцефалографії свідчили про те, що при обох видах патології кровонаповнення у відділах головного мозку, що вивчається, мало тенденцію до зниження. Найбільше достовірно ці зміни спостерігалися на 1-5 дні досліду у руховому центрі кори мозку.

Зменшення пульсового кровонаповнення супроводжується вираженим зниженням показників напруження кисню, швидкості насичення й утилізації його тканинами головного мозку (М.М.Боголепов, 1983). Зниження надходження кисню супроводжується значними змінами метаболізму тканин головного мозку при двох видах патології. Так, на 4 добу активізувалися реакції анаеробного гліколізу, що приводило до накопичення недоокислених продуктів, зниженню депонованих в клітинах енергетичних субстратів /глюкоза, глікоген/. Збільшення рівню лактату, зниження кількості пірувату і малату свідчило про порушення ланцюга дихання на початковій НАД-залежній ділянці і роз'єднанні окислювального фосфорилування, що в кінцевому результаті супроводжувалося зменшенням утворення АТФ. При моделюванні нами патології АТФ утворюються в результаті анаеробного окислення глюкози в циклі Ембдена-Мейергофа-Парнаса. Стадія посилення гліколізу є не

тільки альтернативною окислювальному фосфорилуванню, але й супроводжується локальним виділенням катехоламінів.

Виявлений енергодефіцит і локальний викид катехоламінів є причиною виникаючого в організмі метаболічного ацидозу. Так, на 4 добу експерименту було виявлено достовірне зниження рН і дефіцит сумарної буферної місткості у щурів з експериментальним ГПМК. Подібні зміни приводять до активації фосфоліпаз, інгибування антиоксидантних ферментів і утворення активних форм кисню в реакціях Фентона і Габера-Вейса (М.В.Биленко, 1988 ; R. McCord, 1989).

Проведені дослідження показали практично однонаправленість в динаміці змін антиоксидантних ферментів, як при одnobічній перев'язці загальної сонної артерії, так і при введенні аутокрові в ділянку внутрішньої капсули.

Так, одержані дані свідчать про те, що ішемія тканин головного мозку супроводжується зниженням активності антиоксидантних ферментів, причому, перш за все падає активність супероксиддисмутази і каталази, потім глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази. Ці спостереження дозволяють висунути припущення про те, що зниження активності АО-ферментів, особливо супероксиддисмутази є основною причиною активації ВРО в умовах O_2 -дефіциту. Активність таких ферментів як глутатіонпероксидаза і глутатіонредуктаза прямо залежить від достатньої концентрації глутатіону. Тому зниження активності цих ферментів на 4 добу експерименту пов'язане зі зниженням рівня глутатіону і загального пула тіолів, що підтверджується максимальним зниженням рівня тіовмістких вільних амінокислот в тканинах головного мозку на 4 добу експерименту. Зниження в ішемізованій тканині головного мозку α -токоферолу очевидно пов'язане з двома причинами: порушенням їх доставки внаслідок порушення кровотоку та їх „витратою“ в реакціях ВРО. Таким чином, перев'язка загальної сонної артерії і введення аутокрові викликають адекватне ішемічним пошкодженням пригнічення

функціональних антиоксидантних систем з максимальним виявленням на 1-4 добу експерименту.

Активне протікання в головному мозку індукційованих процесів ВРО, очевидно, обумовлене високим вмістом в ньому фосфоліпідів, олеїнової кислоти і плазміногенів, високим співвідношенням ліпідів /білки, малою кількістю α -токоферолу. Максимальне накопичення продуктів ВРО - дієнових кон'югатів, трієнкетонів і малонового діальдегіду в тканинах головного мозку спостерігалось на 4 добу експерименту при відтворенні на двох моделях ГПМК. Нормалізація цих показників реєструвалася на 7 добу, і головним чином на 15 добу.

Причиною активації ВРО при експериментальному ГПМК є не тільки порушення основних ланок метаболізму і пригнічення функціональних систем антиоксидантного захисту, але й дисбаланс металів перманентної валентності в тканинах головного мозку. Так, на 4 добу експерименту спостерігалось збільшення рівня Fe, Cu, Mn, що є прооксидантами і які беруть участь у всіх системах утворення супероксидрадикалу і гідроксилрадикалу в реакціях Фентона і Габера-Вейса (М.В.Биленко, 1988; И.Ф.Беленичев, 1989). Вивчення активації ВРО в тканинах головного мозку при короткочасній ішемії і реперфузії показало, що реперфузія викликає "сплеск" вільнорадикальних процесів. Ведучим проявом тяжких реперфузійних порушень в тканинах головного мозку є феномен невідновлення кровотоку /no-reflow/ (В.Н.Клименко, И.Ф.Беленичев, 1992). Продукти ВРО володіють бітоксичною дією, обумовленою взаємодією з аміногрупами білків, фосфоліпідів, ДНК, РНК, утворенням міжліпідних, міжбілкових і ліпід-білкових, „поперечних зшивок“ (А.И.Арчаков, 1972). Поява в ліпофільній частині ліпідного шару клітинних мембран гідрофільних перекисних груп розрихлює їх і робить наявні там білкові компоненти доступними для протеолітичних ферментів. Ці процеси сприяють розпаду біомембран.

Порушення цілісності клітинних мембран приводило до збільшення

активності церебральної ізоформи креатинфосфокинази, що фіксувалося в сироватці крові експериментальних тварин.

На 3-5 добу після перев'язки загальної сонної артерії і введення аутокрові у зовнішню капсулу відзначалось різке зменшення об'єму і деформація пірамідних нейронів, що свідчило, перш за все, про виражену ішемічну патологію тканин головного мозку. Порушення загальної гістоструктури характеризувалося різко вираженим периваскулярним, перицелюлярним, опікально-дендритним набряком, значним кровонаповненням судин мозку і накопиченням крові під м'якою мозковою оболонкою.

Вивчення „факторів ризику“ виявлено певні біохімічні передумови ГПМК. Зміни, викликані гіпертензією, активізують процеси ВРО як в міокарді, так і у мозку що, очевидно, пояснюється низькою активністю антиоксидантних ферментів у мозку і більш високим вмістом в ньому ліпідів і тим, що головний мозок є порівняно молодим утворенням в філогенетичному плані і тому менш стійким щодо різних патогенетичних факторів.

Гіпертензія сприяє досить вираженому виснаженню запасів α -токоферолу в тканинах організму. Напевно, це обумовлено повільним виновленням рівня α -токоферолу в тканинах, а надмірна активація метаболізму і збільшення площі біомембран при гіпертензії може посилювати катаболізм токоферолу, який іде на утилізацію ліпоперекислів і стабілізацію фосфоліпідного нашарування мембран. Дані зміни підводять до вітамін Е-діфіцит-залежного ВРО.

В результаті відтвореного емоційно-больового стресу розвивалась активація гіпофізарно-адреналової і адренергічної систем. На певних етапах біосинтезу катехоламонів утворюється активні форми кисню. Висока концентрація активних форм кисню і накопичених продуктів окислення катехоламінів викликає пригнічення ключового антирадикального ферменту-супероксиддисмутази. Крім того,

катехоламіни через адренорецептори активують аденілатциклазну систему клітинних мембран і збільшують входження в клітини іонів кальцію, надлишок яких інгібує каталазу, змінює конформаційну спрямованість фосфоліпідів і активує фосфоліпазу.

Порушення тканинного дихання і окислювального фосфорилування, що відбувається при ЕБС приводить до зменшення фондів АТФ, накопичення в тканинах продуктів його гідролізу і генерації супероксидрадикалу через ксантинооксидантну- ксантинодегідрогеназну систему. Зміни метоболізму, що відбуваються при ЕБС обумовлюють виражене порушення тілісності мембранних, мозкових клітин, про що свідчить високий рівень ВВ-ізоформи КФК.

Таким чином, стан, що сприяє розвитку ГПМК, формує в тканинах головного мозку несприятливий метаболічний фон. При моделюванні ішемії на цьому фоні, поряд з поглибленням вищеназваних порушень, знижується ступінь компенсаторної активації різних адаптаційно-приспосувальних механізмів.

Таким чином, однібічна перев'язка загальної сонної артерії або введення аутокрові у внутрішню капсулу відтворює активацію вільнорадикального окислення адекватно клінічним проявам ГПМК, що дозволяє використати дані моделі для вивчення антиоксидантної і протиішемічної активності сполук і механізму їх дії.

Для вирішення поставлених завдань було досліджено 120 нових сполук, похідних 1,2,4-тріазолу і хіназоліну в дослідах *in vitro* на двох моделях ініціювання ПОЛ і по інгібуванню супероксидрадикалу.

Дослідженням 76 похідних 1,2,4-тріазолу на двох моделях ініціювання ПОЛ і по інгібуванню супероксидрадикала, виявлено, що саме ядро 1, 2, 4-тріазолу без замісників в кільці проявляє помірну антиоксидантну активність.

Вивчення антиоксидантної активності у 21 похідних 3-метил-1, 2, 4-тріазоліл-5- α -тіокарбовоних кислот на моделі ферментативного

ініціювання ПОЛ виявило наявність такої у 19 сполуках, причому 5 речовин за силою ефекту перевершували метіонін і унітіол. Сила антиоксидантного ефекту залежить від характеру кислотного залишку. Похідні 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5- α -тіокарбонових кислот проявляють найбільш виражений антиоксидантний ефект при неферментативному ініціюванні ПОЛ. Так, 17 сполук перевершують активність дібунолу і α -токоферолу. Найбільш сильна дія виявлена у сполук, що мають в положенні 5 залишок тіомасляної кислоти. Виявлено, що сила ефекту збільшується в ряду : кислота-солі-ефіри-гідразид.

Серед 21 сполук 3-метил-1, 2, 4-тріазоліл-5- α -тіокарбонових кислот, 20 гальмують утворення супероксидредикалу при окисненні адреналіну, при чому 8 сполук за силою ефекту перевершують сечовину. Сила антирадикального ефекту залежить від наявності у положенні 5 морфолінія тіоацетат, гідрозиду α -тіомасляної кислоти, її ізобутилового ефіру.

В цьому ряду заслуговують на увагу сполуки E-8252, NAEG, LE-174, LE-164, LE-169, LE-150, LE-226, LE-132, LE-141, LE-134.

Виведення в положення 3 пропілу замість метилу і одержання відповідних сполук 3-метил-1, 2, 4-тріазоліл-5- α -тіокарбонових кислот веде до різкого зниження антиоксидантної активності. Замість карбоксилу в положенні 5 на акілі і одержання 3-пропіл-1, 2, 4-тріазоліл-5-тіоалкілів не приводить до посилення антиоксидантної активності.

Так, всі 13 сполук цього ряду володіють низькою активністю, яка не перевершує еталонну, на всіх моделях ініціювання ПОЛ.

Дослідження антиоксидантної активності в ряду бромідів 1-алкіл-4-іліденаміно-1, 2, 4-тріазоліа в умовах ферментального ініціювання ПОЛ, що з 11 сполук 9 проявляють антиоксидантну активність, причому в 8 сполуках вона вища еталонної. На моделі неферментального ініціювання ПОЛ 9 сполук володіють вираженою антиоксидантною активністю, з них 6 сполук за силою перевершують дію дібунола і α -токоферола.

Високою антиоксидантною активністю володіють сполуки, які мають в пара положенні бензольного ядра метокси-або диметиламіну групу. Антиоксидантна активність залежить від кількості вуглецевих атомів в алкільному заміснику. Оптимальна їх кількість 7 або 9, проте при зменшенні спостерігається зниження антиоксидантної активності. При модельному ініціюванні супероксидрадикалу антиоксидантна активність виявлена у 9 сполук, а у 6 речовин вона перевершує еталонну. Наявність і сила антиоксидальної дії на цій моделі залежить від характеру замісника в положенні 4. Одержання галогенідів 1-карбоксилалкіл-4-бензиліденаміна-1,2,4-тріазолія приводить до деякого зниження антиоксидантної активності при НАДФ·Н₂-залежному ПОЛ. Так, з 14 сполук 5 сполук перевершують активність унітіолу і метіоніну. Здатність гальмувати пероксидацію ліпопротеїдів, яка індуктована сульфатом заліза, володіють 10 сполук, активність котрих вища активності дібунолу і α -токоферолу. З 14 сполук цього ряду 10 здатні інгібувати утворення супероксидрадикалу, що за силою ефекту перевершую сечовину.

Відзначено, що введення в пара положення бензиліденаметокси диметиламіної групи, а в положенні 1 1-карбоксіетилену або 1-карбоксіпропілу підсилює антиоксидальну дію на всіх моделях ініціювання ПОЛ.

Про високу ефективність похідних галогенідів 1-алкіл /карбоксіалкіл/-4-бензиліденаміна-1,2,4-тріазолія свідчить про те, що вони гальмують процеси ПОЛ *in vitro* в концентраціях у 2 рази менших, ніж похідні 3-метил-1,2,4-тріазолія-5- α -тіокарбонових кислот і в 10 разів менших, ніж еталонні препарати. В цьому ряду сполук заслуговують уваги АЕ-401, 341, 345, 347, ЖЕ-81, 86, 87, 91, 110.

Дослідження антиоксидантної активності серед 19 сполук похідних 3-метил - 1,2,4 - тріазолія-4 аміно / бензиліденаміна / - 5 - тіонів / тіоалкідів / виявлено наявність її у 17 сполук при НАДФ·Н₂ індуктованому ПОЛ,

причому 6 сполук по ефективності перевершують метіонін і унітіол. При Fe^{2+} -індукованому ПОЛ 18 сполук проявляють антиоксидантну активність, причому 15 з них перевершують дію дібунола і α -токоферолу. З 19 сполук цього ряду 16 володіють здатністю інгібувати утворення супероксидрадікалу, а 9 сполук за силою дії перевершують ефект сечовини.

Установлено, що сила атиоксидантної дії залежить від характеру замісника, як в 4, так і в 5 положенні 1,2,4-тріазолу. Так, введення в положення 4 п-диметилбензилденаміна, а в положенні 5 тіогептилу або тіононілу підсилює антиоксидантну активність сполук.

Дослідження антиоксидантної активності в ряду 4-оксихіназоліну показало, що серед 16 сполук всі виявляють активність на моделі ферментативного ініціювання ПОЛ, з них 10 сполук за силою ефекту перевершують дію унітіолу та метіоніну. Похідні 4-оксихіназоліну проявляють високу атиоксидантну дію на моделі неферментативного ініціювання ПОЛ. Так у 16 сполук, які володіють антиоксидантною активністю, 10 перевершують дію дібунолу. Всі похідні 4-оксихіназоліну активні по відношенню до супероксидрадікалу, причому 8 сполук перевершують антирадикальний ефект сечовини. На силу антиоксидантної активності впливає введення в положення 3 пропіонової чи ізопропіонової кислоти чи їх амідів.

При введенні нітрогрупи в положення 6 4-оксихіназоліну спостерігається підвищення антиоксидантної активності. Серед 12 сполук цього ряду всі володіють антиоксидантною активністю при НАДФ. H_2 -залежному ПОЛ, причому у 10 сполук ця дія вища еталонної. Всі сполуки активні при Fe^{2+} -залежному ПОЛ, з них 6 сполук перевершують дію дібунолу, а 9 сполук- токоферолу.

Властивістю гальмувати утворення супероксидрадікалу володіють всі похідні 6-нітро-4-оксихіназоліну, 8 сполук перевершують ефект

сечовини.

Введення в положення 3 залишку пропіонової кислоти і одержання її натрієвої і етаноламонієвої солі посилює антиоксидантну активність на всіх моделях ініціювання ПОЛ. Серед 16 сполук похідних 4-амінохіназоліну, 15 сполук гальмують активність реакції ПОЛ при ферментативному ініціюванні, а 11 сполук за силою дії перевершують фармакологічні стандарти. На моделі неферментативного ініціювання ПОЛ всі сполуки володіють антиоксидантною активністю, 15 речовин за силою ефекту перевершують α -токоферол, а 13-дібунол.

Всі сполуки 4-амінохіназоліну інгібують утворення супероксидрадикалу з них 4 речовини перевершують ефект сечовини.

Встановлено, що введення в положення 4 N-ацетилгідразиду, п-амінобензойної кислоти і її солей з органічними основами перевершує антиоксидантну активність на всіх моделях ініціювання ПОЛ *in vitro*.

В результаті досліджень в ряду похідних 1, 2, 4-тріазолу і хіназоліну в дослідах *in vitro* було відібрано сполуки, що проявляють високу антиоксидантну активність і являють інтерес для більш глибокого фармакологічного вивчення.

Для вивчення антиоксидантних властивостей в умовах цілісного організму на моделі експериментального ГПМК було відібрано 23 сполуки похідних 1,2,4-тріазолу і 6 сполук похідних хіназоліну.

Всі досліджені сполуки при їх внутрішньочеревному введенні відносяться до малотоксичних або практично нетоксичних сполук. Найнижчою токсичністю володіють 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5- α -тіакарбонівих кислот. Похідні 1-алкіл /карбоксил-алкіл/-4-безиліденаміно-1,2,4-тріазолія броміду і похідні хіназоліну відносяться до класу малотоксичних сполук. Курсове призначення 10 сполук похідних 1-алкіл /карбоксил-алкіл/-4-безиліденаміно-1,2,4-тріазолія броміду щурам з однією переузкою загальної сонної артерії приводить до гальмування вільнорадикальних процесів в ішемізованій півкулі

головного мозку. Всі вивчені сполуки володіють антиоксидантною активністю, причому 9 з них за силою ефекту перевершувала дібунол і α -токоферол. Похідні 1-алкіл /карбоксилалкіл/-4-бензиліденаміно-1,2,4-тріазолія броміду реалізують свій антиоксидантний ефект на ініціальних етапах ВРО за рахунок активації антиоксидантних ферментів /супероксиддисмутази, каталази, глутатіон-пероксидази/ і захист ендогенних резервів α -токоферолу, що вигідно їх відрізняє від стандартних антиоксидантів. Найбільшу активність проявляють сполуки АЕ-401, 341, і ЖЕ-81, 86.

Досліджені сполуки по своїй структурі відрізняються характером замісника в 1 і 4 положеннях ядра 1,2,4-тріазолу. При зіставленні рівня активності сполук з характером радикалу в положенні 4 виявляється чітка закономірність „структура-дія“. Так при наявності в пара положенні бензонального ядра замісника диметаламінної -/АЕ-401, 345, ЖЕ- 86,110/ або метоксигрупи /ЖЕ-81/ приводить до різкого збільшення антиоксидантної, а особливо антирадикальної активності. Модифікація сполук шляхом заміни радикала в положенні 1 також виявляється на їхній антиоксидантній активності. Так, у сполук ЖЕ-81, 79, 86, 87, АЕ-401, 341, які мають в цьому положенні вуглецевий ланцюг з парною кількістю атомів вуглецю спостерігається підсилення антиоксидантної дії. У речовин з непарною /АЕ-347, ЖЕ-91/ кількістю атомів вуглецю відбувається парне його зниження. Збільшення числа вуглецевих атомів в положенні 1, що приводить до підвищення ліпофільності, збільшує антиоксидантні властивості сполук.

В механізмі антиоксидантної дії 1-алкіл /карбоксил-алкіл/-4-бензиліденаміно-1,2,4-тріазолія броміду лежить їхня здібність інгібувати активні форми кисню і ліпідні радикали за рахунок відновлюючих властивостей бензилідена і гальмувати шляхи утворення вільних радикалів кисню, що нормалізує порушення тонких ланок метаболізму. Так, спостерігалася нормалізація окремих ланок вуглеводно-енергетичного

обміну, причому сполуки АЕ-401, 341, і ЖЕ-81, 87 за силою дії конкурували з пірацетамом. Важливим моментом в протиішемичній дії наведених сполук було те, що збільшення АТФ відбувалося на тлі збільшення вмісту його попередника АДФ і зниження АМФ.

Похідні 1-алкіл/карбоксилалкіл/-4-безиліденаміно-1,2,4-тріазолія броміду здатні інгібувати утворення активних форм кисню при взаємодії з адренергичними рецепторними структурами. Так, сполуки АЕ-401, 347, 341, ЖЕ-81, 86, 87 за силою - антиадренергичної активності перевершують анаприлін (И.А.Мазур, 1991; И.Ф.Беленичев та інші, 1992).

Паралельними дослідженнями були виявлені високі антиглаукома, антигіпертензивна, антиаритмічна і утеротонічна активність (И.А.Мазур, 1991; И.Ф.Беленичев та інші, 1993; Н.С.Луценко та інші 1995), що доводить їх β -блокуючу дію.

Порівняльна оцінка фармакологічних і фізико-хімічних властивостей сполук цього ряду виявляють найбільш перспективність сполуки АЕ-401 як антиоксидантного і β -адреноблокуючого засобу, що підтверджено доклінічними дослідженнями.

Всі 10 сполук похідних 1-алкіл /карбоксил-алкіл/ -4-безиліденаміно-1, 2, 4-тріазолія броміду володіють церебропротективною активністю, яка у 7 сполук вища активності пірацетама.

Похідні 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5- α -тіакарбонивих кислот проявляють широкий спектр біологічної активності- описані їхня висока антигіпоксична, ранозагоююча, гепатопротективна і кардіопротективна активність (С.М.Дроговоз, 1987; В.Р.Стец, 1988).

Дослідження показали, що всі 13 сполуки в тій або іншій мірі володіють антиоксидантною активністю при експериментальній ішемії головного мозку і по мірі ефективності або перевершують, або конкурують з дібунолом і α -токоферолом. Найбільш ефективна сполука Е-8252 /„Тіотріазолін“/, NaEG, ЛЕ-174, 226 . Сполуки цього ряду реалізують

свою антиоксидантну дію на всіх етапах вільнорадикального окислення, що активує як антирадикальні /супероксиддисмутази і каталазу/ так і перекисні /глутатіонпероксидазу/ ферменти, зменшуючи витрату ендогенного α -токоферолу, знижуючи утворення продуктів ПОЛ-дієнових кон'югатів, триєнкетонів і малонового діальдегіду. Порівняльний аналіз антиоксидантної дії в досліджуваному ряду сполук показує, що сила ефекту визначається характером замісника, пов'язаного з атомом сірки в положенні 5 ядра тріазолу, зокрема характером карбонової кислоти /оцтової, капронової, масляної/. Найвищою активністю володіють сполуки, які містять в цьому положенні отцтову /E-8252, NaEG/ і особливо масляну /ЛЕ-174, 226/. Це пояснюється важливою роллю масляної кислоти в обмінних процесах головного мозку і її впливом на ГАМК-ергічну систему (К.С.Раевский, 1984).

В механізмі антиоксидантної дії похідних 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5- α -тіакарбонових кислот лежить їх здатність інгібувати шляхи утворення активних форм кисню за рахунок нормалізації порушення окремих ланок метаболізму. Так, надзвичайно важливим моментом в дії досліджуваних сполук було збільшення рівня АТФ на тлі збільшення вмісту його попередника АДФ і зменшення кількості АМФ, причому 5 сполук перевершують або конкурують з ефектом пірацетаму. Посилення енергопродукції відбувалося за рахунок активації як аеробних, так і анаеробних шляхів окислення глюкози.

Знижуючи вміст лактату, похідні 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5- α -тіакарбонових кислот переводять некомпенсований метаболічний ацидоз в компенсований, тим самим зменшуючи його прооксидну дію (В.С.Тишкин, 1991).

Антиоксидантний ефект може бути реалізований за рахунок комплексоутворюючих властивостей карбоксилу, здатного зв'язувати метали змінної валентності, запобігаючи ініціюванню реакцій Фентона і Габера-Вейса (И.Н.Башкин, И.Ф.Беленичев, 1989).

Не виключена можливість впливу похідних 3-метил-1,2,4-тріазоліл-5-тіокарбонічних кислот на репараційні процеси в організмі і підвищення адаптаційних властивостей організму в цілому, що може підтверджуватися наявністю в них протеїнсинтетичної, анаболічної, протівірусної, імуномодулюючої і ранозагоюючої активності (И.А.Мазур, 1985; С.М.Дроговоз, 1988; В.Р.Стец, 1988; Б.С.Безуглий, 1995). 13 сполук цього ряду проявляють церебропротективну активність, а 10 сполук за силою дію перевершують пірацетам. Проведені дослідження антиоксидантної дії 6 сполук похідних хіназоліну виявили у них наявність її. Причому, по ефективності ці сполуки перевершують дію α -токоферолу і дібунолу.

Найвищу активність проявляють похідні 6-нітро-4-оксихіназоліну /КС-130, 131/. Похідні хіназоліну реалізують свою антиоксидантну дію на ініціальних етапах вільнорадикального окислення, що активує антиоксидантну систему, захищаючи ендogenous резерв α -токоферолу.

Нами припущено, що основною ланкою в механізмі антиоксидантної активності похідних хіназоліну є гальмування шляхів утворення активних форм кисню при викиді і метаболізмі катехоламінів, що доводиться наявністю у них адреноблокуючою, антиглаукомної і утеротонічної активності (И.А.Мазур, И.Ф.Беленичев, 1994). Заслугує уваги і їх здатність взаємодіяти з активними формами кисню, за рахунок електронноакцепторних властивостей замісника. Всі похідні хіназоліну володіють церебропротективною активністю, що перевершує по ефективності пірацетам.

Проблемою фармакологічного протиішемічного захисту органів є застосування засобів захисту не лише в лікувально-профілактичному режимі, але й необхідність постішемічного впливу, спрямованого на зменшення реперфузійних пошкоджень. Дослідження 4 сполук 1,2,3-тріазолу і хіназоліну /АЕ-401, тіотріазолін, КС-79, КС-130/ на моделі гострої ішемії і реперфузії головного мозку, викликаній тимчасовим

виключенням кровотоку в брахіоцефальних артеріях, показало наявність антиоксидантної дії у всіх сполуках. Їстотним моментом в дії цих речовин була нормалізація окремих ланок вуглеводно-енергетичного обміну, гальмування вільнорадикальних процесів, зменшення кількості ішемічно змінених нейронів. Встановлено, що сполука АЕ-401 найбільш активна в гострий період ішемії і реперфузії, а тіотріозолін в реабілітаційній.

Дослідження антиоксидантної і протиішемічної дії інтеркаратидної інфузії 4 похідних 1,2,4-тріазолу і хіназоліну при довготривалій ішемії і реперфузії головного мозку показала їх високу захисну дію, яка перевершує ефект пірацетаму.

В ішемізованих тканинах кори головного мозку спостерігалось гальмування вільнорадикальних процесів, підвищення активності антиоксидантних ферментів, покращення енергетичного статусу клітин головного мозку. Виявлено зниження набряків, збереження ендотемії нейронів і зниження гліального індексу в корі головного мозку. Найбільшу активність проявляли інфузійні розчини, які містять тіотріозолін і АЕ-401. Помірна оксигенізація інфузійних розчинів посилювала їхній лікувальний ефект.

Останнім часом антиоксидантні засоби знайшли широке застосування в офтальмологічній практиці при лікуванні окклюзивних пошкоджень судин сітківки і зорового нерва.

Дослідженнями, які проводилися вченими Запорізького державного медичного університету та Української фармацевтичної академії (С.М.Дроговоз, 1988; Т.С.Сарбаш, 1991; С.И.Сальникова, 1991; В.Р.Стец, 1992; В.С.Тишкин, 1992; И.Н.Башкин, 1995) встановлено, що тіотріозолін володіє високою антиоксидантною і протиішемічною активністю на різних моделях експериментальної патології і в клініці.

Призначення тіотріозоліну /1,0 і 2,5% розчину для ін'єкцій / хворим з ішемічною оптикопатією і тромбозом вен сітківки в комплексній терапії, за даними клініцистів (С.Ф.Максименко,1995), нормалізувало функції

зорово-нервового апарату : підвищення гостроти зору, зменшення скатом, покращились показники церебральної гемодинаміки.

Результати лабораторно-біохімічних досліджень, які були нами отримані, корелювали з даними клініцистів.

Встановлено, що курсове призначення тіотріозоліну гальмувало реакції ВРО, підвищувало фонд α -токоферолу, нормалізувало основні показники вуглеводно-енергетичного обміну за рахунок активації анаеробних реакцій і підвищення енергопродукції (И.Ф.Беленичев, 1995; С.Ф.Максименко, 1995).

Медикаментозна терапія загальноприйнятими засобами була менш ефективною.

Ефективність лікування хворих з ішемічною оптикопатією і тромбозом вен сітківки з використанням нового препарату тіотріозолін пояснюється значним поліпшенням обмінних процесів в тканинах сітківки і зорового нерва, обумовлених його дією на тонкі ланки метаболізму і його здатність реагувати антиоксидантну систему, посилювати репараційні процеси в ішемізованих тканинах.

ВИСНОВКИ

1. Перев'язка загальної сонної артерії і введення аутокрові в ділянку внутрішньої капсули викликають порушення лімітуючих ланок обміну речовин, приводять до активації вільнорадикального окислення, яке в значній мірі аналогічне клінічним проявам ГПМК на різні строки ішемічного пошкодження тканин головного мозку, що дозволяє використовувати дані експериментальної моделі для фармакологічних досліджень в плані цілеспрямованого пошуку речовин, які володіють антиоксидантною і протиішемічною активністю.

2. Зміна вмісту продуктів вільнорадикального окислення і ендогенних антиоксидантів в плазмі крові корелює зі змінами, які виникають в ішемічно „пошкоджених“ тканинах, що дозволяє використовувати показники активності вільнорадикального окислення в плазмі крові для

діагностики і оцінки ефективності терапії, яка проводиться.

3. Серед 76 сполук, які є похідними 1,2,4-тріазолу, 66 проявляють антиоксидантну активність в досліджах *in vitro* при ферментативному ініціюванні ПОЛ, з них 28 за силою ефекту перевершують унітіол і метіонін, 69 проявляють антиоксидантну активність при неферментативному ініціюванні ПОЛ, з них 52 перевершують за силою дії дібунолу і α -токоферол, 68 сполук інгібують утворення супероксидрадикалу, 34 з них перевершують ефект сечовини.

4. Серед 44 сполук, які є похідними хіназоліну, 43 проявляють антиоксидантну активність в досліджах *in vitro* при неферментативному ініціюванні ПОЛ, з них 30 перевершують за силою дії унітіол і сечовину, 44 проявляють антиоксидантну активність при неферментативному ініціюванні ПОЛ, 36 з них перевершують ефект дібунолу і α -токоферолу, всі сполуки активні по відношенню до супероксидрадикалу, з них 20 за силою дії перевершують сечовину.

5. З 23 сполук похідних 1,2,4-тріазолу, 19 проявляють антиоксидантну активність на моделі ішемії головного мозку, що перевершує за силою дії ефект дібунолу і α -токоферолу.

6. Серед 23 сполук похідних 1,2,4-тріазолу, 18 проявляють виражену церебропротективну активність на моделі ішемії головного мозку, що перевершує за силою дії ефект пірацетаму.

7. Всі 6 сполук похідних хіназоліну володіють антиоксидантною і церебропротективною активністю при односторонній перев'язці загальної соної артерії, що перевершує за силою дії ефект дібунолу і пірацетаму.

8. Всі 4 сполуки похідних 1,2,4-тріазолу і хіназоліну проявляють виражений антиоксидантний і церебропротективний ефект, що перевершує ефект пірацетаму при гострій ішемії і реперфузії головного мозку.

9. Похідні 1,2,4-тріазолу і хіназоліну реалізують свій антиоксидантний ефект на ініціальних етапах вільно-радикального окислення, яка реактивує

антиоксидантну ферментну систему, що вигідно їх відрізняє від антиоксидантів „прямого“ типу дій-дібунолу і α -токоферолу.

10. В механізмі антиоксидантної дії 1,2,4-триазолу лежить як їхня здібність елемінувати активні форми кисню так і гальмувати шляхи їхнього утворення за рахунок нормалізації окремих ланок вуглеводно-енергетичного обміну в ішемізованих тканинах.

11. В механізмі антиоксидантної дії похідних 1-алкіл(карбоксиалкіл)-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолія броміду має місце антиадренергічний ефект, з 10 сполук, 6 за силою дії перевершують β -блокатор анаприлін.

12. Похідні хіназоліну проявляють антиоксидантний ефект за рахунок інгібування як активних форм кисню, так і окремих шляхів їх утворення.

13. Виявлена деяка закономірність „структура-дія“.

13.1. Для антиоксидантного ефекту похідних 1, 2, 4 -триазола має значення наявність в структурі залишків тіоцтової, тіокапронової, тіомасляної, а також п-диметиламінобезиліденаміно і п-диетиламінобезиліденаміна.

13.2. Для антиоксидантного ефекту похідних хіназоліну має значення наявність в структурі ацилгідразиду, залишків оцтової кислоти і нітрогрупи.

14. Інфузійне застосування 4 сполук похідних 1,2,4-тріозола і хіназоліна чинить виражений антиоксидантний і протиішемічний ефект як в період ішемії головного мозку, так і в віддалені строки.

15. Доклінічне дослідження сполуки АЕ-401 показало на його високу антиоксидантну та антиадренергетичну активність.

16. Результати клінічних досліджень показали, що курсове призначення тіотріазоліну хворим з ішемічною оптикопатією і тромбозом гілок центральної вени сітківки знижувало активність реакцій перекисного окислення ліпідів, нормалізувало окремі ланки вуглеводно-енергетичного обміну, покращувало клінічний статус хворих.

Практичні рекомендації

1. Доцільним є використання експериментальних моделей ГПМК, які викликані односторонньою перев'язкою загальної сонної артерії і введенням аутокрові у внутрішню капсулу головного мозку для вивчення антиоксидантної і протиішемічної дії знову синтезованих сполук.

2. Для цілеспрямованого виявлення речовин з антиоксидантною активністю доцільно використовувати методи *in vitro*, в основі яких лежать ферментативні і неферментативні способи ініціювання вільнорадикальних процесів, а також по інгибуванню супероксидрадикалу.

3. В гострий період ішемії головного мозку рекомендується використовувати 16 сполук похідних 1,2,4-тріазолу і 6 сполук похідних хіназоліну, які володіють антиоксидантною дією за рахунок інгибування різних шляхів утворення активних форм кисню.

4. В гострий період ішемії і реперфузії рекомендується використовувати 4 сполуки похідних 1,2,4-тріазолу і хіназоліну, які володіють антиоксидантною і церебро протективною дією.

5. При гострому порушенні мозкового кровообігу рекомендується використовувати інтеркаротидну інфузію оксигенованих розчинів антиоксидантів похідних 1,2,4-тріазолу і хіназоліну.

6. Рекомендується використовувати сполуку 1-(1- β -етілфеніл)-4-(п-диметилбензиліденаміно)-1,2,4-тріазоліа броміду (АЕ-401) як антиадренергічного, утеротонічного, антиглаукомного і антиоксидантного засобу.

7. Рекомендується використовувати антиоксидантний і протиішемічний засіб „Тіотріозолін“ (1,0 і 2,5 % розчин для ін'єкцій) в комплексній терапії для лікування хворих з ішемічними оптикопатіями і тромбозом гілок центральної вени сітківки.

Перелік основних друкованих робіт по темі дисертації

1. Антиоксидантна і протиішемічна активність іліденгідразидів (3,4-дигідро-4-оксохіназоліл-3)- α пропіонової кислоти // Фармац. журн.-1992- № 5, 6- С.38-41 (співавт. С.І.Коваленко, І.А.Мазур, Р.С.Синяк).

2. Антиоксидантная активность нового производного 4-гидразинохиназолина при экспериментальной гипоксии головного мозга // Укр. биохим. журн.-1993-т.63- №3-С.118-122 (співавт. В.В.Дунаєв, І.А.Мазур, В.А.Візір).

3. Медикаментозная защита головного мозга при выполнении операций на плечеголовных артериях // Клін. хірургія-1993-№7, 8- С.14-17 (співавт. В.Н.Кліменко, І.Н.Башкін, В.А.Шаврін).

4. Медикаментозная защита головного мозга при моделировании ишемии и реперфузии // Клін. хірургія-1993-№12- С.50-53 (співавт. В.Н.Кліменко, І.Н.Башкін, В.А.Візір).

5. Состояние антиоксидантной системы у больных глаукомой в сочетании с гипертонической болезнью // Укр. кардиол. журн.-1994-№4- С.94 (співавт. Н.С.Луценко).

6. Влияние капотена на состояние антиоксидантной системы у больных гипертонической болезнью II стадии // Укр. кардиол. журн.-1994-№4-С.96 (співавт. В.А.Візір, Н.Ф.Башкіна).

7. Антиоксидантна активність похідних (3,4-дигідрохіназоліл-3-ОН-4) карбонових кислот // Фармац. журн.-1995-№1-С.82-85 (співавт. В.В.Дунаєв, І.А.Мазур, Р.С.Синяк).

8. Влияние вещества замещенного 1,2,4-триазола на состояние внутриглазного давления (экспериментальное исследование) // Офтальмол. журн.-1995-№3-С.155-157 (співавт. Н.С.Луценко, І.А.Мазур, Н.А.Волошин).

9. Клиническое применение нового антиоксиданта тиотриазолина при ишемических офтальмопатиях // Эксперимент. и клин. фармакология.-

1995.-№3.-С. 59-63. (співавт. І.А.Мазур, С.Ф.Максименко, Д.А.Тараненко).

10. Синтез і властивості похідних (3,4-дигідрохіназолон-4-іл-3)- α -пропіонової кислоти // Вісник фармації-1995-№3-4-С. 29-34 (співавт. І.А.Мазур, С.І.Коваленко, Р.С.Синяк).

11. Комплексная оценка антиоксидантной активности in vitro производных (3,4-дигидрохиназолон-4-ил-3)- α ; β -карбоновых кислот // Фармаком-1995-№5-6-С.40-43 (співавт. І.А.Мазур, С.І.Коваленко, Р.С.Синяк).

12. Клінічні аспекти застосування в офтальмологічній практиці нового протиішемічного антиоксидантного препарату тиотриазолін при гострій судинній оптичній нейропатії // Ліки.-1995.-№6.-С.133-136. (співавт. І.А.Мазур, С.Ф.Максименко).

13. Изучение влияния производных 4(3Н)-хиназолина на матку крыс // Фармаком-1995-№11-12-С.15-17 (співавт. В.Н.Фаворітов, В.В.Дунаєв, С.І.Коваленко).

14. Активация свободно-радикального окисления у больных гипертонической болезнью II стадии // Тер. архив-1995-Т.56-№12-С.17-18 (співавт. А.Д.Візір, Н.Ф.Башкіна, Д.А.Тараненко).

15. Состояние гематоэнцефалического барьера при инсультах у больных с артериальной гипертензией в условиях фармакокоррекции // Врач.дело.-1995.-№5-6.-С.124-126. (співавт., В.В.Дунаєв, І.А.Мазур, В.Н.Клименко).

16. Влияние антиоксиданта тиотриазолин на состояние углеводно-энергетического обмена у больных с ишемическими оптикопатиями // Офтальмол. журн.-1996-№1-С.32-35 (співавт. С.Ф.Максименко, І.А.Мазур, Т.С.Міхальчик).

17. Изменение активности глутатионпероксидазы у больных с окклюзионными поражениями сосудов сетчатки и зрительного нерва // Офтальмол. журн.-1996.-№3.-С.151-153 (співавт. С.Ф.Максименко).

18. А.С.1586147 СССР, МКИ⁵СО7Д 403/12, А61К31/505 никотинат 4-(1-фенил-2,3-диметилпиразолон-5-ил-4)аминохиназолина, проявляющий кардиотропное и ранаозаживляющее действие-4638868/30. 04-Заявлено 07. 12. 88 (співавт. Р.С.Синяк, С.І.Коваленко, В.С.Тішкін).

19. А.С.1586148 СССР, МКИ⁵СО7Д 403/12, А61К31/50 Цитрат 4-(1-фенил-2,3-диметилпиразолон-5-ил-4) аминахиназолина гидрат, проявляющий кардиотропное действие-4630791/30. 04 - Заявлено 01. 12. 88. (співавт. Р.С.Синяк, С.І.Коваленко, В.С.Тішкін).

20. А.С.1586167 СССР, МКИ⁵СО7Д 249/08, А61К31/41 Бромид 1-(1-карбоксіпропил)-4-бензилиденамино-1,2,4-триазолия, обладающий антикоагулянтной и фибринолитической активностью.-4727419/04.- Заявлено 07. 07. 88. (співавт. І.А.Мазур, Є.Г.Книш, Н.А.Авраменко).

21. А.С.1609091 СССР, МКИ⁵СО7Д 249/94, А61К31/41. Малеинат 4-(1-фенил-2,3-диметилпиразолон-5-ил-4)аминохиназолина, проявляющий кардиотропную, ранаозаживляющую и противовоспалительную активность-4617710/30. 04. Заявлено 07. 12. 88 (співавт. Р.С.Синяк, С.І.Коваленко, В.П.Георгієвський).

22. А.С.1623145 СССР, МКИ⁵СО7Д 249/12, А61К31/41. Морфолиний 3-метил-1,2,4-триазоліл-5-тиомасляной кислоты, обладающий ангишемической активностью 4686971/30. 04. Заявлено 03. 05. 89 (співавт. Л.Г.Черковська, І.А.Мазур, Є.Г.Книш).

23. А.С.1637254 СССР, МКИ⁵СО7Д 249/08, А61К31/41. Бромид 1-(1-карбоксіэтил)-4-(п-диметиламинобензинденамино)-1,2,4-триазолия, обладающий антиоксидантной активностью.-4728757/30. Заявлено 07. 08. 89 (співавт. І.А.Мазур, Є.Г.Книш, Н.А.Авраменко).

24. А.С.1638993 СССР, МКИ⁵СО7Д 249/08, А61 К31/41. Бромид 1-гептил-4-(п-диметиламинобензинденамино)-1,2,4-триазолия, обладающий антикоагулянтной и фибринолитической активностью.-4687495/04.-

Заявлено 03. 05. 89 (співавт. І.А.Мазур, Є.Г.Книш, Н.А.Авраменко).

25. А.С.1681498 СССР, МКИ⁵СО7Д 249/08, А61 К31/41. Бромид 1-(1-карбокситропил)-4-(п-диметиламинобензинденамино)-1,2,4-триазолия, обладающий противоишемической активностью-4710046/04. Заявлено 22. 06. 89. (співавт. І.А.Мазур, Є.Г.Книш, О.О.Жовниренко).

26. А.С.1685079 СССР, МКИ⁵СО7Д 249/12, А61 К31/41. Моноэтанол-амоний 3-метил-1,2,4-триазолил-5-тиокарбонových кислоты, обладающий антиишемической, фибринолитической и антиоксидантной активностью.-4746707/04. Заявлено 09. 10. 89. (співавт. Л.Г.Черковская, І.А.Мазур, Є.Г.Книш).

27. А.С. 1704434 СССР, МКИ⁵СО7Д 403/04, А61 К31/505. 4-[1,2-дифенил-4-(4,4-диметил-3-оксопентил)-пиразолидин-3,5-дион-4-ил]-хиназолин, проявляющий антиоксидантную, церебропротекторную активность-4876129/04. Заявлено 20. 03. 90. (співавт.Р.С.Синяк, С.І.Коваленко, І.А.Мазур).

28. А.С. 1750172 СССР, МКИ⁵СО7Д 239/86, А61 К31/495. 4-(N-ацетил)гидродинохиназолин, проявляющий антиоксидантную и церебропротекторную активность. 4876129/04.-Заявлено 22. 10. 90. (співавт.Р.С.Синяк, С.І.Коваленко, І.А.Мазур).

29. А.С. 1750173 СССР, МКИ⁵СО7Д 239/94, А61 К31/495. Моноэтаноламмониевая соль 4-(4-карбоксифенил)аминохиназолина, оказывающая антиоксидантное действие 4874846/04- Заявлено 16. 10. 90.- (співавт.Р.С.Синяк, С.І.Коваленко, І.А.Мазур).

30. А.С. 1769518 СССР, МКИ⁵СО7Д 249/94, А61 К31/41. Бромид 1-октил-4-(п-диметиламинобензинденамино)-1,2,4-триазолия, обладающий антиоксидантной активностью №4860732/04. Заявлено 27. 06. 90. (співавт. І.А.Мазур, Є.Г.Книш, Н.А.Авраменко).

31. А.С. 1790177 СССР, МКИ⁵СО7Д 239/94, А61 К31/495.

Диэтаноламинная соль 4-(3-окси-4-карбоксифенил) аминохиназолина, оказывающая антиоксидантное действие-4868443/04.- Заявлено 25. 09. 90. (співавт.Р.С.Синяк, С.І.Коваленко, І.А.Мазур).

Аннотация

Беленичев Игорь Федорович. Изучение антиоксидантных свойств в ряду производных пяти- и шестичленных азогетероциклов в условиях моделирования ишемических реперфузионных поражений тканей головного мозга: Диссертация (рукопись) на соискание ученой степени доктора биологических наук.-14.03.08-фармакология. Одесский государственный медицинский университет.-Одесса, 1996.

Работа выполнена в Запорожском государственном медицинском университете.

Защищается рукопись докторской диссертации и 64 печатных работы и 14 авторских свидетельств, которые содержат экспериментальные исследования антиоксидантной и противоишемической активности 120 соединений производных 1,2,4-триазола и хиназолина как в опытах *in vitro* при различном иницировании СРО, так и при экспериментальной ишемии головного мозга. Установлено, что данные соединения реализуют свой антиоксидантный эффект при инициальных этапах свободно-радикального-перекисного окисления липидов, реактивируют антиоксидантные ферменты, защищают запасы эндогенных антиоксидантов. В механизме антиоксидантного действия, изученных соединений лежит их способность реагировать с активными формами кислорода и тормозить основные пути их образования за счет нормализации основных звеньев углеводно-энергетического обмена и неспецифического антиадренергического эффекта.

Synopsis

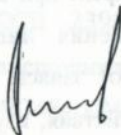
Igor Fyodorovich Belenichev. The study of antioxidant properties in the rank of 5- and 6- nominal azoheterocycles derivatives under condition of simulated ischemic and reperfusional lesions of cerebral tissues.

Thesis (manuscript) for a Doctor's Degree in Biology.
10.03.08.-Pharmacology.

Odessa State Medical University, Odessa, 1996.

The presented research work has been executed in Zaporozhye State Medical University. 64 published works and 14 author's certificates are submitted, they contain the experimental investigation findings of antioxidant and antischemic activity of 120 compounds 1,2,4-triazol and quinoxaline derivatives both in vitro with different FRO initiating, and in experimental cerebral ischemia. It was determined, that the above-mentioned compounds realize their antioxidant effect during the initial stages of lipids, reactivate antioxidant enzymes, protect the stocks of endogenous antioxidants. The mechanism of antioxidant effect of the investigated compounds consist in the ability to respond by the active form of oxygen and to inhibit the principal means of their formation owing to normalization of the main links of carbohydrate-energy metabolism and non-specific antiadrenergic effect.

Ключові слова: 1,2,4-тріазолі, хіназоліни, антиоксиданти, гострі порушення мозкового кровообігу.



АВ. 32. 858

Бумага офсетная. Тираж 100. Ксерокопия.
Заказ 437. Подписано к печати 24.09.96г.

Отпечатано в типографии ЗГМУ.
330035, г. Запорожье, ул. Маяковского, 26.

УУУУУ

