

*Ю.І.Губський, чл. — кор.АМН України, Н.В.Літвінова, д.м.н.,
Г.Г.Горюшко, к.х.н., І.Ф.Беленічев, д.б.н.,
Т.М.Курапова, к.б.н., С.І.Коваленко,
Н.М.Курська, О.М.Величко*

АНТИОКСИДАНТНІ ТА МЕМБРАНОЗАХИСНІ ВЛАСТИВОСТІ S-ВМІСНИХ ПОХІДНИХ ХІНАЗОНІВ ЗА УМОВ УРАЖЕННЯ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

Інститут фармакології та токсикології АМН України, Київ

Фармакологічну активність сірковмісних гетероциклічних похідних хіназолонів, їх здатність до інгібування вільно-радикальних реакцій у тканинах мозку було показано раніше [1-3]. Для деяких сполук даного класу було визначено їх вплив на стан ліпопереокислення у фракціях репресованого та транскрипційно активного хроматину клітин печінки за умов ураження щурів тетрахлорметаном: високі антиоксидантні властивості, особливо для сполук НКС-153 і NC-109 [4]. Дослідження фізико-хімічних показників фракцій хроматину методами флуоресцентного зондування визначили здатність даних сполук до структурної модифікації компонентів фракцій хроматину (ланцюгів ДНК, негістонових білків, гістонів та ін.). Мембранотропність цих сполук, їх здатність до захисту біомембран клітин при ураженні ксенобіотиками досі не відомі.

Мета роботи — вивчення впливу нових S-вмісних похідних хіназолонів (сполук НКС-153 та NC-109) у порівнянні з дибунолом на стан ліпопереокислення в ізольованих мембранах ендоплазматичного ретикулуму (ЕР) за умов ураження тварин тетрахлорметаном (ТХМ), їх лікувально-профілактичної дії та здатності до структурної модифікації мембран ЕР.

Матеріали та методи

Сірковмісні похідні хіназолонів, сполуки НКС-153 і NC-109, були

синтезовані в Державному запорізькому медичному університеті.

З метою порівняння за однакових умов досліджено також фенольний антиоксидант дибунол. Експерименти проводили на щурах-самцях лінії Вістар 3-місячного віку з масою тіла 150-200 г. Тетрахлорметан вводили одноразово внутрішньоочеревинно у дозі 1 ЛД₅₀ (1,75 мг/кг маси тіла). Тварин декапітували під ефірним наркозом через 24 год після введення ТХМ. Мембрани ендоплазматичного ретикулуму (ЕР) клітин печінки щурів виділяли методом диференційного центрифугування [5]. Концентрацію білку визначали за методом Лоурі [6].

Досліджували 5 груп тварин: 1 — інтактні тварини (контроль); 2 — отруєння ТХМ (дослід) і 3 — 5 — отруєння ТХМ + одне з похідних хіназолону (НКС-153 або NC-109) або дибунол. Інтактним щурам вводили внутрішньоочеревинно 0,9% ізотонічний розчин NaCl. Досліджувані сполуки вводили також внутрішньоочеревинно в дозі 1/10 ЛД₅₀ (НКС-153 — 50 мг/кг, NC-109 — 160 мг/кг, дибунол — 89 мг/кг маси тіла) двічі: за 1 год до отруєння та через 2 год після отруєння. Стан процесів ПОЛ в ізольованих мембранах ЕР вивчали за вмістом первинних молекулярних продуктів переокислення — кон'югованих дієнів (КД) та триєнів (КТ), кінцевих флуоресціюючих продуктів ПОЛ. Швидкість накопичення малонового діальдегіду

(МДА) оцінювали за умов спонтанного (неініційований контроль, НК) та індукovanого НАДФН і аскорбатом ПОЛ (НЗП і АЗП, відповідно). Оцінку антиоксидантної активності досліджуваних сполук проводили також методом залізоініційованої біохемілюмінесценції (БХЛ) [7-9]: вимірювали інтенсивність біохемілюмінесценції швидкого спалаху (I1), зумовленого розкладанням гідроперекисів, та площу світлосуми (S), що характеризує загальний вміст продуктів ПОЛ у системі. Виміри проводили на біохемілюмінометрі БХЛ-06 з фотопідсилювачем ФЕП-79. Вплив даних сполук на фізико-хімічні показники, що відображають структурні зміни поверхні мембран, білків, білково-ліпідного контакту та рухомості ліпідного бішару в мембрані, визначали методами флуоресцентного зондування, гасіння білкової (триптофаної) флуоресценції дифузійним гасником акриламідом [10-12]. У роботі застосовували спектрофотометр СФ-16 та спектрофлуориметр Hitachi MPF-4 (Японія). Статистичну обробку експерименту проводили відповідно [13,14].

Результати та обговорення

Вміст продуктів ПОЛ у мембранах ЕР клітин печінки щурів за умов отруєння ТХМ та лікувально-профілактичної дії досліджуваних сполук наведено в табл. 1.

Як видно, за умов лікувально-профілактичного введення отруєним тваринам досліджуваних сполук більшість показників вмісту первинних молекулярних продуктів ПОЛ у мембранах ЕР не зазнає суттєвих змін. Виключення становить вміст кон'югованих триєнів (КТ) у ізопропанольному шарі екстрактів, яке вірогідно підвищується (на 37 % у порівнянні з інтактним контролем) за умов введення тваринам сполуки НКС-153. У гептановому шарі при введенні дибунолу і сполуки НКС-153 спостерігається тенденція до деякого зниження вмісту КТ і лише при введенні тваринам сполуки NC-109 визначено достовірне зниження цих продуктів (на 70 % порівняно з контролем). Відносний вміст кінцевих продуктів ліпопереокислення, так званих шиффових основ, достовірно зменшується порівняно з контролем у групах отруєних тварин,

Вміст продуктів ПОЛ у мембранах ЕР клітин печінки щурів за умов отруєння ТХМ та застосування S-вмісних похідних хіназолонів

Показники	Екстрагент	Контроль	ТХМ	ТХМ + дибунол	ТХМ+ НКС-153	ТХМ + NC-109
КД (E ₂₃₄ /мг білка)	Гептан	0,42	0,37	0,46	0,52	0,41
% до контролю			88,1	109,5	123,8	97,6
КД (E ₂₃₄ /мг білка)	Ізопропанол	0,27	0,28	0,31	0,37*	0,29
% до контролю			103,7	114,8	137,0	107,4
КД (E ₂₃₄ /мг білка)	Гептан	0,10	0,04	0,06	0,05	0,03*
% до контролю			40,0	60,0	50,0	30,0
КД (E ₂₃₄ /мг білка)	Ізопропанол	0,09	0,10	0,10	0,11	0,09
% до контролю			111,1	111,1	122,2	100,0
Флюоресціюючі продукти ПОЛ (I _{фл.} /мг білка)		33,52	36,56	24,07*	34,58	22,54*
% до контролю			109,13	71,81	103,16	79,18

Примітка: в цій та табл.2 *- $p < 0,05$ по відношенню до контролю (прийнятого за 100 %).

Таблиця 2

Швидкість накопичення ТБК-продуктів у мембранах ЕР клітин печінки щурів за умов отруєння ТХМ та застосування похідних хіназолонів

Показники	Контроль	ТХМ	ТХМ + дибунол	ТХМ + НКС-153	ТХМ + NC-109
НК, нмоль/мг білка/хв	15,43	12,06*	14,50	14,43	11,19
% до контролю	—	78,16	93,97	93,52	72,52
АЗП, нмоль/мг білка/хв	137,81	101,21*	37,52*	56,43*	24,65*
% до контролю	—	73,44	27,23	40,95	17,89
НЗП, нмоль/мг білка/хв	112,22	92,61	86,27*	88,50*	62,33*
% до контролю	—	82,52	76,88	78,86	55,54

які отримували дибунол та сполуку NC-109 — на 28,2 та 20,8%, відповідно.

За результатами досліджень швидкості накопичення МДА (табл. 2) видно, що застосування дибунолу та похідних хіназолонів дещо зменшує швидкість накопичення вторинних молекулярних продуктів ПОЛ в ізольованих мембранах ЕР клітин печінки отруєних щурів без індукції ПОЛ (НК), але вірогідні зміни по відношенню до контролю спостерігаються лише на моделі індукованого ПОЛ. За цих умов похідні хіназолонів та дибунол призводять до значного зниження швидкості накопичення ТБК-продуктів. Під впливом сполуки НКС-153 вона зменшується майже на 60% при індукції аскорбатом та більше,

ніж на 21 % при індукції НАДФН. Сполука NC 109 знижує показник АЗП на 82,1 %, НЗП — на 44,5 %, що перевершує антиокислювальну дію дибунолу, для якого АЗП знижується на 72,8 %, НЗП — на 23,1 %.

Таким чином, аналіз стану процесів ПОЛ у мембранах ЕР печінки отруєних ТХМ щурів свідчить, що застосування S-вмісних похідних хіназолонів, сполук НКС-153, NC-109, за умов *in vivo* призводить до зниження швидкості накопичення вторинних та вмісту кінцевих молекулярних продуктів ПОЛ. За антиокислювальною активністю сполука NC-109 не поступається або навіть перевершує дибунол, сполука НКС-153 демонструє менший вплив на рівень процесів ПОЛ у порівнянні з

NC 109 та дибунолом.

Про накопичення перекисних продуктів у суспензії мембран ЕР клітин печінки щурів при отруєнні ТХМ свідчать також дані досліджень залізоініційованої біохемілюмінесценції (табл. 3): значне посилення (більш ніж на 25 %) інтенсивності швидкого спалаху, природа якого пов'язана саме із розкладанням гідроперекисів. На активацію процесів ПОЛ при отруєнні ТХМ вказує також достовірне збільшення площі світлосуми реакцій у порівнянні з відповідним показником інтактних щурів. Введення отруєним тваринам дибунолу призводить до вірогідного зниження інтенсивності швидкого спалаху та площі світлосуми БХЛ, тобто спостерігається зменшення

**Параметри залізоініційованої БХЛ мембран ЕР клітин печінки щурів
за умов отруєння ТХМ та застосування *in vivo* похідних хіназолону ($M \pm m$)**

Група тварин	Параметри залізоініційованої БХЛ	
	Інтенсивність швидкого спалаху, I_1 , ум.од.	Площа світлосуми, S , імп
Інтактні щури (контроль)	$18,6 \pm 1,9$	$3690,0 \pm 280,0$
Отруєння ТХМ (дослід)	$27,8 \pm 2,3^*$	$5480,0 \pm 330,0^*$
Отруєння ТХМ + дибунол	$21,5 \pm 1,7^{**}$	$4530,0 \pm 210,0^{**}$
Отруєння ТХМ + НКС-153	$23,6 \pm 2,3^{**}$	$5110,5 \pm 300,0^*$
Отруєння ТХМ + NC-109	$21,0 \pm 2,0^{**}$	$4265,5 \pm 240,0^{**}$

Примітки: в цій та табл.4

1) * - $p < 0,05$ по відношенню до інтактних щурів;

2) ** - $p < 0,05$ по відношенню до отруєння ТХМ.

активності процесів ліпопереокислення. Застосування за умов отруєння сполуки НКС-153 незначно впливає на процеси ПОЛ в мембранах ЕР: значення показника S знаходиться на рівні отруєних тварин, хоча при цьому інтенсивність швидкого спалаху БХЛ (I_1) вірогідно знижується до рівня інтактних тварин. При введенні отруєним ТХМ щурам сполуки NC-109 має місце вірогідне зниження (до рівня інтактних тварин) як інтенсивності швидкого спалаху I_1 , так і площі світлосуми S біохемілюмінесценції мембран ЕР, більш ефективно, ніж при введенні дибунолу. Тобто сполука NC-109 виявляє вірогідний антиоксидантний ефект при застосуванні *in vivo* за умов отруєння тетрахлоретаном.

У табл. 4 наведено результати вивчення впливу S — вмісних похідних хіназолонів, сполук НКС-153 та NC-109 (при застосуванні їх у лікувально-профілактичному режимі за умов отруєння щурів тетрахлорметаном) на фізико-хімічні показники ізольованих мембран ЕР клітини печінки, що характеризують властивості поверхні мембран, структурні зміни в білкових молекулах та глибоких гідрофобних зонах ліпідного бішару, які були порушені внаслідок отруєння ТХМ. Отримані дані свідчать, що дія на організм гепатотоксина призводить до вірогідного зниження інтенсивності флуоресценції триптофанілів (F_{330}) — на 24 % порівняно з інтактними зразками та на 11 % — флуорескаміну (F_{FK}), вбудованого в мембрани протягом 2 год, що свідчить про структурні зміни мембран, зокрема,

зменшення концентрації позитивно заряджених ϵ -аміногруп залишків лізину в білках [12]. При введенні отруєним тваринам дибунолу, а також сполук НКС-153 і NC-109 визначено вірогідне збільшення даних показників, що свідчить про нормалізацію структури триптофанілів та концентрації ϵ -аміногруп залишків лізину в білкових молекулах.

Вірогідне зниження константи Штерна-Фольмера — гасіння білкової флуоресценції акриламідом (K_{SV}) за умов отруєння щурів ТХМ свідчить про значне ущільнення структури білків, утруднення доступу гасника до білкових флуорофорів. Лікувально-профілактичне введення тваринам дибунолу та похідних хіназолонів призводить до вірогідного зростання значення K_{SV} у порівнянні з ТХМ, тобто має місце розпушення структури білків.

Дослідження властивостей поверхні мембран ЕР клітин печінки за допомогою поверхневого зонду 1,8-анілінонафталіну (АНС) [11] виявили вплив ТХМ — отруєння та дії S-вмісних похідних хіназолонів на ефективне електричне поле поверхні, його спорідненість з іонами. При отруєнні ТХМ (табл.4) має місце зниження заряду поверхні мембран (δ), у той час введення отруєним тваринам дибунолу та досліджуваних похідних хіназолонів НКС-153 і NC-109 призводило до вірогідного (по відношенню до отруєння) підвищення заряду поверхні мембран, тобто, сприяло нормалізації даного показника.

Для вивчення фізико-хімічних показників мембран ЕР, що відобра-

жають стан глибоких гідрофобних ділянок в зоні білково-ліпідного контакту та в ліпідному бішарі, використовували флуоресцентне зондування мембран піреном [11]. Як видно з даних табл. 4, вірогідність індуктивно-резонансного переносу енергії (W) за умов отруєння тварин має тенденцію до зниження, що вказує на збільшення відстані білок — ліпід в мембрані. При введенні тваринам дибунолу або сполуки NC-109 значення показника W не відрізняються від контролю та вірогідно підвищуються по відношенню до отруєння ТХМ, а за умови введення тваринам сполуки НКС-153 цей показник достовірно не відрізняється ні від контролю, ні від дослід.

Аналіз тонкої структури спектра флуоресценції мономерної форми пірену та співвідношення інтенсивностей його мономерної і димерної форм, смуг флуоресценції I_{392}/I_{470} , що відображає рухомість зонду у фосfolіпідному бішарі, його мікров'язкість, показав зниження цього показника при отруєнні ТХМ, вірогідно по відношенню до контролю (інтактні тварини). Введення отруєним тваринам дибунолу і сполуки НКС-153 призводить до ще більшого зниження даного показника і лише за умов введення сполуки NC-109 має місце нормалізація співвідношення I_{392}/I_{470} , вірогідне підвищення значень цього показника у порівнянні з отруєнням ТХМ, що свідчить про відновлення мікров'язкості та підтверджує наявність мембранозахисних властивостей цієї сполуки за умов отруєння ТХМ.

Отримані дані свідчать про

Фізико-хімічні показники ізольованих мембран ЕР клітин печінки щурів за умов отруєння ТХМ та лікувально-профілактичного введення сполук НКС-153, NC-109 та дибунолу

Характер досліджу	F ₃₃₀ , в.од.	K _{SV} , М ⁻¹	F _{ФК} в.од.	σ, Кл/м ² × 10 ³	Вірогідність ІРПЕ, W, ум. од.	Відношення І ₃₉₂ /І ₄₇₀ , ум. од
Інтактні (контроль)	1,0	5,88±0,11	1,0	3,204±0,202	0,432±0,020	1,658±0,051
ТХМ-отруєння	0,77*	5,30±0,01*	0,89*	2,965±0,11	0,399±0,041	1,410±0,002*
ТХМ+Дибунол	1,01**	6,53±0,10**	1,02**	3,452±0,205**	0,488±0,012**	1,290±0,040
ТХМ+НКС-153	0,93**	6,49±0,45**	0,96**	3,373±0,08**	0,416±0,016	1,380±0,13
ТХМ+NC-109	0,99**	6,51±0,10**	0,92	3,128±0,053**	0,517±0,007**	1,597±0,040**

здатність досліджених сполук, особливо NC-109, за умов *in vivo* призводити до структурної модифікації компонентів мембран ЕР (білків, ліпідів). Внаслідок такого впливу відбувається стабілізація властивостей поверхні мембран, гідрофобних ділянок на рівні білок-ліпідного контакту, відновлення мікрів'язкості, що є свідченням ефективної мембранозахисної дії нових похідних хіназолонів.

Дослідження впливу S-вмісних похідних хіназолонів, сполук НКС-153 та NC-109, на стан ПОЛ та структурно-динамічні показники

ізольованих мембран ЕР (у порівнянні з дибунолом) за умов отруєння щурів гепатотоксином тетрахлорметаном свідчать про здатність даних сполук до інгібування вільно-радикальних реакцій на ранніх етапах ліпоперекислення, крім того зменшується швидкість накопичення вторинних та вміст кінцевих молекулярних продуктів ПОЛ. Відзначено високі антиокислювальні властивості сполуки NC-109, яка не поступається, а за деякими критеріями навіть перевершує дибунол. За умов гострого отруєння щурів тетрахлоретаном та ведення

цієї сполуки відбувається корекція структурно-динамічних показників мембран ЕР, які порушені в результаті дії ТХМ (нормалізація рухомості ліпідного бішару, стабілізація структури білків або білок-ліпідних взаємодій, корекція ступеню розпушення білків, підвищення заряду поверхні мембран).

Проведені дослідження обґрунтовують доцільність подальшого дослідження S-вмісного похідного хіназолону, сполуки NC-109, яка має антиоксидантні та мембранопротекторні властивості.

ЛІТЕРАТУРА

- Дунаев В.В., Беленичев И.Ф., Коваленко С.И. и др. Изучение антиоксидантной активности бензилидин-гидразидов S — (4-хиназолил) — меркаптоуксусной кислоты на модели "нитрозирующего стресса" *in vitro* // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2004. — Т.67, № 3 - С. 69-72.
- Беленичев И.Ф., Коваленко С.И., Бражко О.А. та ін. Дослідження антиоксидантної дії хіназоліл-4-(хіназоліл-4)-тіо-а(в)-карбонових кислот та їх похідних в умовах ініціювання вільно-радикальних процесів *in vitro* та моделювання ішемії головного мозку // Ліки. — 2001. — № 5-6. — С. 28-33.
- Беленичев И.Ф. Дослідження антиоксидантних властивостей в ряду похідних п'яти- та шести-членних азогетероциклів і визначення їх ефективності при ішемії головного мозку // Автореф. дис....доктора біол. наук. — Київ, 2003.
- Губський Ю.І., Беленичев И.Ф., Левицький Е.Л. та ін. Дослідження геномозахисної дії S — вмісних хіназолонів та піримідохіназолонів за умов *in vitro* // Современные проблемы токсикологии. — 2006. — № 1. — С.49 — 52.
- Карузина М.И., Арчаков А.И. Выделение микросомальной фракции и характеристика ее окислительных систем / В кн. "Современные методы биохимии." - М.: Мир, 1977. — С.49-62.
- Lowry O.H., Rosenbrogh K.J., Farr A.L. et al. Protein measurements with the Folin phenol reagent // J.Biol. Chem. — 1976. — V. 193, №2. — P.256-275.
- Сидорчик Е.П., Баглей Е.А., Данко М.И. Біохемілюмінесценція при опухоловому процесі. — Київ: Наук.думка, 1989. — 220 с.
- Глушков Р.Г., Гуськова Т.А., Голиков П.П. и др. Изучение антиокислительных свойств арбидола // Хим. фарм. журн. — 1996. — № 1. — С.3-5.
- Владимиров Ю.А., Шерстнев М.П., Азимбаев Т.К. Оценка антиокислительной и антирадикальной активности веществ и биологических активностей с помощью железа инициированной хемилюминесценции // Биофизика. — 1992. — Т.37, № 6. — С.1041 — 1047.
- Демченко А.П. Люминесценция и динамика структуры белков. — К.: Наук.думка. — 1988. — 280 с.
- Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. — М.: Наука, 1989. — 277 с.
- Bode J. On the reaction of fluorescamine with chromosomal protein // Anal.Biochem. — 1979. — V.99, № 2. — P. 274-280.
- Ашмарин И.П., Васильев И.Н. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1975. — 78 с.
- Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — Киев: Морион, 2000. — 320 с.

*Ю.И. Губский, Н.В. Литвинова, А.Г. Горюшко, И.Ф. Беленичев,
Т.Н. Курапова, С.И. Коваленко, Н.М. Курская, А.Н. Величко*

**АНТИОКСИДАНТНЫЕ И МЕМБРАНО-
ЗАЩИТНЫЕ СВОЙСТВА S – СОДЕРЖАЩИХ
ПРОИЗВОДНЫХ ХИНАЗОЛОНОВ ПРИ
ИНТОКСИКАЦИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ**

Изучено влияние S-содержащих производных хиназолонов — соединений NKC-153 и NC-109 *in vivo* на состояние липоперекисления в изолированных мембранах эндоплазматического ретикула (ЭР) печени крыс в условиях интоксикации тетрахлорметаном (ТХМ). В режиме спонтанного, индуцированного NADPH и аскорбатом ПОЛ, как и при исследовании параметров биофлуоресценции мембран, выявлены антиоксидантные свойства данных соединений на уровне или превосходящие по эффективности дибунол (особенно NC-109).

Методами флуоресцентного зондирования суспензии мембран ЭР клеток печени животных в условиях отравления ТХМ и лечебно-профилактического введения соединений NKC-153 и NC-109 выявлена их способность нормализовать физико-химические показатели (на уровне дибунола), измененные при действии гепатотоксина, характеризующие структуру белковых молекул, свойства поверхности мембран ЭР, состояние глубоких гидрофобных зон в области белково-липидного контакта, микровязкость липидного бислоя.

Показана способность соединений (особенно NC-109) изменять структурную модификацию поверхности мембран ЭР и их гидрофобных зон, что свидетельствует о наличии мембранозащитного действия.

*Yu.I. Gubskiy, N.V. Litvinova, A.G. Goryushko, I.F. Belenichev,
T.N. Kurapova, S.I. Kovalenko, N.M. Kurskaya, A.N. Velichko*

ANTIOXIDANTIVE AND MEMBRANEPROTECTIVE PROPERTIES S – DERIVATIVES HINAZOLINE CONDITIONS OF TETRACHLORMETANE INTOXICATION.

The Studied influence S-containing derived chinasolonic, join NKC-153 and NC-109 *in vivo* on condition lipooxidation in insulated membrane (microsome) liver rats in condition intoxication CCl₄. In mode spontaneous, induction NADPH and ascorbate lipidooxidation, either as at study parameter biohemifluorescent membranes, is revealed antioxidant characteristic join data at a rate of or exceeding on effectiveness dibunol (join NC-109).

The Methods of the fluorescence flexing microsomes hutchess liver animal in condition of the poisoning hepatotoxine CCl₄ and medical-preventive entering the join NKC-153 and NC-109 are revealed their ability to normalizations physico-chemical factors at a rate of dibunol, changed at action hepatotoxine CCl₄ and characterizing structure of the protein molecules, characteristic to surfaces membranes, condition deep hydrofobic zones in the field of protein-lipids of the contact, condition structure lipide bilayer.

It is shown ability of the join (most effectively for NC-109) to structured modification of the surfaces membranes and their hydrofobic zone, their membrane protection action.