Міністерство охорони здоров'я України
Національний фармацевтичний університет

ХОДАКІВСЬКА ОЛЬГА ВІТАЛІЇВНА

УДК: 547.756:616.831-005.4:615.01

ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНА АКТИВНІСТЬ НОВИХ ПОХІДНИХ 3,2'-СПІРО-ПІРОЛО-2-ОКСИНДОЛУ В УМОВАХ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

(експериментальне дослідження)

14.03.05 – фармакологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук

Харків – 2015

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі фармакології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова Міністерства охорони здоров'я України.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
ШТРИГОЛЬ Сергій Юрійович,
Національний фармацевтичний університет
МОЗ України (м. Харків),
завідувач кафедри фармакології
та лікарської токсикології

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
ДЕВ'ЯТКІНА Тетяна Олексіївна,
Вищий державний навчальний заклад України
«Українська медична стоматологічна академія» МОЗ
України (м. Полтава), професор кафедри
експериментальної та клінічної фармакології
з клінічною імунологією та алергологією

доктор фармацевтичних наук, професор
СИРОВА Ганна Олегівна,
Харківський національний медичний
університет МОЗ України (м. Харків),
завідувач кафедри медичної
та біоорганічної хімії

Захист відбудеться "____" жовтня 2015 р. о годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.03 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Блюхера, 4).

Автореферат розісланий "____" вересня 2015 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради
д. фарм. н., проф. Т. С. Сахарова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Судинні захворювання головного мозку залишаються однією з найгостріших медико-соціальних проблем сьогодення. Вони завдають величезних економічних збитків, оскільки є основною причиною екстреної госпіталізації, тривалої втрати працездатності, інвалідизації та, насамкінець, значної летальності (О. В. Котова, 2012; S. Beraki et al., 2013). Концептуальні засади інтенсивної терапії гострих порушень мозкового кровообігу (ГПМК) за ішемічним типом ґрунтуються на покращанні перфузії мозку, профілактиці ретромбозу інфаркт-залежної судини та залучення церебропротекторної терапії (В. В. Шведський та співавт., 2011; I. F. Belenichev, 2014).

Стероїдна нейротоксичність є важливою ланкою патогенезу нейродеструкції при ішемічних ураженнях мозку і потенційною мішенню церебропротективної терапії. Перспективним напрямком нейропротекції є впровадження препаратів на основі нестероїдних структур, що здатні модулювати активність 11-β-гідроксистероїддегідрогенази 1 типу (11β-HSD1) та пригнічувати перехід кортизону в кортизол, знижуючи концентрацію останнього в мозку без втручання у загальний стероїдний баланс.

Деякі похідні (2-оксоіндолініліден-3)-гліоксилової кислоти та спіроциклічні похідні оксиндолу виявляють ноотропні та церебропротекторні властивості (Н. А. Цубанова та співавт., 2011; А. В. Шатилов и соавт., 2013). За результатами докінгу з використанням комплексу програм AutoDoc одне із нових похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу, а саме спіро[індол-3,1'-пірол[3,4-*c*]пірола]-5'-(4-метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3а',6а'-дигідро-2'h-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-c]пірол]-2,4',6'(1h,3'h,5'h)-тріона (надалі сполука R-86), виявляє властивості інгібітора ферменту 11β-HSD1. Подальші дослідженні сполуки R-86 *in vivo* засвідчили наявність кардіопротекторних властивостей та церебропротекторної дії в умовах модельного геморагічного інсульту (О. В. Багаурі та співавт., 2013; Л. Б. Браверман, 2013; І. О. Петрик, О. А. Ходаківський, 2014). Це обґрунтовує доцільність дослідження захисного впливу сполуки R-86 та її структурних аналогів на головний мозок в умовах експериментального ГПМК із подальшою оцінкою перспективи створення на її основі оригінального вітчизняного церебропротекторного засобу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано відповідно до плану науково-дослідних робіт Вінницького національного медичного університету (ВНМУ) ім. М.І. Пирогова МОЗ України у рамках теми «Пошук та розробка нових шляхів фармакологічної корекції порушень при ішемічному ушкодженні мозку та серця в експерименті» (номер держреєстрації 0112U001939). Дисертант є співвиконавцем теми.

Мета і задачі дослідження. *Мета роботи* – експериментальне обґрунтування підвищення ефективності вторинної церебропротекції при гострій ішемії головного мозку шляхом застосування нового похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі *задачі:*

1. Провести скринінг антигіпоксичної активності нових похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу, обрати сполуку-лідера, поглиблено вивчити її захисні властивості в умовах гострої церебральної ішемії та визначити гостру токсичність.
2. Оцінити церебропротекторні й мнемотропні властивості сполуки-лідера та її коригувальну дію на формування цереброкардіальної дисфункції за динамікою летальності тварин та неврологічного дефіциту на моделях необоротної каротидної оклюзії та ішемії-реперфузії у щурів та монгольських піщанок (гербел).
3. З'ясувати вплив сполуки-лідера на гістоструктуру та процеси нейродеструкції при модельному ішемічному інсульті за морфологічними змінами сомато-сенсорної кори головного мозку щурів, активністю нейрон-специфічної енолази та рівнем білка S 100.
4. Оцінити вплив сполуки-лідера на інтенсивність апоптозу нейронів за критерієм фрагментації ядерної ДНК.
5. Дослідити динаміку рівня кортизолу в крові щурів у різні терміни ішемії головного мозку та вплив сполуки-лідера на його вміст у тварин без ГПМК і в умовах модельної білатеральної каротидної оклюзії.
6. Охарактеризувати вплив сполуки-лідера на електрофізіологічні особливості фукціонування пірамідних нейронів зони CA1 гіпокампу щурів в умовах глутаматної ексайтотоксичності, аноксії з нейроглікопенією, дії оксидативного стресу та стероїдної нейротоксичності.
7. З'ясувати біохімічні механізми церебропротекторної дії сполуки-лідера за критеріями впливу на енергетичний метаболізм, оксидантно-антиоксидантний баланс та обмін монооксиду азоту в головному мозку щурів в умовах гострої церебральної ішемії.

Об'єкт дослідження: гострі порушення мозкового кровообігу.

Предмет дослідження: церебропротекторні властивості нових похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу.

Методи досліджень: фармакологічні, патофізіологічні, біохімічні, гістологічні, статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше з використанням комплексного підходу серед 9 нових похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу відібрано сполуку під шифром R-86 (спіро[індол-3,1'-пірол[3,4-*c*]пірола]-5'-(4-метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3a',6a'-дигідро-2'h-спіро[індол-3,1'-піроло [3,4-c]пірол]-2,4',6'(1h,3'h,5'h)-тріон), виявляє найвищу антигіпоксичну активність, вірогідно збільшуючи тривалість життя щурів у середньому на 33,7%, та церебропротекторну дію при ГПМК. Останнє характеризується збільшенням виживаності щурів і монгольських піщанок із моделлю ішемічного інсульту в критичному періоді на 50 % ($p<0,05$). Встановлено широкий спектр нейропротективної дії сполуки R-86 на різних рівнях (від молекулярних, електрофізіологічних і морфологічних змін у нейронах до формування поведінкових функцій та зменшення неврологічного дефіциту на 38,7% ($p<0,05$)). Виявлено механізми захисної дії сполуки R-86 на ішемізований головний мозок. Встановлено, що досліджувана речовина на 57,1 % знижує

підвищений рівень кортизолу ($p<0,05$). Доведено, що сполука R-86 в умовах різних ушкоджувальних впливів *in vivo* або *in vitro* перешкоджає зниженню популяційних збуджувальних постсинаптичних потенціалів пірамідних нейронів зони CA1 гіпокампу щурів, викликаних електростимуляцією колатералей Шаффера, вірогідно підвищуючи їх аплітуду в умовах N-метил-D-аспартатної ексайтотоксичністі в середньому на 39,8%, оксидативного стресу на 58,6 %, глюкокортикоїдної нейротоксичності та аноксії з нейроглікопенією у 2,5 разу. Вперше показано, що покращання морфологічних показників соматосенсорної кори головного мозку вірогідно корелює із зменшенням маркерів ушкодження мембран нейронів (активності нейронспецифічної енолази у 3,8 та вмісту білка S 100 у 6,6 разу) і пригніченням нейроапоптозу, яке підтверджується зменшенням фрагментації ДНК у 1,7 разу ($p<0,05$). Поглиблено уявлення про механізми цитопротекторного ефекту сполуки R-86, що пов'язані з модулювальним впливом на формування глутаматної та стероїдної нейротоксичності, усуненням енергодефіциту (виявляється збільшенням вмісту АТФ, енергетичного заряду та пірувату в середньому відповідно на 50,3, 21,9 та 72,7 %), метаболічного ацидозу (віддеркалюється зменшенням вмісту лактату на 62,1 %), оксидативного ушкодження нейронів (характеризується зниженням інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів і окисної модифікації білків в середньому відповідно у 1,9 рази та на 34,6 %), коригувальним впливом на обмін монооксиду азоту та збереженням цитоархітектоніки головного мозку.

Практичне значення одержаних результатів. Результати експериментально обґрунтовують доцільність подальшого доклінічного дослідження ефективності та безпеки сполуки R-86 в умовах гострої церебральної ішемії з метою створення нового лікарського препарату. Наявність у сполуки R-86 коригувального впливу на вторинні патогенетичні ланки ішемічного каскаду (стероїдна нейротоксичність) надає підстави для її застосування у підгострому та відновлювальному періодах ГПМК. Отримані результати значно розширюють уявлення про механізми нейропротекторної дії інгібіторів ферменту 11-β-гідроксистероїддегідрогенази 1 типу та є підґрунтям для цілеспрямованого синтезу сполук із зазначеною дією.

За матеріалами дисертації видано інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я «Перспективи використання нового похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксіндолу як церебропротектора при ішемії головного мозку» (№ 323-2013, 2013). Результати впроваджено у науково-педагогічний процес кафедр фармакології і біологічної та загальної хімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова (протокол №13 від 03.02.15), кафедри фармакології Буковинського державного медичного університету (протокол №2 від 05.09.15), кафедри фармакології Національного фармацевтичного університету (протокол № 2 від 05.09.13), кафедри фізіології Одеського національного медичного університету (протокол №7 від 05.02.15).

Особистий внесок здобувача. Дисертант особисто провів патентно-інформаційний пошук, проаналізував літературу за темою дисертації, разом із науковим керівником визначив мету й задачі, обрав методи дослідження. Опанував методики моделювання ГПМК у щурів та гербел, біохімічних та морфологічних

досліджень, після чого самостійно виконав експерименти. Визначення фрагментації ДНК проведено в лабораторії функціональної морфології та генетики розвитку ВНМУ ім. М.І. Пирогова за допомоги к. мед. н. І.Л. Черешнюка. Мікропрепарати вивчено за допомоги к. мед. н., доц. кафедри гістології ВНМУ ім. М.І. Пирогова А.П. Короля. Окремі серії біохімічних досліджень виконано за допомоги к. мед. н., доц. кафедри біохімії ВНМУ ім. М.І. Пирогова А.В. Мельника. Електрофізіологічні дослідження пірамідних нейронів проведено на кафедрі фармакології Донецького національного медичного університету ім. М. Горького за допомоги д. мед. н., проф. І.І. Абрамця та к. мед. н., доц. Д.В. Євдокімова.

Автор дисертації самостійно виконав математичну обробку і статистичний аналіз результатів, підготував публікації до друку.

Апробація результатів дисертації відбулася на XIII Українській конференції з органічної хімії з міжнародною участю (Чернівці, 2013); Всеросійській науково-практичній конференції з міжнародною участю «90 лет отдела нейрофармакологии им. С.В. Аничкова» (Санкт-Петербург, 2013); VII Міжнародному конгресі з інтегративної антропології (Вінниця, 2013); VII Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю з клінічної фармакології, присвяченої 75-річчю кафедри фармакології і 25-річчю кафедри клінічної фармації і клінічної фармакології ВНМУ (Вінниця, 2013); XXI Російському національному конгресі «Человек и лекарство» (Москва, 2014); Науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 2014); V Науковій конференції молодих вчених з міжнародною участю (Вінниця, 2014); V Міжнародній (XII підсумковій) науково-практичній конференції молодих вчених, присвяченій 70-річчю Південно-Уральського державного медичного університету (Челябинск, 2014).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 17 робіт, у тому числі 8 статей, з яких 5 у фахових наукових виданнях, рекомендованих МОН України (1 в наукометричному індекс-цитованому українському виданні), 3 статті у закордонних періодичних наукових виданнях, 1 інформаційний лист МОЗ України, 8 тез доповідей на міжнародних конференціях та конгресах.

Обсяг та структура дисертації. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 3 розділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів, висновків та списку використаних джерел (214 назв, з яких 132 – із кириличною графікою, 82– із латинською). Роботу викладено на 186 сторінках, ілюстровано 23 таблицями та 46 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Досліджували 9 оригінальних похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу, синтезованих к. фарм. н., доцентом кафедри органічної хімії Національного фармацевтичного університету (НФаУ) МОЗ України Р.Г. Редькіним.

Церебропротекторні властивості 9 похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу (сполуки із лабораторними шифрами R-24, R-27, R-34, R-38, R-76, R-

86, R-87, R-108, КТ-4064) вивчено на 631 щурові-самці лінії Вістар масою 160-180 г і на 88 монгольських піщанках (гербелах) обох статей масою 55-70 г. Тварини знаходились у віварії ВНМУ ім. М.І. Пирогова на стандартному водно-харчовому раціоні (при вільному доступі) при природному освітленні. Дотримувались методичних рекомендацій Державного експертного центру МОЗ України і вимог біоетики згідно до Національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (2001), що відповідають положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985 р.). Дотримання біоетичних норм засвідчено комісією з біоетики ВНМУ ім. М.І. Пирогова (висновок № 2 від 05.02.2015).

Гіпоксія є провідним чинником, що ушкоджує головний мозок, тому проводили скринінг антигіпоксичної активності досліджуваних сполук на моделях гострої нормобаричної гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією (ГНГГ) та гострої асфіксії (Г. І. Степанюк, О. А. Ходаківський, 2008). Усі похідні вводили щурам в дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково (в/ш) за 1 год до моделювання патологічного стану. Дозу обрано на підставі даних про активні дози сполук близької структури (Р. Г. Редькін та співавт., 2008; Н. А. Цубанова та співавт., 2012; А. В. Шатилов и соавт., 2013). Оскільки ці сполуки є водонерозчинними, готували їхні суспензії із твіном-80, розраховуючи концентрацію таким чином, щоб об’єм, який уводився в/ш, становив 2 мл/кг. Згідно рекомендацій з доклінічного дослідження перспективних нейропротекторів для визначення умовно ефективної дози сполуки її необхідно дослідити у широкому діапазоні доз (И. С. Чекман и соавт., 2010). Тому сполуку-лідера спіро[індол-3,1'-пірол[3,4-*c*]пірола]-5'-(4-метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3а',6а'-дигідро-2'h-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-c]пірол]-2,4',6'(1h,3'h,5'h)-тріон (рис.1) під шифром R-86 додатково досліджували у дозах 5 мг/кг та 15 мг/кг в/ш.

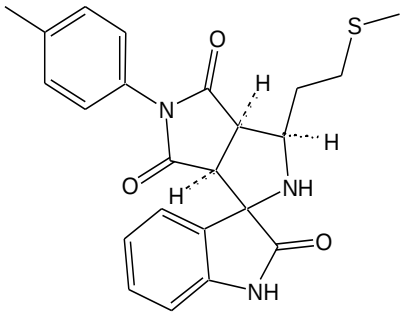


Рис. 1 Хімічна будова сполуки R-86 (спіро[індол-3,1'-пірол[3,4-*c*]пірола]-5'-(4-метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3а',6а'-дигідро-2'h-спіро [індол-3,1'-піроло[3,4-c]пірол]-2,4',6'(1h,3'h,5'h)-тріон).

Церебропротекторну активність сполуки R-86 досліджували на моделях ГПМК – білатеральна каротидна оклюзія (БКО) та церебральна 40-хвилинна ішемія-реперфузія (ІР) внутрішніх сонних артерій (СА) у щурів, а також однобічна необоротна оклюзія СА та 60-хвилинна ІР СА у гербел (І. Ф. Бєленічев та співавт., 2006; О. А. Ходаківський, І. Л. Черешнюк, 2013).

Ефективність сполуки R-86 в умовах церебральної ішемії оцінювали при застосуванні 1 раз на добу в умовно ефективній дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково (в/ш). Введення починали через 1 год після моделювання ГПМК. Моніторинг ефективності проводили на 4 та 21 добу БКО (відповідно гострий та відновний період інсульту), а при однобічній оклюзії СА та ІР – на 96 год експерименту. Як препарати порівняння на різних етапах дослідження використовували: мексидол («Мексидол», НВК Фармасофт, Росія), 100 мг/кг; цитиколін («Сомазіна», FerrerSnternational, S.A., Іспанія), 250 мг/кг; актовегін («Актовегін», Nycomed, Австрія), 16 мг/кг; пірацетам («Пірацетам», Фармацевтична фірма «Дарниця», Україна), 400 мг/кг; корвітин («Корвітин», Борщагівський хіміко-фармацевтичний завод, Україна), 100 мг/кг (10 мг/кг за кверцетином). Референс-препарати вводили внутрішньочеревинно (в/о) в рекомендованих для доклінічних досліджень дозах (Джигалюк О. В. та співавт., 2010; И. С. Чекман и соавт., 2010; О. А. Ходаківський, 2013). Псевдооперованих тварин (отримували 0,9 % розчин NaCI 2 мл/кг в/о) піддавали всім втручанням (наркоз, розріз шкіри, препарування судин) за виключенням перев'язування СА, що нівелювало травматичний вплив. Тваринам групи контрольної патології моделювали церебральну ішемію та вводили 0,9 % розчин NaCI (2 мл/кг в/о). Травматичні маніпуляції та евтаназію (декапітація) виконували під пропофоловим наркозом («Fresenius Kabi», Австрія), 60 мг/кг в/о.

Первинними критеріями церебропротекторної дії сполуки R-86 на моделі ішемічного інсульту обрано термін загибелі тварин (год), летальність (%), динаміку неврологічного статусу за шкалою stroke-index C.P. Mc Grow (1977) та виразність цереброкардіального синдрому (неврологічний статус та елевація сегменту ST) (В. В. Шведський та співавт., 2011; О. А. Ходаківський, 2013). Мнемотропну дію сполуки R-86 в умовах ГПМК досліджували на 21 добу за тестом умовної реакції пасивного уникання (УРПУ) (Я. Буреш и соавт., 1991).

Активність NSE та вміст білка S100 у сироватці крові гербел вимірювали на 4 добу модельної церебральної ІР методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням наборів NSE ELISA KIT (DAI, США) та S 100 ELISA KIT (Fujirebio Diagnostics Inc., Швеція) на приладі фірми “Hipson” (Чехія). Фрагментацію ДНК в ядрах кортикальних нейронів щурів як маркер нейроапоптозу досліджували на 96 год ГПМК методом протокової цитометрії на приладі «Partec PAS» (Partec, Німеччина) (І. Л. Черешнюк, 2009). Для морфологічних досліджень на 4 та 21 добу ГПМК після евтаназії тварин виготовляли 5-мікронні зрізи сомато-сенсорної кори, які депарафінували і забарвлювали гематоксилін-еозином або толуїдиновим синім (І. Ф. Бєленічев та співавт., 2006).

Рівень кортизолу визначали в сироватці венозної крові сагітального синуса методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням набору CORTISOL KIT (Німеччина) на приладі фірми "Hipson" (Чехія).

Електрофізіологічні дослідження виконано на зрізах дорсального гіпокампу шляхом реєстрації популяційних збуджувальних постсинаптичних потенціалів (пЗПСП) пірамідних нейронів ділянки СА1, викликаних електричною стимуляцією колатералей Шаффера (И. И. Абрамец и соавт., 2006).

Сполуку R-86 розчиняли в диметилсульфоксиді та досліджували концентрації 100 мкМ, яка є близькою до створюваної при системному введенні цієї речовини в церебропротекторній дозі 10 мг/кг. Ексайтотоксичну дію N-метил-D-аспартату (NMDA) досліджували за методом (Y. Liu, 2007). Аноксію з нейроглікопенією моделювали за методом (G. F. Tian, A. J. Baker, 2002), оксидативний стрес – за методикою (L. M. Almeida et al., 2008). Вплив сполуки R-86 на глюкокортикоїдну нейротоксичность вивчали за методом (L. E. Haynes et al., 2001].

Наприкінці гострого періоду ішемії у щурів із БКО визначали вміст аденілових нуклеотидів (аденозинтрифосфорна (АТФ), аденозиндифосфорна (АДФ) та аденозинмонофосфорна (АМФ) кислоти) у безбілковому трихлороцтовому екстракті головного мозку 1:10 хроматографічним методом (М. И. Прохорова, 1972). Вміст пірувату та лактату визначали колориметрично, загального білка – мікробіуретовим методом з реактивом Бенедикта (Г. А. Кочетов, 1980), ТБК-позитивних речовин – за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (Ю. В. Владимиров, А. И. Арчаков, 1972), карбонільних груп протеїнів (КГП) – за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином (Н. В. Заічко, 2003). Активність антиоксидантних ферментів оцінювали за активністю супероксиддисмутази (СОД) (В. А. Костюк, и соавт., 1990), каталази (М. А. Королюк и соавт., 1988) та глутатіонпероксидази (ГПО) (С. Н. Власова и соавт., 1990). Рівень L-аргініну визначали за реакцією Сакагучі, сумарну активність NO-синтаз – за методикою (Н. М. Гула та співавт., 2007).

Гостру токсичність сполуки-лідера оцінювали у щурів при в/ш введенні. $ЛД_{50}$ розраховували за методом Літчфілда-Вілкоксона з використанням пробіт-аналізу (М. Л. Беленький, 1963). Спостереження за тваринами тривали 14 діб.

Кількісні дані обробляли за допомогою програми статистичної обробки StatPlus 2009. Використовували параметричний критерій t Ст'юдента у випадках нормального розподілу, непараметричний критерій W Уайта – за його відсутності, парний критерій Ť Вілкоксона – для визначення змін у динаміці всередині групи, кутове перетворення Фішера (Г. Ф. Лакин, 1990; С. Н. Лапач и соавт., 2002) – при обліку результатів в альтернативній формі (наявність або відсутність ознаки). Відмінності вважали статистично значущими при $p<0,05$.

Результати та їх обговорення. Скринінг на антигіпоксичну активність 9 похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу на двох моделях гіпоксії дозволив визначити сполуку-лідера з лабораторним шифром R-86. В умовах ГНГГ та гострої асфіксії сполука R-86 при превентивному введенні в дозах 10 та 5 мг/кг в/ш на відміну від решти досліджуваних речовин забезпечувала антигіпоксичну активність відповідно 33,7% ($p<0,05$) та 12,1% ($p>0,05$). У подальшому встановлено церебропротекторну дію сполуки R-86. На користь цього свідчило дозозалежне зменшення летальності щурів з БКО на тлі її профілактичного застосування. Найбільший захисний вплив виявився саме в дозі 10 мг⁄кг в/ш: у критичному періоді експерименту (12 год) спостерігалось 100% запобігання загибелі тварин. На 24 год летальність становила 20% проти 23,80% у групі контрольної патології. Застосування похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу в дозах 5 і 15 мг/кг в/ш супроводжувалось меншим захисним ефектом, ніж у дозі 10 мг/кг в/ш. Тому дозу сполуки R-86 10 мг/кг в/ш можна вважати умовно-

ефективною для подальшої оцінки її церебропротекторної дії. Нейропротекторний ефект сполуки R-86 виявився не тільки при превентивному, а й при лікувальному введенні на чотирьох різних моделях гострої церебральної ішемії – БКО у щурів, однобічної оклюзії внутрішньої СА у монгольських піщанок та церебральної ІР у тварин обох видів. Сполука R-86 (10 мг/кг в/ш) у критичному періоді БКО (12 год) вірогідно зменшувала смертність відносно групи контрольної патології в середньому на 50 % (рис. 2).

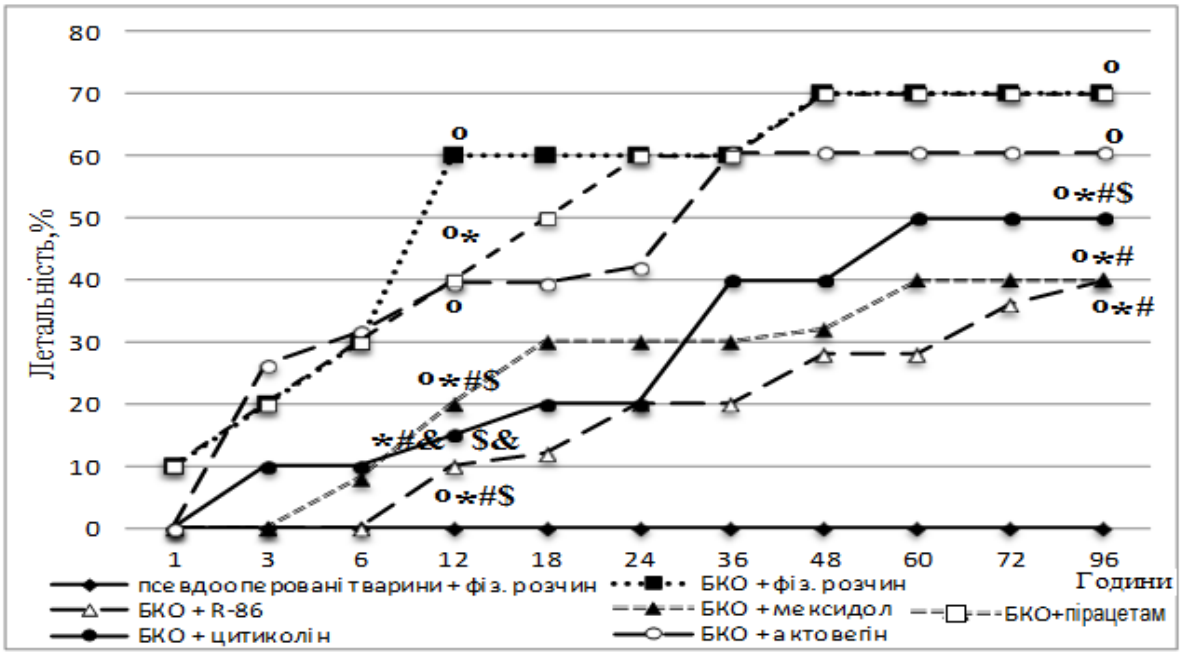


Рис. 2 Вплив сполуки R-86, мексидолу, цитиколіну, актовегіну та пірацетаму при внутрішньоочеревинному лікувальному введенні на летальність щурів із гострою церебральною ішемією.

Примітка. БКО – білатеральна каротидна оклюзія;° – p<0,05 відносно псевдооперованих тварин; * – p<0,05 відносно контрольної патології; # – p<0,05 відносно пірацетаму (400 мг/кг в/о); & – p<0,05 відносно мексидолу (100 мг/кг в/о); • – p<0,05 відносно цитиколіну (250 мг/кг в/о); $ – p<0,05 відносно актовегіну (16 мг/кг в/о).

Упродовж 96 год спостереження досліджуване похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу переважало мексидол (100 мг/кг), цитиколін (250 мг/кг), актовегін (16 мг/кг) та пірацетам (400 мг/кг) за в/о застосування. У гербел з однобічною оклюзією СА сполука R-86, подібно до цитиколіну, забезпечувала стовідсотковий нейропротекторний ефект упродовж перших 8 год ішемії. За величиною захисного впливу на головний мозок упродовж перших трьох діб судинно-мозкової катастрофи сполука R-86 не поступалась цитиколіну та мексидолу, вірогідно переважаючи пірацетам. Інтегративними показниками якості захисного впливу на ішемізований головний мозок є, поряд із зменшенням летальності, швидка ліквідація неврологічного дефіциту та відновлення когнітивно-мнестичних функцій. Сполука R-86 зменшує неврологічний дефіцит на 38,7 % (p<0,05) та поліпшує пам'ять у тесті УРПУ (p<0,05), перевершуючи цитиколін, актовегін та пірацетам. Це доводиться значним зростанням (на 161,5 %) латентного періоду

входу до темної камери через 24 год, що свідчить про збереження пам'ятного сліду, незважаючи на церебральну ішемію. За лікувального введення сполука R-86 зменшує нейродеструктивні процеси в ішемізованому мозку гербел, вірогідно знижуючи в постреперфузійному періоді активність NSE та вміст білка S 100 у крові відносно контрольної патології відповідно у 2,9 та 6,6 разу (p<0,05) (табл. 1).

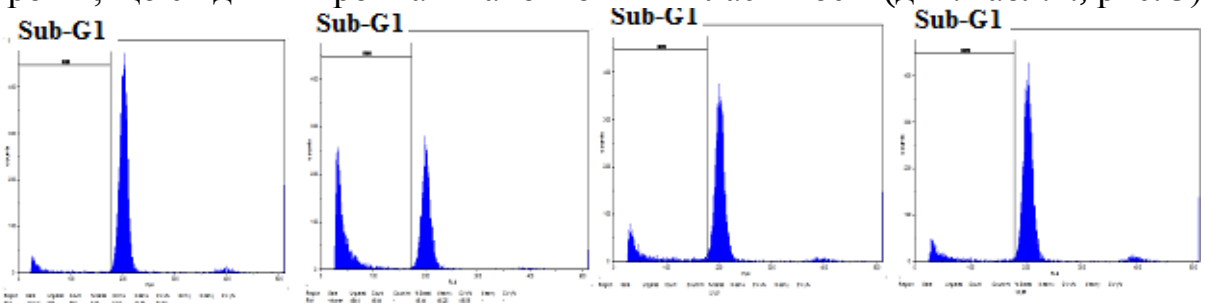
Таблиця 1

Рівень білка S 100, активність нейронспецифічної енолази у сироватці крові та фрагментація ДНК в ядрах нейронів лобних часток кори головного мозку гербел на 4 добу після церебральної ішемії-реперфузії під впливом сполуки R-86 та цитиколіну (M±m)

Дослідні групи	Показники		
	Рівень білка S 100, нг/мл, n=7	Активність NSE, нг/мл, n=7	Фрагментація ДНК (%), n=6
Псевдооперовані тварини	0,45±0,05	0,118±0,001	7,02±0,40
Контрольна патологія	7,62±0,65º	1,238±0,059º	15,11±0,57º
Ішемія-реперфузія + R-86 (10 мг/кг в/ш)	1,15±0,05º*•	0,610±0,004º*•	9,02±0,49º*•
Ішемія-реперфузія + цитиколін (250 мг/кг в/о)	1,97±0,18º*	0,972±0,010º	11,68±0,02º*

Примітка. n – кількість тварин у групі; в/о – внутрішньоочеревинно; в/ш – внутрішньошлунково; NSE – нейронспецифічна енолаза; º – p<0,05 відносно псевдооперованих тварин; * – p<0,05 відносно контрольної патології; • – p<0,05 відносно групи цитиколіну.

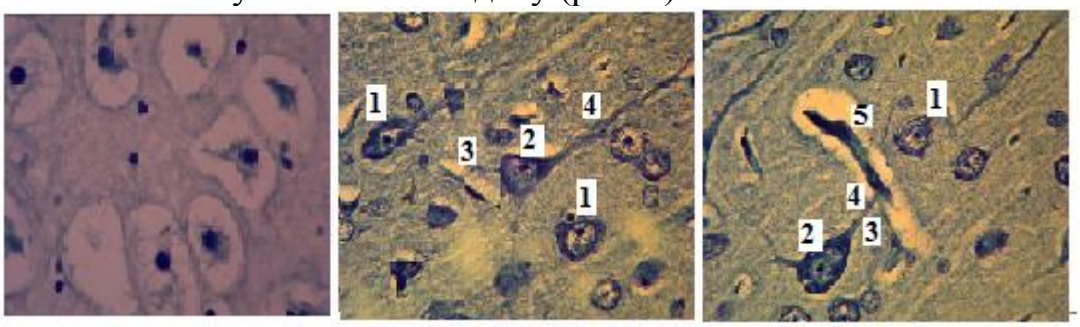
За впливом на зазначені нейромаркери сполука R-86 вірогідно (p<0,05) переважає цитиколін у середньому відповідно на 23,8% та 41,8 %. У постреперфузійному періоді сполука R-86 вірогідно краще за цитиколін (у середньому в 1,3 разу) зменшує інтенсивність фрагментації ДНК в ядрах нейронів, що свідчить про її антиапоптотичні властивості (див. табл.1., рис. 3).



А Б В Г

Рис. 3. Приклади ДНК-гістограм ядерних суспензій клітин кори головного мозку псевдооперованих гербел (А) та тварин із моделлю церебральної ішемії з подальшою реперфузією (4 доба), що отримували: Б – 0,9% розчин NaCl (контрольна патологія), В – цитиколін, 250 мг/кг, Г – сполуку R-86, 10 мг/кг в/ш.

У гострому та відновному періодах модельного ГПМК досліджуване похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу сприяє збереженню цитоархітектоніки та структури мікроциркуляторного русла нервової тканини щурів. За здатністю зберігати морфологічну цілісність соматосенсорної кори головного мозку сполука R-86 не поступається мексидолу (рис. 4).



А Б В

Рис. 4. Гістоструктура сенсомоторної ділянки кори великих півкуль щурів з БКО (21 доба), що отримували: А – 0,9 % розчин NaCl, контрольна патологія (деструктивно змінені нейрони з ознаками апоптозу та вакуолізації); Б – мексидол, 100 мг/кг в/о (структура неушкоджених нейронів: тіло нейрону – 1, ядро та ядерце – 2, дендрит – 3, аксон – 4); В – сполуку R-86, 10 мг/кг в/ш (збереження морфологічної цілісності нейронів: тіло нейрону – 1, ядро та ядерце – 2, дендрит – 3, аксон – 4). Забарвлення – толуїдиновий синій. Окуляр × 40. Об’єктив × 10.

В умовах тяжкого ГПМК відбувається ураження міокарда, яке пов’язане, з одного боку, із втратою центральних механізмів впливу на трофіку серцевого м’яза, а з іншого – з автономним ішемічно-гіпоксичним ураженням кардіоміоцитів (О. А. Ходаківський, 2014). На моделях ІР у щурів та гербел похідне 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу, подібно до препаратів порівняння корвітину та цитиколіну, запобігало цереброкардіальному синдрому при профілактичному режимі та послаблювало його прояви за лікувального застосування. Сполука R-86 на тлі регресу неврологічного дефіциту від середньо-тяжкого ступеня до легкого зменшувала підйом амплітуди сегменту ST у щурів і гербел у середньому відповідно на 45,8 % та 32,9 % ($p<0,05$).

Сполука R-86 в крові сагітального синуса щурів із БКО вірогідно краще за цитиколін нормалізує титр кортизолу, переважаючи референс-препарат у гострому (4 доба) і відновному (21 доба) періодах ГПМК відповідно в 1,46 та 1,62 разу. Досліджувана речовина знижує тільки підвищений рівень кортизолу, титр якого не відрізняється від фізіологічного навіть при курсовій терапії.

У дослідах *in vitro* підтверджено, що сполука R-86 виявляє виразну нейроцитопротекторну активність, зменшуючи в умовах різних ушкоджувальних впливів ступінь зниження пЗПСП пірамідних нейронів зони CA1 гіпокампу щурів, викликаних електростімуляцією колатералей Шаффера (рис. 5). У механізмах нейропротекторної дії сполуки R-86 при її внесенні в інкубаційне середовище (100 мкМ) беруть участь як процеси зниження ексайтотоксичності, викликаної NMDA, так і антиоксидантні властивості

досліджуваного похідного в умовах прямого ушкодження нейронів гідроген пероксидом. При попередньому введенні щурам сполука R-86 (10 мг/кг в/о) послаблює ушкодження гіпокампальних нейронів, викликане аноксією з нейроглікопенією, а також високою дозою системно введеного дексаметазону.

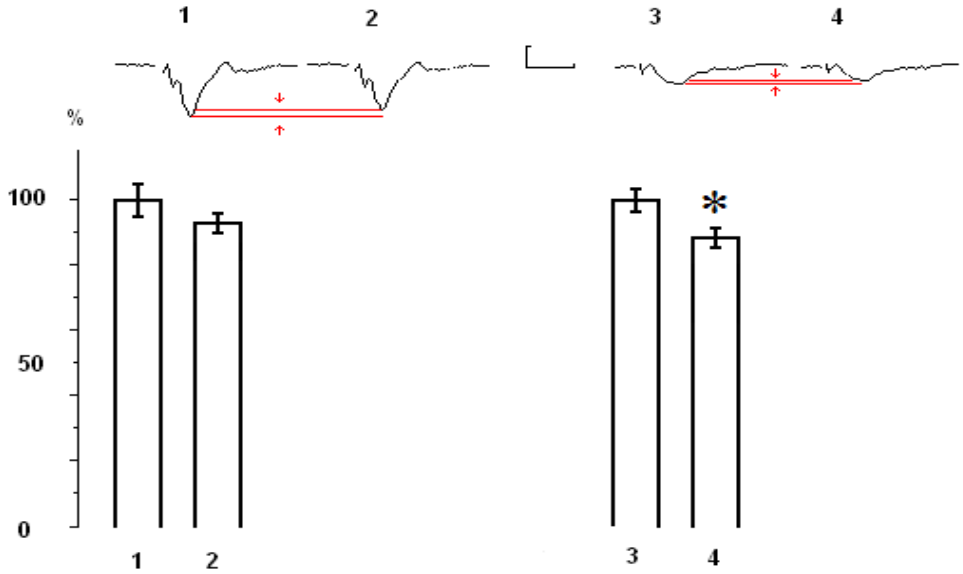


Рис. 5. Зміни амплітуд популяційних збуджувальних постсинаптичних потенціалів (пЗПСП) пірамідних нейронів зони CA1 (ліворуч) та їх NMDA-компонентів (праворуч) при впливі на зрізи гіпокампу сполуки R-86. Вгорі – пЗПСП, усереднені по 10 вимірам: вихідні (1, 3), на тлі сполуки R-86 (2, 4). Калібрування: 1 мВ, 10 (1 і 2) і 20 (3 і 4) мс; * – $p < 0,05$ відносно вихідних показників.

Антиглюкокортикоїдна дія сполуки R-86 може бути обумовлена блокадою стероїдних рецепторів або пригніченням процесів трансдукції, індукованих активацією цих рецепторів. Перша можливість малоймовірна, оскільки сполука R-86 послаблює викликане дексаметазоном зниження амплітуди пЗПСП, але не перешкоджає розвитку порушень синаптичної пластичності. На тлі дексаметазону і речовини R-86 на 30-й хв після високочастотної стимуляції синаптичних входів приріст амплітуди пЗПСП практично відсутній – 10,2±4,4%, тимчасом як у контрольних щурів, що отримували замість дексаметазону розчинник, він склав 54,7±5,1% ($p = 0,002$). Порушення синаптичної пластичності в гіпокампі внаслідок активації глюкокортикоїдних рецепторів – добре відомий факт. Процеси трансдукції, які за умов активації глюкокортикоїдних рецепторів призводять до нейроапоптозу, можна виділити щонайменше три. Перший реалізується через розвиток ексайтотоксичності за рахунок посилення вивільнення і пригнічення кліренсу глутамату, другий – за рахунок пригнічення нейротрофінів із природною нейропротекторною дією, третій пов'язаний із посиленням продукції вільних радикалів (И. С. Чекман, и соавт. 2010). Не виключено, що антиглюкокортикоїдна активність, пов’язана з нейропротекорною дією сполуки R-86, обумовлена як пригніченням біосинтезу активних стероїдів, так і

послабленням глюкокортикоїдної ексайтотоксичності поряд із антиоксидантною дією.

Сполука R-86 модулює не тільки стероїдну нейротоксичність, а й глутаматну ексайтотоксичність. На нашу думку, цей механізм реалізується опосередковано, через блокування надмірної активності 11β-HSD1, що у свою чергу зменшує роль стресогенного чинника в ЦНС у накопиченні збуджувального нейротрансмітера глутамату. Враховуючи це, механізм захисної дії сполуки R-86 на ішемізовані нейрони є не тільки фундаментом вторинної нейропротекції. Його також можна розглядати крізь призму реалізації засад первинної нейропротекції, що віддзеркалюється в ефективності цієї речовини як у гострому, так і у відновному періоді ГПМК.

Енергодефіцит та метаболічний ацидоз у структурах головного мозку при ГПМК є, поряд із глутаматною та стероїдною нейротоксичністю, ключовими ланками патобіохімічного каскаду в ішемізованих нейронах (И. Ф. Беленичев и соавт., 2009; В. В. Шведський та співавт., 2011). Здатність коригувати енергетичний та кислотно-лужний дисбаланс є бажаними компонентами клітинних механізмів церебропротекторної дії.

Наприкінці експерименту (21 доба) застосування сполуки R-86, мексидолу, цитиколіну, актовегіну та пірацетаму супроводжувалось вірогідним ($p<0,05$) збільшенням у головному мозку вмісту пірувату порівняно з контрольною групою в середньому відповідно на 72,7 %, 64,2 %, 33,3 %, 31,4 % та 8,6 %, зменшенням вмісту лактату – на 54,2 %, 44,0 %, 37,0 %, 30,3 % та 21,9 %, а також зниженням співвідношення лактат/піруват на 71,7 %, 67,1 %, 54,8 %, 49,0 % та 28,5 %.

Надмірна продукція активних форм кисню в структурах головного мозку при ГПМК ініціює в нейронах процеси оксидативного стресу – ПОЛ та ОМБ, що поряд із стероїдною нейротоксичністю порушує мембранну цілісність нейронів та викликає апоптоз або некроз (G. V. Tsakanova, 2010). У відновному періоді інсульту максимальну здатність ліквідувати прояви оксидативного стресу виявила сполука R-86, зменшуючи рівень ТБК-позитивних речовин та КГП порівняно з контрольною патологією відповідно на 46,6 % та 34,6 % ($p<0,05$). Достовірно менший ефект показав мексидол, який вірогідно відносно контролю знижував вміст цих маркерів у ЦНС на 37,9 % та 24,5 %. Останньому поступались цитиколін та актовегін, які порівняно з контролем зменшували рівень ТБК-позитивних речовин відповідно на 29-31 %, а КГП – на 17-18 %. За цих умов найменшу антиоксидантну активність виявляв пірацетам ($p<0,05$). Поряд із цим, при тривалій фармакотерапії (упродовж трьох тижнів) реєструвалось виразне та достовірне зростання активності всіх антиоксидантних ензимів. Так, наприклад, сполука R-86 та мексидол підвищували порівняно з контролем активність СОД, каталази та ГПО на 29-63 %, цитиколін та актовегін – на 14-45 %, пірацетам –лише на 3-15 % ($p<0,05$).

Таким чином, сполука R-86 чинить позитивний модулювальний вплив на оксидантно-антиоксидантний баланс у головному мозку щурів при гострій церебральної ішемії і це є одним із механізмів її нейропротекторної дії. За антирадикальною активністю досліджуване похідне вірогідно перевершує всі

референс-препарати, а за антиоксидантними властивостями зіставляється з мексидолом, достовірно переважаючи цитиколін, актовегін та пірацетам.

Окрім енергодефіциту та оксидативного стресу, важливою ланкою патобіохімічного каскаду в ішемізованих нейронах є порушення обміну монооксиду азоту, а саме дисбаланс експресії різних ізоформ NO-синтаз, що є предиктором виникнення нітрозативного стресу (Jain K. K., 2012; Li-Chieh Ching et al., 2012; A. Mahfoudh-Boussaid et al., 2012). На 21 добу в головному мозку щурів при курсовому веденні сполуки R-86 реєструвалось найвиразніше порівняно з контрольною патологією зростання вмісту L-аргініну (на 60,8 %) та падіння сумарної активності NO-синтаз (на 30,8 %). Зміна досліджуваних показників на тлі мексидолу становила відповідно 44,3 % та 18,2 %, цитиколіну – 32,2 % та 11,3 %, актовегіну – 28,2 % та 9,70 % ($p<0,05$). Коригувальна дія сполуки R-86 на функціонування системи NO в головному мозку може бути однією із ланок його нейропротекторної активності.

Отже, комплексний механізм церебропротекторної дії сполуки R-86 при ГПМК пов'язаний з модулювальним впливом на формування стероїдної та глутаматної нейротоксичності, усуненням енергодефіциту, метаболічного ацидозу, оксидативного ушкодження нейронів, коригувальним впливом на обмін монооксиду азоту, збереженням цитоархітектоніки кори головного мозку, у тому числі за рахунок зменшення апоптозу.

Результати роботи експериментально обґрунтовують доцільність створення лікарського препарату на основі сполуки R-86 для подальшої поглибленої оцінки його ефективності та безпечності як нейроцитопротектора для терапії ішемічного інсульту.

ВИСНОВКИ

Однією із причин незадовільних результатів лікування цереброваскулярної патології (летальність від ішемічного інсульту впродовж перших 30 діб сягає 30 %) є відсутність ефективних патогенетично спрямованих церебропротекторів, що обґрунтовує медично-соціальну значущість розробки та впровадження препаратів цього класу. Глутаматна та стероїдна нейротоксичність як провідні ланки ішемії мозку являють собою потенційну мішень церебропротективної терапії. Тому пошук нових біологічно-активних сполук, зокрема серед похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу, з модулювальним впливом на ці процеси, придатних для створення на їх основі вітчизняних церебропротекторів, є актуальною задачею сучасної фармакології.

1. Із 9 нових похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу, які піддавали скринінгу на антигіпоксичні властивості, сполука-лідер (шифр R-86) в умовно ефективній дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково на моделі гострої нормобаричної гіпоксичної гіпоксії з гіперкапнією, на відміну від решти досліджуваних речовин цього класу, вірогідно збільшує тривалість життя щурів у середньому на 33,7 % ($p<0,05$ проти контрольної патології). Сполука R-86 відноситься до IV класу токсичності (малотоксичні речовини), $ЛД_{50}$ при введенні щурам у шлунок дорівнює 4500 мг/кг.

2. Сполука-лідер R-86 за введення в лікувальному режимі в умовно-ефективній дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково знижує летальність тварин з гострою церебральною ішемією упродовж 96 год спостереження, достовірно ($p<0,05$) переважаючи мексидол (100 мг/кг), цитиколін (250 мг/кг), актовегін (16 мг/кг) та пірацетам (400 мг/кг), а також зменшує неврологічний дефіцит на 38,7% ($p<0,05$) та поліпшує пам'ять у тесті умовної реакції пасивного уникання ($p<0,05$), перевершуючи вищезазначені препарати порівняння. Сполука R-86 зменшує прояви цереброкардіального синдрому на моделі ішемії-реперфузії головного мозку в щурів, знижуючи підйом сегменту ST у середньому на 45,8 % ($p<0,05$) на рівні корвітину (10 мг/кг за кверцетином).

3. У монгольських піщанок (гербел) із моделлю однобічної каротидної ішемії-реперфузії головного мозку сполука R-86 (10 мг/кг) статистично значуще зменшує летальність у критичному періоді (8 год) на 30 % порівняно з пірацетамом ($p<0,05$), не поступаючись цитиколіну та мексидолу. Сполука R-86 за цих умов забезпечує ефективний захист від розвитку цереброкардіального синдрому, зменшуючи елевацію сегменту ST у середньому на 32,9 % ($p<0,05$) та не поступаючись цитиколіну.

4. За лікувального введення сполука R-86 зменшує нейродеструктивні процеси в ішемізованому головному мозку монгольських піщанок (гербел), що доводиться вірогідним зниженням у крові в постреперфузійному періоді активності нейронспецифічної енолази та вмісту білка S 100 відносно контрольної патології у середньому відповідно у 2,9 та 6,6 разу ($p<0,05$). За впливом на зазначені нейромаркери сполука R-86 вірогідно ($p<0,05$) переважає цитиколін у середньому відповідно на 23,8% та 41,8 %. І в гострому, і у відновному періоді модельного інсульту за ішемічним типом досліджувана речовина зберігає цитоархітектоніку та структуру мікроциркуляторного русла головного мозку щурів. За здатністю зберігати морфологічну цілісність соматосенсорної кори головного мозку сполука R-86 не поступається мексидолу.

5. У постреперфузійному періоді гострої церебральної ішемії у щурів сполука R-86 вірогідно краще за цитиколін (в 1,3 разу, $p<0,05$) зменшує інтенсивність фрагментації ДНК в ядрах кортикальних нейронів, що доводить її антиапоптотичні властивості.

6. Сполука R-86 нормалізує титр кортизолу в крові сагітального синуса щурів із білатеральною каротидною оклюзією як у гострому, так і у відновному періоді модельного інсульту, вірогідно переважаючи цитиколін у середньому відповідно у 1,46 та 1,62 разу ($p<0,05$). Це свідчить про зменшення стероїдної нейротоксичності як ланки механізму нейропротекторного ефекту сполуки R-86.

7. У дослідах на перфузованих зрізах мозку щурів сполука R-86 має виражену нейроцитопротекторну активність, зменшуючи в умовах різних ушкоджувальних впливів ступінь зниження популяційних збуджувальних постсинаптичних потенціалів пірамідних нейронів зони CA1 гіпокампу, викликаних електростімуляцією колатералей Шаффера. У механізмах нейропротекторної дії сполуки R-86 беруть участь як процеси зниження ексайтотоксичності, викликаної N-метил-D-аспартатом, так і антиоксидантні

властивості в умовах прямого ушкодження нейронів перексидом водню. При системному попередньому введенні сполука R-86 (10 мг/кг внутрішньоочеревинно) достовірно ($p<0,05$) послаблює ушкодження нейронів, викликане аноксією з нейроглікопенією *in vitro* на зрізах гіпокампу, а також високою дозою системно введеного дексаметазону.

8. До біохімічних механізмів церебропротекторної дії сполуки R-86 при гострій церебральній ішемії відносяться відновлення енергопостачання головного мозку (збільшення вмісту АТФ, малату та пірувату), зменшення вмісту лактату; коригувальний вплив на активність NOS, вміст стабільних метаболітів монооксиду азоту та L-аргініну; зниження інтенсивності пероксидного окиснення ліпідів і окисної модифікації білків, активація ферментативної ланки антиоксидантного захисту мозку (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза). За зазначеними властивостями сполука R-86 перевершує цитиколін, мексидол, актовегін та пірацетам.

9. Результати роботи експериментально обґрунтовують доцільність подальшого доклінічного та клінічного вивчення сполуки R-86 як перспективного лікарського засобу, призначеного для підвищення ефективності вторинної церебропротекції при гострій ішемії головного мозку. Отримані результати є підґрунтям для цілеспрямованого синтезу сполук з церебропротекторною та антигіпоксичною дією.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Ходаковский А. А. Особенности формирования постреперфузионного повреждения нейронов – характеристика модели «ишемия-реперфузия». Новые направления и перспективы развития современной церебропротекторной терапии ишемического инсульта / А. А. Ходаковский, Л. И. Маринич, О. В. Багаури // Врач-аспирант. – Воронеж, 2013. – № 3(58). – С. 69–76. *(Особистий внесок: пошук інформації, планування та проведення досліджень на щурах, , підготовка статті до друку).*

2. Багаурі О. В. Скринінг антигіпоксичної активності в ряду нових похідних 3,2’-спіро-піроло-2-оксіндолу / О. В. Багаурі, Р. Г. Редькін, О. А. Ходаківський // Вісник фармації. – 2013. – №2(74). – С. 63–65. *(Особистий внесок: планування та проведення експерименту, обробка та аналіз отриманих результатів, підготовка статті до друку).*

3. Багаурі О. В. Характеристика морфологічних змін сомато-сенсорної кори головного мозку щурів на тлі експериментальної терапії модельного інсульту похідним 3,2'-спіро-пірроло-2-оксіндолу (сполука R-86) та цитиколіном / О. В. Багаурі, О. А. Ходаківський // Український медичний альманах. – 2013. – Т. 16, № 5. – С. 3–8. *(Особистий внесок: планування та участь у виконанні експерименту, участь у систематизації, статистичній обробці матеріалу та оформленні статті).*

4. Багаурі О. В. Характеристика протиішемічних та мнемотропних властивостей похідного 3,2'-спіро-пірроло-2-оксіндолу (сполука R-86) при модельному гострому порушенні мозкового кровообігу / О. В. Багаурі //

Український журнал клінічної та лабораторної медицини. – 2014. – Т. 9, №1. – С. 26-31.

5. Багаурі О. В. Експериментальна оцінка впливу похідного 3,2'-спіро-пірроло-2-оксіндолу (сполука R-86) на динаміку процесів нейродеструкції при гострій церебральній ішемії / О. В. Багаурі // Український вісник психоневрології. – 2014. – № 2 (79). – С. 22–25.

6. Багаурі О. В. Нейроцитопротекторні властивості похідного 3,2'-спіро-пірроло-2-оксіндолу (сполука R-86) у постреперфузійному періоді гострої церебральної ішемії / О. В. Багаурі, О. А. Ходаківський, Р. Г. Редькін // Український біофармацевтичний журнал. – 2014. – № 1(30). – С. 20–25. *(Особистий внесок: участь в експерименті, систематизація та статистична обробка матеріалу, оформлення та подача статті до друку).*

7. Модулирующее действие производного 3,2'-спиро-пирроло-2-оксиндола на формирование стероидной нейротоксичности, кардиоцеребральной дисфункции и течение нейроапоптоза в условиях экспериментального ишемического инсульта / И. А. Петрик, О. В. Ходаковская, С. Ю. Штрыголь, А. А. Ходаковский // Врач-аспирант. – Воронеж, 2014. – № 6(67). – С. 44–53. *(Особистий внесок: участь у виконанні протокової цитометрії; комплексна оцінка результатів, їх статистична обробка та аналіз, формулювання висновків).*

8. Нейрохимические механизмы церебропротекторного действия производного спиро[индол-3,1'-пиррол[3,4-*c*]пиррола] / О. В. Ходаковская, Д. В. Евдокимов, С. Ю. Штрыголь, И. И. Абрамец, Л. Б. Браверман, А. А. Ходаковский, Р. Г. Редькин // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – Санкт-Петербург, 2015. – Т.14, №1. – С.56-61. *(Особистий внесок: участь в експерименті, статистична обробка та аналіз результатів, формулювання висновків).*

9. Синтез і фармакологічні властивості спіро-2-оксіндолів / Р. Г. Редькін, В. В. Ліпсон, Ф. Г. Яременко, О. А. Ходаківський, О. В. Багаурі, Н. А. Цубанова, Т. В. Кліменко // Українська конференція з органічної хімії : матеріали XXIII міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 95-річчю Національної академії наук України, Чернівці, 16-20 верес. 2013 р. – Чернівці, 2013. – С. 254.

10. Багаурі О. В. Характеристика антигипоксической активности производного 3,2'-спиро-пирроло-2-оксиндола соединения R-86 в условиях модельной гиперкапнии и острой асфиксии / О. В. Багаури, Р. Г. Редькин, А. А. Ходаковский // Фармакологическая нейропротекция : материалы Всерос. научн.-практ. конф. с междунар. уч., посвящ. 90-летию Отдела нейрофармакологии им. С. В. Аничкова Института экспериментальной медицины СЗО РАМНС, Санкт-Петербург, 18-21 сент. 2013 г. – СПб, 2013– С. 17–18.

11. Багаурі О. В. Модулювальні властивості похідіного 3,2'-спіро-пірроло-2-оксіндолу сполуки R-86 на формування цереброкардіального синдрому в умовах експериментального геморагічного та ішемічного інсульту / О. В. Багаурі, Л. Б. Браверман, О. А. Ходаківський // Інтегративна антропологія : матеріали VII міжнар. конгр, Вінниця, 17-18 жовтн. 2013 р. – Вінниця, 2013. – С. 11–12.

12. Доцільність використання похідного 3,2'-спіро-пірроло-2-оксіндолу (сполука R-86) в якості церебропротектора для недиференційованої терапії гострих порушень мозкового кровообігу / О. В. Багаурі, Л. Б. Браверман, Р. Г. Редькін, О. А. Ходаківський // Клінічна фармакологія та фармакотерапія захворювань в світлі доказової медицини : матеріали VII Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. уч. з клінічної фармакології, присвяч. 75-річчю кафедри фармакології і 25-річчю кафедри клінічної фармації і клінічної фармакології ВНМУ, Вінниця, 20-21 листоп. 2013 р.– Вінниця, 2013. – С. 159–160.

13. Багаури О. В. Нейропротекторные эффекты селективного ингибитора 11-β-гидроксистероиддегидрогеназы в условиях экспериментальной церебральной ишемии / О. В. Багаури, Л. Б. Браверман, А. А. Ходаковский, Р. Г. Редькин // Человек и лекарство : материалы XXI Рос. нац. конгр., Москва, 7–11 апр. 2014 г. – Москва, 2014. – С. 200-201.

14. Bagauri O. V. Modulating effect of derivative of 3,2'- spiro-pyrrhol-2-oxindole compound R-86 on formation of cerebrocardiac syndrome in the course of experimental haemorrhagic and ischemic insult / O. V. Bagauri, L. B. Braverman, O. A. Khodakivskyi // Актуальні питання створення нових лікарських засобів: матеріали Всеукр. наук.-практ. конф. студ. та мол. вчених, Харків, 22-23 квіт. 2014 р. – Х. : НФаУ, 2014. – С. 167.

15. Багаурі О. В. Експериментальне обґрунтування доцільності застосування блокатору 11-β-гідроксистероїддегідрогенази 1-го типу для корекції постреперфузійної церебральної ішемії / О. В. Багаурі, О. А. Ходаківський // V наук. конф. мол. вчених з міжнар. уч. : матеріали, Вінниця, 15-16 травн. 2014 р. – Вінниця, 2014. – С. 85.

16. Ходаковская О. В. Мониторинг маркеров нейроцитодеструкции на фоне применения ингибитора фермента 11-β- гидроксистероиддегидрогеназы 1-го типа в условиях модельного геморрагического и ишемического инсульта / О. В. Ходаковская, Л. Б. Браверман // V Междунар.(XII итог.) научн.-практ. конф. мол. уч., посвящ. 70-летию ЮУГМУ: материалы, Челябинск, 2 октябр. 2014 г. – Челябинск, 2014. – С. 165–168.

17. Ходаківський О. А. Перспективи використання нового похідного 3,2’-спіро-піроло-2-оксіндолу як церебропротектора при ішемії головного мозку : інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров’я № 323-2013 / О. А. Ходаківський, Р. Г. Редькін, О. В. Багаурі. – К., 2013. – 4 с.

АНОТАЦІЯ

Ходаківська О.В. Церебропротекторна активність нових похідних 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу в умовах ішемічного інсульту (експериментальне дослідження). – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 14.03.05 – фармакологія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2015.

Дисертацію присвячено експериментальному обґрунтуванню підвищення ефективності вторинної церебропротекції при гострій ішемії головного мозку шляхом застосування похідного 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу, а саме

спіро[індол-3,1'-пірол[3,4-*c*]пірола]-5'-(4-метилфеніл)-3'-[2-(метилтіо)етил]-3а',6а'-дигідро-2'h-спіро[індол-3,1'-піроло[3,4-с]пірол]-2,4',6'(1h,3'h,5'h)-тріону (сполука R-86) з модулювальним впливом на стероїдну та глутаматну нейротоксичність.

На моделях гострої гіпоксії та ішемії головного мозку у щурів і монгольських піщанок встановлено, що сполука R-86 виявляє дозозалежну антигіпоксичну та церебропротекторну активність. В умовно ефективній дозі 10 мг/кг внутрішньошлунково сполука R-86 зіставляється або переважає цитиколін, пірацетам, мексидол та актовегін, зменшуючи летальність тварин, покращуючи їх неврологічний статус, поліпшуючи пам'ять та редукуючи прояви цереброкардіального синдрому. На перфузованих зрізах гіпокампу щурів сполука R-86 зменшує ступінь зниження популяційних збуджувальних постсинаптичних потенціалів пірамідних нейронів зони CA1, індукованих електростимуляцією колатералей Шаффера, при впливі NMDA, пероксиду водню, аноксії з нейроглікопенією та дексаметазону. Механізм церебропротекторної дії сполуки R-86 при гострому порушенні мозкового кровобігу пов'язаний з модуляцією стероїдної та глутаматної нейротоксичноісті, усуненням енергодефіциту, метаболічного ацидозу, оксидативного ушкодження нейронів, коригувальним впливом на обмін монооксиду азоту, збереженням цитоархітектоніки кори головного мозку, у тому числі за рахунок зменшення апоптозу. Результати експериментально обґрунтовують доцільність створення лікарського препарату на основі сполуки R-86 для поглибленої оцінки її ефективності та безпечності як нейроцитопротектора при ішемічному інсульті.

Ключові слова: похідні 3,2'-спіро-піроло-2-оксиндолу, ішемічний інсульт, ішемія-реперфузія, глюкокортикоїдна нейротоксичність, церебропротекція.

АННОТАЦИЯ

Ходаковская О.В. Церебропротекторная активность новых производных 3,2'-спиро-пирроло-2-оксиндола в условиях ишемического инсульта (экспериментальное исследование). – На правах рукописи.

Диссертация на соискание начной степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.03.05 – фармакология. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2015.

Диссертация посвящена экспериментальному обоснованию повышения эффективности вторичной церебропротекции при острой ишемии головного мозга путем применения производного 3,2'-спиро-пирроло-2-оксиндола, а именно спиро[индол-3,1'-пиррол[3,4-с]пиррола]-5'-(4-метилфенил)-3'-[2-(метилтио)етил]-3а',6а'-дигидро-2'h-спиро[индол-3,1'-пироло[3,4-с]пирол]-2,4',6'(1h,3'h,5'h)-триона (соединение R-86) с модулирующим действием на стероидную и глутаматную нейротоксичность.

На моделях острой гипоксии и ишемии головного мозга у животных двух видов – крыс и монгольских песчанок (гербел) – установлено, что соединению R-86 присуща дозозависимая антигипоксическая и церебропротекторная активность. При терапевтическом режиме введения соединение R-86 в условноэффективной дозе 10 мг/кг внутрижелудочно снижает летальность

животных с острой церебральной ишемией, уменьшает неврологический дефицит (в среднем на 38,7%, $p<0,05$), улучшает память в тесте условной реакции пассивного избегания, достоверно ($p<0,05$) превосходя мексидол (100 мг/кг), цитиколин (250 мг/кг), актовегин (16 мг/кг) и пирацетам (400 мг/кг). На модели ишемии-реперфузии головного мозга у крыс соединение R-86 уменьшает проявления цереброкардиального синдрома, уменьшая подъем сегмента ST в среднем на 45,8% ($p <0,05$), не уступая при этом корвитину (10 мг/кг по кверцетину). Соединение R-86 ослабляет нейродеструктивные процессы в ишемизированном головном мозге монгольских песчанок, о чем свидетельствует достоверное относительно группы контрольной патологии снижение активности нейронспецифической енолазы и уровня белка S 100 в крови в среднем соответственно в 2,9 и 6,6 раза ($p<0,05$). По величине корригирующего влияния на указанные нейромаркеры соединение R-86 достоверно ($p<0,05$) превосходит цитиколин в среднем соответственно на 23,8 % и 41,8 %. В остром и восстановительном периодах модельного ишемического инсульта исследуемое вещество способствует сохранению цитоархитектоники и структуры микроциркуляторного русла нервной ткани крыс, не уступая мексидолу. В постреперфузионном периоде острой церебральной ишемии у гербел соединение R-86 достоверно лучше цитиколина (в 1,3 раза, $p<0,05$) уменьшает интенсивность фрагментации ДНК (маркер нейроапоптоза) в ядрах корковых нейронов, что свидетельствует о его антиапоптотических свойствах.

Биохимические механизмы защитного действия соединения R-86 при острой церебральной ишемии характеризуются восстановлением энергообеспечения головного мозга (увеличение содержания АТФ, малата, пирувата и уменьшение содержания лактата), корригирующим влиянием на активность NOS, содержание стабильных метаболитов оксида азота и L-аргинина, снижением интенсивности липопероксидации и окислительной модификации белков, активацией ферментативного звена антиоксидантной защиты мозга (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза). По этим свойствам соединение R-86 превосходит цитиколин, мексидол, актовегин и пирацетам. Соединение R-86 нормализует содержание кортизола в крови сагитального синуса крыс с билатеральной каротидной окклюзией и в остром, и в восстановительном периоде модельного инсульта, достоверно превосходя цитиколин в среднем соответственно в 1,46 и 1,62 раза ($p<0,05$). Это свидетельствует об уменьшении стероидной нейротоксичности, что является составляющим звеном нейропротекторного эффекта. В опытах на перфузируемых срезах гиппокампа крыс по уменьшению степени снижения популяционных возбуждающих постсинаптических потенциалов пирамидных нейронов зоны CA1 установлено, что соединение R-86 снижает эксайтотоксичность, вызванную NMDA, и проявляет антиоксидантные свойства в условиях прямого повреждения нейронов перекисью водорода. Соединение R-86 достоверно ($p<0,05$) ослабляет повреждения нейронов, вызванные аноксией с нейрогликопенией либо высокими дозами системно введенного дексаметазона.

Комплексный механизм церебропротекторного действия соединения R-86 при остром нарушении мозгового кровообращения связан с модулирующим

влиянием на формирование стероидной и глутаматной нейротоксичности, устранением энергодефицита, метаболического ацидоза, оксидативного повреждения нейронов, корригирующим влиянием на обмен оксида азота, сохранением цитоархитектоники коры головного мозга, в том числе за счет уменьшения апоптоза. Результаты работы экспериментально обосновывают целесообразность создания лекарственного препарата на основе соединения R-86 для углубленной оценки его эффективности и безопасности как нейроцитопротектора при ишемическом инсульте.

Ключевые слова: производные 3,2'-спиро-пирроло-2-оксиндола, ишемический инсульт, ишемия-реперфузия, глюкокортикоидная нейротоксичность, церебропротекция.

SUMMARY

Khodakivska O.V. Cerebroprotective activity of the new 3,2'-spiro-pyrole-2-oxindole derivates in ischemic stroke (experimental research). – Manuscript.

The thesis for a Candidate of Pharmaceutical Sciences Degree by the speciality 14.03.05 – Pharmacology. – National University of Pharmacy of Ministry of Healthcare of Ukraine, Kharkiv, 2015.

The thesis is dedicated to increase of efficacy of the secondary cerebroportection in acute cerebral ischemia by using 3,2'-spiro-pyrole-2-oxindole derivate, namely spiro[indole-3,1'-pyrrole[3,4-c] pyrrole]-5'-(4- methylphenyl)-3'-[2-(methylthio)ethyl]-3a',6a'- dihydro -2'h- spiro[indole-3,1'- pyrrole[3,4-c]pyrrole]-2,4',6'(1h,3'h,5'h)-trione (compound R-86) with modulating effect to steroid glutamate neurotoxicity.

Using the models of acute cerebral hypoxia and ischemia in rats and Mongolian gerbils, it was determined that the compound R-86 shows the dose-dependent anti-hypoxic and cerebroprotective effect. Activity of the compound R-86 after intragastric administration in relatively effective dose 10 mg/kg is comparable to or exceeds the effects of citicoline, piracetam, mexidolum and actovegin; it includes reduction of animals lethality, improvement of neurological status, memory amelioration and diminishing the symptoms of cerebrocranial syndrome. Examination of rat hippocampal perfused sections showed that the compound R-86 reduces the grade of population excitatory post-synaptic potential decrease in pyramidal neurons of CA1 area, which had been inducted by electro stimulation of Shaffer collaterals, under the effect of NMDA, hydrogen peroxide, anoxia with neuro-glycopenia, dexamethasone. Mechanism of R-86 cerebroprotective effect in acute cerebral perfusion disorder is associated with modulation of steroid and glutamate neurotoxicity, elimination of energy deficiency, metabolic acidosis, neuron oxidant injury, corrective effect on nitrogen monoxide metabolism, preservation of cerebral cortex cytoarchitectonics due to mechanisms which include reduction of apoptosis. The obtained results experimentally prove the advisability of R86-based drug development for deeper investigation of its efficacy and safety as of cerebroprotector for ischemic stroke.

Key words: 3,2'-spiro-pyrole-2-oxindole derivates, ischemic stroke, ischemia-reperfusion, glucocorticoid neurotoxicity, cerebroprotection.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АДФ – аденозиндифосфорна кислота
АМФ – аденозинмонофосфорна кислота
АТФ – аденозинтрифосфорна кислота
БКО – білатеральна каротидна оклюзія
в/о – внутрішньоочеревинно
в/ш – внутрішньошлунково
ГНГГГ – гостра нормобарична гіпоксична гіпоксія з гіперкапнією
ГПМК – гостре порушення мозкового кровообігу
ГПР – глутатіонпероксидаза
ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота
ІР – ішемія-реперфузія
КГП – карбонільні групи протеїнів
ОМБ – окисна модифікація білка
пЗПСП – популяційні збуджувальні постсинаптичні потенціали
ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів
СА – сонна артерія
СОД – супероксиддисмутаза
УРПУ – умовна реакція пасивного уникання
11β-HSD1 – 11-β-гідроксистероїддегідрогеназа першого типу
L-Arg – L-аргінін
NMDA – N-метил-D-аспартат
NO – монооксид азоту
NOS – NO синтаза
NSE – нейронспецифічна енолаза
S 100 – білок S 100