

РОЗДІЛ 5. БІООРГАНІЧНА ХІМІЯ ТА БІОЛОГІЧНО АКТИВНІ СПОЛУКИ

УДК 571.1:577.352:599.23:616.36-002

ВПЛИВ N-АЦИЛЬНИХ ПОХІДНИХ S-(2-МЕТИЛХІНОЛІН-4-ІЛ)-L-ЦИСТЕЇНУ НА МЕМБРАНИ ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ ПРИ ТОКСИЧНОМУ ГЕПАТИТІ

Лабенська І. Б., к. б. н., ст. викладач, Омелянчик Л. О., д. фарм. н., професор,
Бразко О. А., д. б. н., професор, *Римаренко О.В., студент

Запорізький національний університет

**Київський національний університет імені Тараса Шевченка*

Досліджено вплив нових N-ацильних похідних-S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну на кислотну, осмотичну та перекисну резистентність еритроцитів щурів в умовах токсичного гепатиту. Встановлено, що ступінь вираженості ефекту більше залежить від модифікації аміногрупи, ніж від природи замісника в шостому положенні хіноліну. Найбільшу мембраностабілізуючу активність при пошкодженні еритроцитів виявляє динатрієва сіль N-сукциноіл-S-(6-етокси-2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну.

Ключові слова: N-ацильні похідні S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну, кислотна, осмотична, перекисна резистентність еритроцитів.

Лабенская И. Б., Омелянчик Л. О., Бразко А. А., Рымаренко О. В. ВЛИЯНИЕ N-АЦИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ S-(2-МЕТИЛХИНОЛИН-4-ИЛ)-L-ЦИСТЕИНА НА МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ / *Запорожский национальный университет, *Киевский национальный университет им. Т. Шевченко, Украина*
Исследовано влияние новых N-ацильных производных S-(2-метилхинолин-4-ил)-L-цистеина на кислотную, осмотическую, перекисную резистентность эритроцитов крыс в условиях токсического гепатита. Установлено, что степень выраженности эффекта больше зависит от модификации аминогруппы, чем от природы заместителя в шестом положении хинолина. Наибольшую мембраностабилизирующую активность при повреждении эритроцитов проявляет динатриевая соль N-сукциноил-S-(6-этокси-2-метилхинолин-4-ил)-L-цистеина.

Ключевые слова: N-ацильные производные N-ацил-S-(2-метилхинолин-4-ил)-L-цистеина, кислотная, осмотическая, перекисная резистентность эритроцитов.

Labenskaya I. B., Omeliyanchik L. O., Brazhko A. A., *Rymarenko O. V. THE INFLUENCE OF N-ACYL DERIVATES OF S-(2-METHYLQUINOLINE-4-YL) - L-CYSTEINE ON MEMBRANE ERYTHROCYTES RATS' IN THE TOXIC HEPATITIS / *Zaporizhzhya national university, *Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ukraine*

The influence of new N-acyl derivatives of S-(2-methylquinoline-4-yl)-L-cysteine on acidic, osmotic and peroxide resistance of erythrocytes of rats in condition of toxic hepatitis has been investigated. It has been started that the degree of evidence of the effect depends on modification of amides more, than on the nature of the substitute in the sixth position of quinoline. The most significant stabilizing membrane action under damage erythrocytes renders dinatrium salt N-succinoil-S-(6-ethoxy-2-methylquinoline-4-il)-L-cysteine.

Keywords: N-acyl derivatives of S-(2-methylquinoline-4-yl)-L-cysteine, acidic, osmotic, peroxide resistance erythrocytes.

ВСТУП

Основним напрямком сучасної гепатології є адекватна фармакологічна корекція захворювань органів гепатобіліарної системи. Тому залишається актуальним питання пошуку засобів стабілізації мембран гепатоцитів, що втрачають свої функціональні

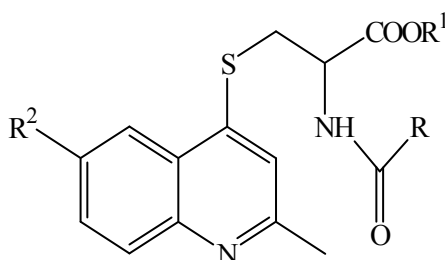
властивості при патологічних станах або під впливом різноманітних несприятливих факторів навколишнього середовища. В механізмі пошкодження мембран важливе місце приділяється модифікації структурних білків та ліпідів, яка ініціюється порушенням процесів вільно-радикального окиснення ліпідів (ВРОЛ) [1].

Результати попередніх досліджень свідчать, що похідні 4-меркаптохіноліну проявляють значну антиоксидантну активність, яка реалізується за рахунок їх здатності виконувати роль «пасток» активних форм кисню і тим самим впливати на процеси ВРОЛ [2-4]. Продовжуючи пошук потенційних біорегуляторів серед заміщених 4-меркаптохіноліну, проведено віртуальний скринінг нових N-ацил-S-(2-метилхінолін-4-іл)-цистеїнів на основі комп'ютерної програми PASS (Prediction Activity Spectra for Substances). Аналіз результатів вказує на імовірність наявності широкого спектру біологічної активності даних сполук, зокрема антиоксидантної, мембранопротективної, гепатопротективної, та відсутність високої токсичності, терато- та канцерогенності, ембріотоксичності [2, 5].

У лабораторії біотехнології фізіологічно активних сполук ЗНУ нами синтезовано нові похідні N-ацил-S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну, принципова будова яких наведена у таблиці 1.

Таблиця 1

N-ацил-S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїни



№ сполук	R	R ₁	R ₂	Емпірична формула
1	(CH ₂) ₂ COO Na	Na	H	C ₁₇ H ₁₆ N ₂ Na ₂ O ₅ S
2	(CH ₂) ₂ COO Na	Na	6-OCH ₃	C ₁₈ H ₁₈ N ₂ Na ₂ O ₆ S
3	(CH ₂) ₂ COO Na	Na	6-OC ₂ H ₅	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ Na ₂ O ₆ S
4	C ₆ H ₅	Na	6-OCH ₃	C ₂₁ H ₁₉ N ₂ NaO ₄ S
5	CH ₂ Cl	H	6-OC ₂ H ₅	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ O ₄ S
6	CH ₂ Cl	Na	6-OC ₂ H ₅	C ₁₇ H ₁₈ ClN ₂ NaO ₄ S
7	CH ₃	CH ₃	6-OCH ₃	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₄ S
8	CH ₃	CH ₃	6-OC ₂ H ₅	C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₄ S
9	(CH ₂) ₂ COOH	CH ₃	6-OC ₂ H ₅	C ₂₀ H ₂₄ N ₂ O ₆ S

Як і передбачалося, дані сполуки, за класифікацією Сидорова, відносяться до малотоксичних (ЛД₅₀ 100-1000 мг/кг) та нетоксичних (ЛД₅₀>1000 мг/кг) сполук і у зв'язку з цим, нашу увагу привернула їх мембранопротективна дія. Гіперпродукція активних форм кисню є джерелом окислювального ушкодження не тільки гепатоцитів, але й клітин крові, головним чином еритроцитів, що дозволяє використовувати їх для визначення інтенсивності процесу [6, 7].

Метою даної роботи є дослідження впливу нових сполук, N-ацильних похідних (2-метилхінолін-4-іл)-цистеїну на стан мембран еритроцитів в умовах гострого токсичного гепатиту.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Мембраностабілізуюча дія N-ацильних похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну досліджувалась після щоденного внутрішньочеревного введення сполук 1-9 щурам протягом 14 днів на фоні токсичного гепатиту. З метою визначення структурних перетворень в еритроцитах оцінювали їх стійкість до кислотного, осмотичного та перекисного гемолізу. Гостре ураження печінки викликали тетрахлорметаном, класичним мембранотропним токсином, який викликає підсилення вільно-радикального і перекисного окиснення в біомембранах клітин [8].

Еталон порівняння – тіотриазолін, вітчизняний сульфуровмісний антиоксидант та гепатопротектор [9].

Матеріал для досліджень – кров щурів (n=6), яку отримували після декапітації під ефірним наркозом і збирали в пробірки, оброблені гепарином [10]. Еритроцити тричі відмивали фізіологічним розчином та готували суспензію згідно з відповідною методикою.

Для визначення стану фосфоліпідного прошарку мембран оцінювали кислотну резистентність мембран еритроцитів за методом Трескова та Гітельсона у модифікації Вороб'їєва [11]. Реєстрували час повного гемолізу (хв), максимум гемолізу (у %), розподілення еритроцитів по стійкості до гемолізу (у %). Кількісне визначення ступеню гемолізу еритроцитів крові щурів у забуферних гіпотонічних розчинах натрію хлориду проводилось уніфікованим методом в модифікації Ідельсона [12]. Перекисну резистентність еритроцитів вивчали за методом Кузнецової [13]. Результати аналізувалися на предмет вірогідності їхніх розходжень з використанням критерію Стюдента. Розходження вважали вірогідними при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Порушення функцій біологічних мембран під впливом токсичних речовин в багатьох випадках є не тільки результатом, а й причиною патологічних змін у клітині та організмі в цілому. Окиснення поліненасичених жирних кислот, за рахунок утворення гідроперекисей, призводить до появи ділянок «отворів», через які вміст клітин та їх органел виходить за межі мембрани. В результаті формується синдром цитолізу. Можливо виділити ряд загальних закономірностей реакцій еритроцитів та еритрона на дію токсикантів: зміни структури мембранних компонентів, що призводить до порушення резистентності клітин; зсуви концентрації внутріклітинних катіонів в результаті порушення проникності мембран; зміни активності ферментів гліколізу та пентозофосфатного циклу, зменшення вмісту макроергів (АТФ), що в свою чергу, можна вважати однією з причин порушення мембран [14-16].

Саме кислотний гемоліз, з точки зору фундаментальної науки є найбільш інформативним при аналізі стану еритроцитарної мембрани та процесів, що проходять в ній [11]. Встановлено, що всі досліджені сполуки суттєво впливали на кислотну резистентність еритроцитів (табл. 2). Найменш виражений деструктивний вплив на еритроцити отримали при введенні динатрієвої солі N-сукциноіл-S-(6-етокси-2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну (сполука 3). Дана сполука ефективно регулювала час та ступінь гемолізу і значно підвищувала стійкість еритроцитів у порівнянні з контролем: суттєво знижувався відсоток еритроцитів низької стійкості (від $90,7 \pm 0,2\%$ до $61,8 \pm 0,3\%$) і підвищувався відсоток еритроцитів високої (від 0 до $4,6 \pm 0,1\%$) та середньої стійкості (від $8,7 \pm 0,2\%$ до $33,3 \pm 0,1\%$).

Її дія сприяла підвищенню кількості молодих еритроцитів, що, імовірно, вказує на активізацію регенераторних властивостей і перевершувала профілактичний вплив тіотриазоліну (рис.1). Відсутність замісника в шостому положенні хіноліну (сполука 1) та наявність метоксигрупи (сполука 2), зменшує позитивний вплив на показники КРЕ,

але стабілізуючий ефект дії даних сполук зберігається на рівні речовини порівняння. Етерифікація N-ацильних похідних з метокси- та етоксигрупою в шостому положенні призводила до розвитку помірної активності. Модифікація сукциноільної групи бензоїлом (сполука 4) знижує стійкість еритроцитів до кислого середовища. Відмічено зсув кислотної еритрограми вліво при введенні натрієвої солі N- α -хлорацетил-S-(6-етокси-2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну (сполука 6) та N- α -хлорацетил-S-(6-етокси-2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну (сполука 5) із тенденцією до зниження показника тривалості гемолізу. Зазначені зміни свідчили про критичне зниження стійкості мембрани до дії гемолітика, відсутність стабілізуючої дії на клітинну мембрану еритроцитів, що зумовлює прискорення їх гемолізу.

Таблиця 2 – Параметри кислотного гемолізу при введенні досліджуваних сполук

Параметри Сполуки	Тривалість гемолізу, хв	Максимум гемолізу, %	Г р у п и е р и т р о ц и т і в, %		
			низької стійкості	середньої стійкості	високої стійкості
Контроль	4,6 $\pm$ 0,1	62,1 $\pm$ 2,8	91,3 $\pm$ 2,8	8,7 $\pm$ 2,1	0
Інтактні щури	7,1 $\pm$ 0,4*	34,2 $\pm$ 1,6*	17,3 $\pm$ 0,9*	75,5 $\pm$ 3,5*	7,2 $\pm$ 1,9*
Сполука 1	5,5 $\pm$ 0,6	50,0 $\pm$ 1,0	81,7 $\pm$ 1,9	17,3 $\pm$ 2,4*	1,0 $\pm$ 0,3
Сполука 2	5,8 $\pm$ 0,2*	44,6 $\pm$ 1,5	77,2 $\pm$ 2,1	21,1 $\pm$ 3,0*	1,7 $\pm$ 0,8
Сполука 4	5,0 $\pm$ 0,8	56,3 $\pm$ 0,7	85,1 $\pm$ 3,6	14,9 $\pm$ 1,5*	0
Сполука 3	6,1 $\pm$ 0,2*	40,5 $\pm$ 1,1*	61,8 $\pm$ 4,1*	33,6 $\pm$ 3,6*	4,6 $\pm$ 1,2*
Сполука 5	4,8 $\pm$ 0,6	57,7 $\pm$ 1,1	90,7 $\pm$ 4,0	9,3 $\pm$ 2,6	0
Сполука 6	5,1 $\pm$ 0,4	55,3 $\pm$ 0,1	88,3 $\pm$ 2,3	11,7 $\pm$ 3,1	0
Сполука 7	5,4 $\pm$ 0,6	53,8 $\pm$ 1,0	82,7 $\pm$ 3,8	18,1 $\pm$ 2,3*	0,2 $\pm$ 0,1
Сполука 8	5,6 $\pm$ 0,6	50,4 $\pm$ 0,9	84,9 $\pm$ 2,9	14,6 $\pm$ 1,9*	0,5 $\pm$ 0,1
Сполука 9	5,6 $\pm$ 0,4	48,3 $\pm$ 1,1	80,5 $\pm$ 2,2	18,8 $\pm$ 4,1*	0,7 $\pm$ 0,1
Тіотриазолін	5,8 $\pm$ 0,2*	40,1 $\pm$ 1,4*	75,4 $\pm$ 2,1	22,3 $\pm$ 3,9*	2,3 $\pm$ 1,6

Примітка. * – $P < 0,05$ у порівнянні з контролем

Для всіх досліджених сполук спостерігався один максимум гемолізу.

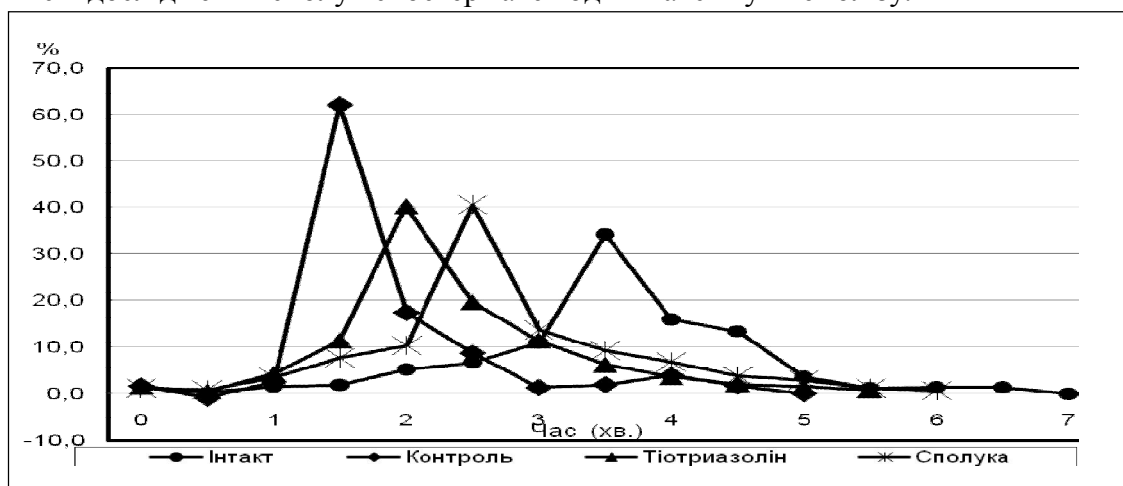


Рис. 1. Кислотна еритрограма при введенні динаматрієвої солі N-сукциноїл-S-(6-етокси-2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну (сполука 3)

Токсичний гепатит супроводжується зниженням осмотичної резистентності мембран еритроцитів низькостійкої популяції що пов'язано зі зниженням енергетичного потенціалу, зміною ліпідного складу, порушенням проникності клітин [4]. Еритроцити щурів, що отримували сполуку 3 за стійкістю до впливу гіпоосмотичних розчинів знаходяться на рівні речовини порівняння - тіотриазоліну (початок гемолізу при концентрації NaCl =0,50%, повний гемоліз при 0,30%). Вважають, це пов'язано з тим, що контроль за станом цитоскелету реалізується через процес фосфорилування білків і залежить від кількості АТФ[4]. Кількість енергії, необхідної для відновлення форми еритроциту та активного транспорту катіонів крізь його мембрану, імовірно, збільшується за рахунок введення фармакофора - сукцинату, інтермедіанту циклу Кребса (рис. 2).

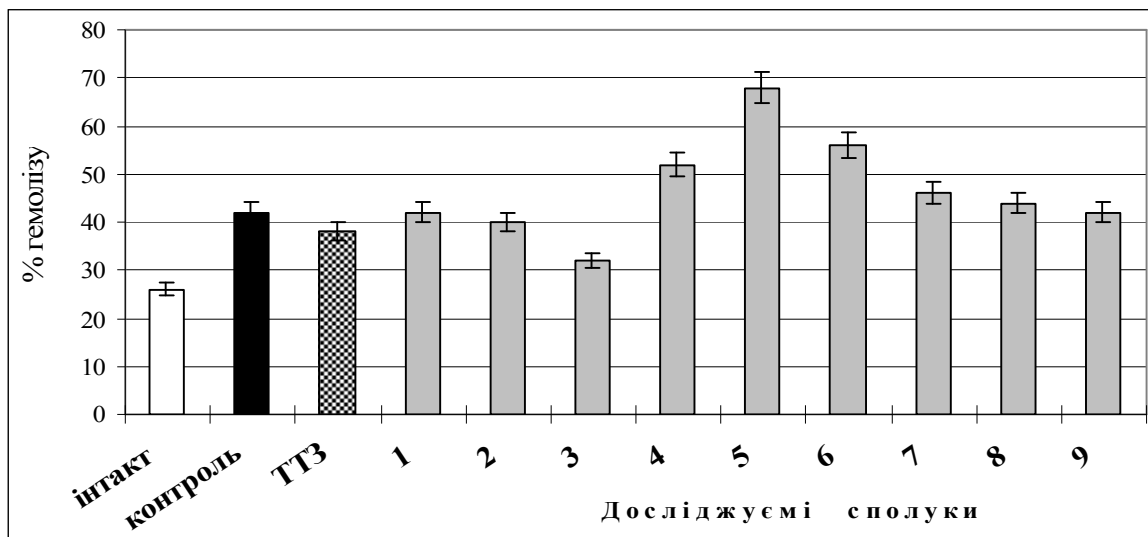


Рис. 2 Вираженність гіпоосмотичного гемолізу еритроцитів сполук

Введення в 6 положення хінолінового циклу інших замісників (метоксигрупа та гідроген) перешкоджає позитивній динаміці, про що свідчить руйнування червоних клітин крові, яке розпочиналось при концентрації NaCl 0,55% і одночасно гемолізувалося 40% та 42% еритроцитів відповідно (сполуки 1, 2). Діапазон осмотичної стійкості зберігався. Схожий ефект відмічається при введенні щурам естерів (сполуки 7, 8, 9). Гідрофільність даних сполук, імовірно, призводить до підвищення рухливості білкових та ліпідних компонентів біомембрани, внаслідок чого вони становляться більш ригідними і менш «крихкими» при підвищенні об'єму еритроцитів в гіпотонічному середовищі. При введенні піддослідним тваринам розчину сполук 4, 5, 6, імовірно, за рахунок швидкого порушення метаболічних процесів відбувалася інтенсивна модифікація біомембрани, що має відображення в вихідному зниженні гіпоосмотичної стійкості еритроцитів.

Перекичний гемоліз еритроцитів відображує про- та антиоксидантний баланс організму по кількості первинних та вторинних продуктів ВРОЛ. Стійкість еритроцитів до перекичної провокації значно підвищувалась в умовах введення сполуки 3 (рис 3).

Отримані результати, аналогічні показникам препарату порівняння, наближались до рівня інтактної групи, імовірно, за рахунок зниження в'язкості ліпідів мембран, активізації включення фосфату у фосфатидилову кислоту мембран, підвищення рівня поліненасичених довголанцюгових жирних кислот при ацилюванні, рухливості білкових молекул та межбілкових впливів [14, 17,18,19]. При введенні в шосте положення хінолінового циклу метоксигрупи та відсутності замісника (сполуки 1, 2) виявлено зменшення оптичної густини відносно контролю в діапазоні 230-260 нм на 31,4%, та 46,2 % та у діапазоні 270-300 нм – на 33,1% та 24,9% відповідно ($p < 0,05$).

Дані сполуки зменшують кількість первинних та вторинних продуктів ВРОЛ і гальмують пошкодження еритроцитів, але сумарна оптична густина збільшилась відносно інтактної групи у 1,77 та 1,56 рази відповідно, що свідчить про підвищення сорбційної здатності мембран еритроцитів внаслідок їх пошкодження хімічним агентом.

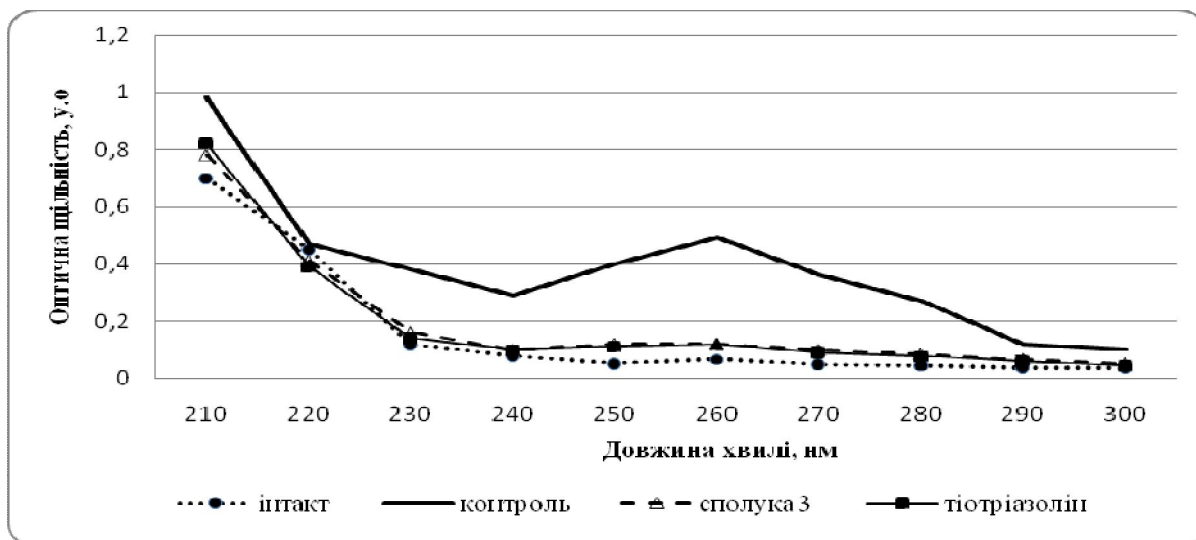


Рис. 3. Спектрограма супернатанта еритроцитів щурів при введенні досліджуваних сполук

Аналогічні зміни характерні для естерів (сполуки 7-9). Ступінь вираженості гемолізу еритроцитів залежала від замісників по аміногрупі та в шостому положенні хіноліну. Показники впливу на перекисну резистентність еритроцитів при введенні сполук 4, 5, 6 відрізнялися більш вираженими негативними змінами.

ВИСНОВКИ

1. Визначено вплив нових похідних N-ацил-S-(2-метилхінолін-4-іл)-цистеїну на кислотну, осмотичну та перекисну резистентність еритроцитів на моделі токсичного гепатиту. Встановлено, що дія досліджуваних сполук на еритроцитарну мембрану призводить до зменшення пошкоджень клітинної архітектури.
2. Вираженість позитивного ефекту більшою мірою залежить від модифікації аміногрупи, ніж від природи замісника в шостому положенні хіноліну.
3. Найбільш значну мембраностабілізуючу активність при пошкодженні еритроцитів гемолітичними агентами проявляє динатрієва сіль N-сукциноіл-S-(6-етокси-2-метилхінолін-4-іл)-L-цистеїну (сполука 3).

ЛІТЕРАТУРА

1. Гуськова Т. А. Концепция развития лекарственной токсикологии / Т. А. Гуськова // Хим.-фарм. журн.-2001.-35, №10.- С. 3-8.
2. Пошук антиоксидантів серед похідних S-(хінальдиніл-4)-L-цистеїну / [О.А.Бражко, Л.О. Омелянич, Д. М. Федоряк та ін.] // Біополімери і клітина.- 2003. –Т. 19, №4.- С. 374-377.
3. Бражко О. А. Біологічно активні похідні хіноліну та акридину з азото – та сірковмісними функціональними групами: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора біол. наук / Бражко О. А. – Запоріжжя, 2005. – 42 с.
4. Синтез потенційних біорегуляторів серед S-заміщених L-цистеїну та цистеаміну / [О.А.Бражко, Л.О.Омелянич, М.П.Завгородній, В.І.Генчева та ін.]// XXI

Українська конференція з органічної хімії: тези доповідей, 1-5 жовтня 2007р.– Чернівці, 2007.–С. 22.

5. Віртуальний скринінг N-ацильних похідних S-гетерил-L-цистеїну / [І.Б. Лабенська, Л.О.Омельянчик, О.А.Бражко та ін.] // Сучасні проблеми біології, екології та хімії: тези доповідей міжнар конф., 29 березня - 1 квітня 2007р. – Запоріжжя, 2007. – С. 556-558.
6. Оцінка токсичності та цитотоксичності нових похідних S-(2-метилхінолін-4-іл)заміщених цистеаміну та L-цистеїну / [М.М. Корнет, О.А. Бражко, М. П. Завгородній, та ін.]/ Актуальні питання фарм. та мед. науки і практики: збірник наук. статей – Запоріжжя, ЗДМУ. – 2007. – Вип. XX. – С. 293-294.
7. Доклінічні дослідження лікарських засобів (метод. рекомендації) / наук. ред. Стефанов О. В. – К., 2001. – 528с.
8. Engin A. Effects of obstructive jaundice on the antioxidative capacity of human red blood cells / A. Engin, N. Altan // Haematologia. – 2000. –Vol. 30, № 2. – P. 91–96.
9. Тиотриазолин: фармакологические аспекты и клиническое применение / [И. А. Мазур, Н. А. Волошин, И. С. Чекман и др.] – Запорожье, 2005. – 160 с.
10. Науково–практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / [Ю. М. Кожемякін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко та ін.] – К., 2002. – 155 с.
11. Тресков И. А. Метод кислотных эритрограмм / И. А. Тресков, И. И. Гительзон // Биофизика. – 1957. – Т. 11, № 2. – С. 259–266.
12. Справочник по лабораторным методам исследования /наук. ред. Данилова Л. А. – СПб: Питер, 2003. – 736с
13. Пат. 2296992 Российская Федерация, МПК⁷ C1 G 01 N 33/48, G 33/52N. Способ определения состояния мембран эритроцитов / Кузнецова Э. Ф.; заявитель и патентообладатель ГУ Научный центр реконструкт. и восстанов. хирургии Сибирского отделения Рос. академии мед. наук. – №2005122800/15; заявл. 18.07.05; опубл. 10.04.07. Бюл. № 10.
14. Groer M.W. Postpartum stress: current concepts and the possible protective role of breastfeeding / M.W. Groer, M. Davis, J. Hemphill // J. Obstet. Gynecol. Neonatal.Nurs. — 2002. — № 31 (4). — P. 411-417.
15. Ботсов Ю. А. Резистентность эритроцитарных мембран: тесты, оценка (обзор литературы)/ Ю. А.Ботсов, В.Н. Спиридонов, Е. Д. Суглобова // Клин. лаб.диагностика.-2007.- №12.- С.36-40.
16. Шакиров Д. Ф. Исследование кислотной и осмотической резистентности эритроцитов у рабочих нефтехимического производства /Д. Ф. Шакиров, В. М Самсонов // Клин. лаб. диагн.-2003.-№7.- С.21-23.
17. Roy R. Regulation of membrane lipid bilayer structure during seasonal variation a study of the brain membranes of *Clarias batrahus*/ R. Roy, A.B.Das, D Ghosh // Biochem. Biophys. Acta.,1997-V.37.-1.-P.65-74.
18. Бобова Л. П. Гистофизиология крови и органов кроветворения и иммуногенеза/ Л. П. Бобова, С. Л. Кузнецов, В. П. Сапрыкин -М:ООО «Изд. Новая Волна».- 2003.-157с.
19. Дослідження антиоксидантної активності тіопохідних хіноліну [В.П. Громова, Л.О. Омельянчик, О.А. Бражко та ін.] // Укр. біохім. журн.-2005.-Т. 77, №3.-С. 87-95.