Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2002

И. И. Семина, Е. В. Шиловская, Р. И. Тарасова, А. З. Байчурина, В. А. Павлов, Н. А. Тихонова, И. Х. Валеева, Р. С. Гараев

МЕХАНИЗМЫ ПСИХОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ГИДРАЗИДОВ ФОСФОРИЛИРОВАННЫХ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Казанский государственный медицинский университет;
Казанский государственный технологический университет

Проблема изыскания новых ноотропных средств и изучения их механизма действия является одним из важнейших направлений современной психофармакологии. Особую актуальность эта проблема приобретает в связи с трудностью лечения деменций и интеллектуально-мнестических расстройств, в том числе, и нейродегенеративного происхождения. Поскольку при деменциях ухудшаются функции практически всех нейротрансмиттерных систем, нарушается структура клеточных мембран и разрывается связь рецепторов с вторичными посредниками [1, 2], наибольшей эффективностью могут обладать средства, механизм действия которых направлен на коррекцию патологических изменений в разных звеньях патогенеза. Поиск таких средств весьма перспективен среди неантихолинэстеразных фосфорорганических соединений, которые в последние годы стали объектом пристального внимания как потенциальные средства, улучшающие функции мозга [3 – 5].

Ранее нами было показано, что гидразиды хлорэтоксиарилфосфорилуксусной кислоты обладают ноотропными и антидепрессивными свойствами [6, 7].

Настоящая работа посвящена изучению механизмов действия гидразидов фосфорилированных карбоновых кислот как потенциальных средств, улучшающих функции мозга при деменциях и других когнитивно-мнестических нарушениях.

Структурные формулы соединений и их $ЛД_{50}$ приведены в табл. 1.

Материалы и методы

Изучение связывания с глициновыми стрихниннечувствительными рецепторами осуществляли радиолигандным методом на мембранных препаратах коры головного мозга крыс (Sprague-Dawley) [8]. Животных декапитировали, навеску мозга гомогенизировали в трис-HCL буфере (pH 7,7) при +4°C. Гомогенаты дважды центрифугировали, осадок регомогенизировали и конечную пробу ресуспендировали в буфере. В качестве лиганда использовали ^{3}H-5,7-хлоркинуреновую кислоту. К 0,4 мл мембранных фракций добавляли по 0,9 нМ лиганда и исследуемые соединения в концентрациях $10^{-4} – 10^{-6}$ М, неспецифическое связывание определяли добавлением к мембранной фракции немеченого D-серина до конечной концентрации 10 мкМ. Смесь инкубировали 20 мин при температуре 23°C, фильтровали через стекловолокнистые фильтры CF/B (Whatman, США) и определяли радиоактивность на счетчике LS 6500 (Beckman, Германия). Кривые ингибирования анализировали с помощью компьютерной программы EBDA (McPherson, Elsevier Biosoft, Cambridge, U. K.) с определением IC_{50} и K_i.

О степени перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ткани коры головного мозга крыс судили по реакции образования диеновых конъюгатов [9] и по накоплению малонового диальдегида (МДА) в реакции с тиобарбитуровой кислотой [10]. Соединения исследовали в концентрациях $10^{-4} – 10^{-7}$ М.

Мембраностабилизирующее действие соединений ($10^{-4} – 10^{-7}$ М) изучали *in vitro* на модели осмотического гемолиза эритроцитов, вызванного гипотоничностью среды [11].

Влияние соединений на активность МАО Б по субстрату бензиламин в коре головного мозга мышей изучали в экспериментах *in vitro* ($10^{-3} – 10^{-4}$ М) и *in vivo* (1/100 от $ЛД_{50}$ внутрибрюшинно (в/б) в течение 7 дней) [12].

О воздействии соединений на серотонинергические структуры судили по числу “кивков” головой у мышей, вызванных предшественником серотонина 5-окситриптофаном (300 мг/кг, в/б). Препараты вводили в/б в течение 7 дней в дозах, составляющих 1/100 от $ЛД_{50}$.

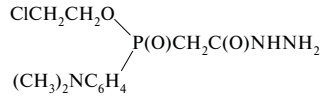
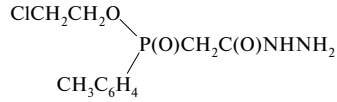
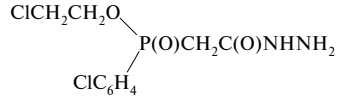
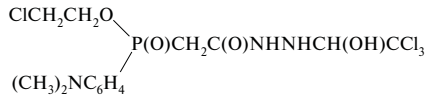
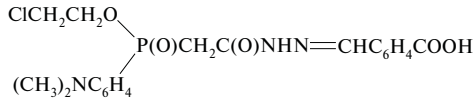
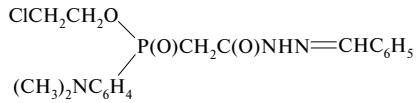
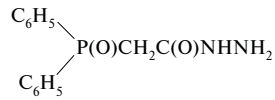
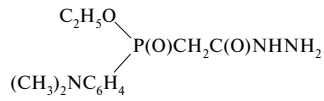
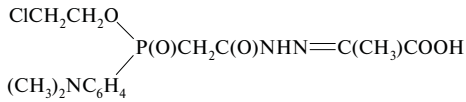
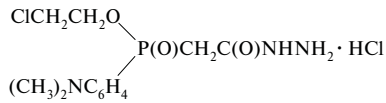
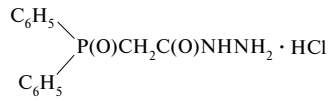
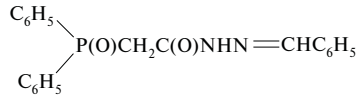
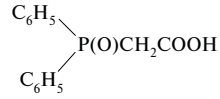
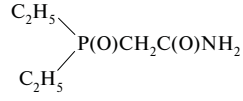
Результаты и их обсуждение

Установлено, что все исследованные гидразиды хлорэтоксиарилфосфорилуксусной кислоты (I – VII) в той или иной степени проявляют аффинность к глициновым стрихниннечувствительным участкам NMDA-рецептора (табл. 2).

Большинство исследованных соединений обладает антиоксидантными свойствами, уменьшая концентрацию МДА (табл. 3), но не влияя на начальный этап ПОЛ — диеновую конъюгацию. Наиболее активны незамещенные гидразиды и гидразоны (VI, VII, XIII,

Таблица 1

Химические формулы фосфорилацетогидразидов и их $ЛД_{50}$ для мышей при внутрибрюшинном введении

Соединение	Химическая формула	$ЛД_{50}$ (мг/кг)
I		960 ± 35
II		910 ± 76
III		900 ± 79
IV		3120 ± 160
V		2980 ± 134
VI		5110 ± 190
VII		4960 ± 210
VIII		315 ± 24,8
IX		1040 ± 64
X		5250 ± 286
XI		945 ± 24
XII		300 ± 28
XIII		5200 ± 310
XIV		2650 ± 215
XV		5400 ± 235
XVI		5190 ± 325

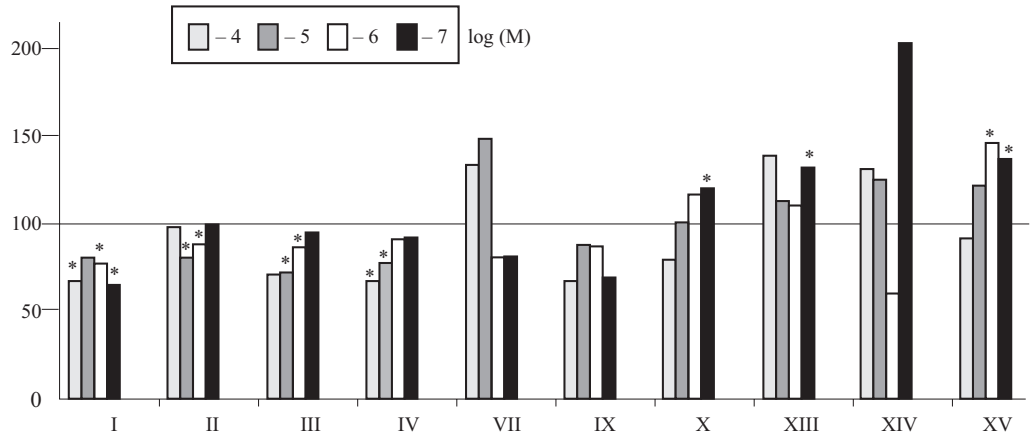


Рис. 1. Влияние гидразидов фосфорилированных карбоновых кислот на осмотический гемолиз эритроцитов.
По оси абсцисс — концентрации исследуемых соединений; по оси ординат — интенсивность гемолиза в % к контролю, * — разница достоверна при $p < 0,05$.

XV), а также хлористоводородная соль соединения I (XI).

Мембраностабилизирующее действие (снижение интенсивности гемолиза эритроцитов) проявляют только гидразиды хлорэтоксиарилфосфорилуксусной кислоты (I – IV) (рис. 1).

Большинство исследованных гидразидов фосфорилированных карбоновых кислот в той или иной степени ингибируют МАО Б (табл. 4), при этом не прослеживается прямой корреляции между эффективностью соединений по этому показателю *in vitro* и *in vivo*.

Большинство исследованных веществ усиливают эффекты предшественника серотонина 5-ОТФ (рис. 2).

Изучение зависимости структура – активность позволило выявить функционально-активные группы, имеющие важное значение в реализации эффектов соединений.

Так, на проявление аффинности к глициновым участкам влияют как замещение в гидразидной группе, так и структура фосфорильного фрагмента. Замещение в фенильном радикале фосфорильного фрагмента изменяет аффинность к глициновым участкам, например, замена диметиламиногруппы в молекуле КАПАХ на атом хлора (III) улучшает связывание, что, вероятно, обусловлено более высокой липофильностью соединения. Меньшее влияние на аффинность оказывают изменения в структуре гидразидного фрагмента: активность замещенных гидразидов (IV и V) несколько ниже, чем у гидразонов (VI и VII) и незамещенных гидразидов (I, II, III).

Для проявления антиоксидантных свойств соединений необходимо присутствие гидразидной группы, так как замещенные гидразиды (IV) менее активны, чем незамещенные и гидразоны. Окружение в фосфорильном фрагменте также имеет значение для антиоксидантной активности: наличие фенильных радикалов при атоме фосфора дифенилфосфорилацетогидразида (VIII) ее ослабляет по сравнению с диэтилфосфорилацетогидразидом (XV).

Замена хлорэтоксильного радикала хлорэтоксиарилфосфорилацетогидразидов на этильный (IX) или фенильный (VIII) приводит к снижению мембраностабилизирующей активности. Кроме того, для проявления этого свойства необходимо и наличие незамещенной гидразидной группы.

МАО-ингибирующая активность соединений также зависит как от присутствия гидразидной группы, так и от окружения в фосфорильном фрагменте. Замещенные гидразиды менее активны, чем незамещенные и

Таблица 2

Влияние некоторых гидразидов фосфорилированных карбоновых кислот на связывание ^{3}H-5,7-дихлоркинуреновой кислоты

Соединение	K_i(M)	IC_{50} (M)
I	$8,8 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$
II	$8,8 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$
III	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^{-4}$
IV	$> 1,0 \times 10^{-5}$	$> 1,0 \times 10^{-4}$
V	$> 1,0 \times 10^{-5}$	$> 1,0 \times 10^{-4}$
VI	$8,8 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$
VII	$8,8 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-4}$

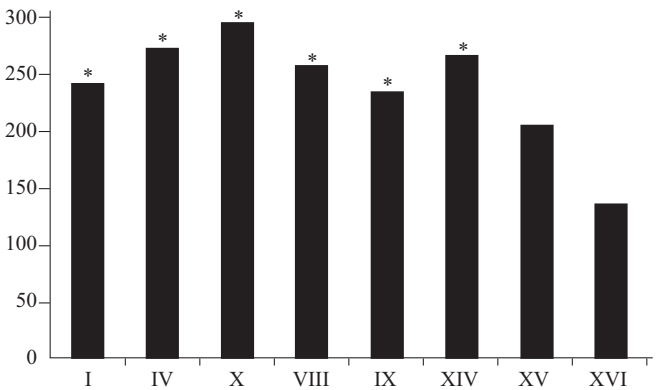


Рис. 2. Влияние гидразидов фосфорилированных карбоновых кислот на эффект "встряхивания головой" у мышей, вызванный 5-окситриптофаном По оси абсцисс — исследуемые соединения в дозах 1/100 от $ЛД_{50}$; по оси ординат — число встряхиваний головой в % к контролю.

Таблица 3

Влияние гидразидов фосфорилированных карбоновых кислот на содержание малонового диальдегида в гомогенате коры головного мозга крыс *in vitro*

Группы соединений	Концентрации соединений (М)	Содержание МДА $M \pm m$ (мкМ/кг)	Группы соединений	Концентрации соединений (М)	Содержание МДА $M \pm m$ (мкМ/кг)
Контроль I		71,4 ± 1,8	Контроль X		97,8 ± 1,0
	10^{-4}	64,5 ± 1,3*		10^{-4}	118,7 ± 3,1*
	10^{-5}	71,4 ± 0,5		10^{-5}	107,0 ± 1,1*
	10^{-6}	74,7 ± 0,8		10^{-6}	95,6 ± 1,6
	10^{-7}	65,2 ± 0,7*		10^{-7}	92,6 ± 1,2*
Контроль II		75,1 ± 1,5	Контроль XI	10^{-4}	43,5 ± 0,3
	10^{-4}	54,2 ± 7,2*		10^{-5}	15,6 ± 0,9*
	10^{-5}	67,6 ± 1,9*			1,9 ± 0,2*
	10^{-6}	73,3 ± 2,8		10^{-6}	24,8 ± 0,3*
	10^{-7}	69,6 ± 0,4*		10^{-7}	24,9 ± 0,2*
Контроль IV		88,3 ± 3,9	Контроль XII		138,1 ± 0,3
	10^{-4}	78,9 ± 1,5		10^{-4}	73,1 ± 0,96*
	10^{-5}	79,2 ± 1,5		10^{-5}	132,5 ± 14,2
	10^{-6}	81,8 ± 10,0		10^{-6}	137,0 ± 3,0
	10^{-7}	79,9 ± 0		10^{-7}	130,2 ± 0,8*
Контроль VI		98,4 ± 1,2	Контроль XIII		101,7 ± 0,6
	10^{-4}	64,3 ± 1,1*		10^{-4}	42,9 ± 0,3*
	10^{-5}	79,7 ± 2,1*		10^{-5}	91,2 ± 1,8*
	10^{-6}	94,6 ± 1,0		10^{-6}	84,7 ± 0,5*
	10^{-7}	76,1 ± 1,3*		10^{-7}	92,6 ± 0,8*
Контроль VII		99,1 ± 0,7	Контроль XIV		84,3 ± 1,7
	10^{-4}	68,3 ± 0,9*		10^{-4}	99,0 ± 0,4*
	10^{-5}	90,5 ± 1,9*		10^{-5}	93,8 ± 2,3*
	10^{-6}	99,2 ± 0,4		10^{-6}	94,4 ± 0,5*
	10^{-7}	93,3 ± 0,4*		10^{-7}	91,6 ± 2,2*
Контроль VIII		71,9 ± 0,5	Контроль XV		90,4 ± 0,6
	10^{-4}	68,3 ± 1,5		10^{-4}	41,6 ± 1,0*
	10^{-5}	66,3 ± 0,2*		10^{-5}	84,9 ± 1,6*
	10^{-6}	74,6 ± 3,3		10^{-6}	85,6 ± 0,2*
	10^{-7}	75,8 ± 0,8		10^{-7}	79,3 ± 0,98*
Контроль IX		82,7 ± 4,5	Контроль XVI		97,8 ± 2,8
	10^{-4}	71,6 ± 3,2		10^{-4}	84,8 ± 0,9*
	10^{-5}	82,5 ± 1,9		10^{-5}	89,1 ± 0,8*
	10^{-6}	97,7 ± 5,5		10^{-6}	91,1 ± 0,8
	10^{-7}	82,5 ± 0,2		10^{-7}	85,9 ± 0,4*

* Разница достоверна по отношению к контролю при $p < 0,05$; $n = 5$ во всех тестах.

Таблица 4

Антимоноаминоксидазная активность гидразидов фосфорилированных карбоновых кислот в гомогенате головного мозга крыс (*in vitro*) и мышей (*in vivo*)

Соединение	Торможение активности МАО (%)		
	in vitro (10^{-4} М) M ± m	*in vivo*	
		доза (мг/кг)	M ± m
Контроль	0		0
I	14,0 ± 2,0*	10	32,1 ± 4,6*
IV	0	30	5,0 ± 1,2*
VIII	30,4 ± 2,1*	3	17,7 ± 4,0*
IX	0	10	10,0 ± 0,3*
X	32,2 ± 0,3*	50	9,0 ± 3,5*
XI	19,8 ± 0,2*	10	4,1 ± 0,6
XIV	9,0 ± 4,9	25	4,4 ± 0,4
XV	0	50	12,6 ± 2,4*
XVI	45,7 ± 1,7*#	50	14,6 ± 3,0*#

Примечание: 100 % контроль активности МАО в опытах *in vitro* составляет 192,4 мкМ/кг/ч ($n = 5$); *in vivo* — 314,2 мкМ/кг/ч. # — повышение активности МАО; * — разница достоверна по отношению к контролю при $p < 0,05$.

гидразоны, а замена гидразидной группы на амидную (XVI) приводит к стимуляции активности фермента. Замещение хлорэтоксильной группы в фосфорильном фрагменте молекулы КАПАХ фенильным (VIII) или этоксильным (IX) радикалом ослабляет ингибирование МАО Б *in vivo*.

Меньшая эффективность соединений, не содержащих гидразидного фрагмента (XVI) или фенильного радикала (XV) в потенцировании эффектов 5-ОТФ, еще раз подтверждает целесообразность сочетания этих структурных фрагментов в одной молекуле.

ЛИТЕРАТУРА

1. B. Winblad, *Fourth International Symposium on Advances in Alzheimer Therapy*, Nice (1996), Abstr. 31.
2. G. W. Rebok and M. W. Folstein, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci*, **5**, 265 – 276 (1993).
3. P. L. Ornstein, B. M. Arnold, N. K. Allen, *Phosphorus*, *Sulfur et Silicon*, **109** – **110**, 309 – 312 (1996).
4. B. V. Potter, A. M. Rilev, S. J. Mills, et al., *Phosphorus*, *Sulfur et Silicon*, **109 – 110**, 329 – 332 (1996).
5. В. И. Данилов, *Казанский мед. ж.*, **80**, 94 – 96 (1999).
6. Патент Австралии № 682020, *РЖ Химия*, 11 О 113П (1998).
7. R. I. Tarasova, I. I. Semina, O. V. Voskresenskaya, et al., *Phosphorus*, *Sulfur et Silicon*, **109 – 110**, 373 – 376 (1996).
8. B. M. Baron, B. W. Siegel, A. L. Slone, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, **206**, 149 (1991).
9. Л. А. Романова, И. Д. Стальная, *Современные методы в биохимии*, Медицина, Москва (1977), сс. 64 – 66.
10. И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили, *Современные методы в биохимии*, Медицина, Москва (1977), сс. 66 – 68.
11. A. D. Inglot and E. Wolna, *Biochem. Pharmacol*, **17**, 269 – 279 (1968).
12. И. А. Балаклеевский, *Лаб. дело*, **3**, 84 (1976).

Поступила 20.10.98