

Член-кореспондент НАН України **В. Ф. Сагач, Т. В. Шиманська, Ф. В. Добровольський, Ю. Л. Зборовський, В. В. Орисик, Р. І. Васькевич, В. І. Станінець**

Захисний вплив похідних ангулярних тiazолохіназолінонів і тiazолотієнопіримідинонів при реперфузійних порушеннях функціонального стану серця

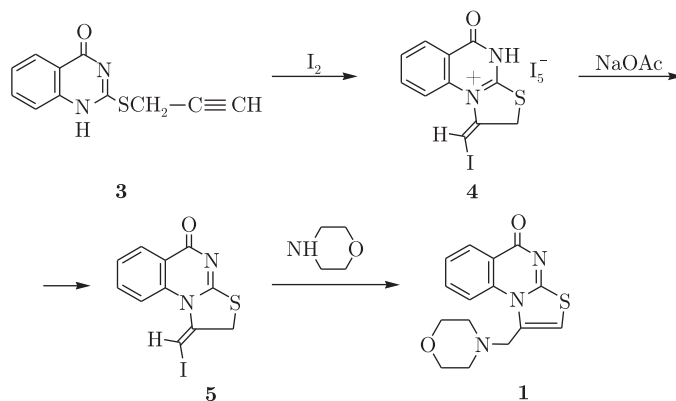
В експериментах на ізольованих серцях морських свинок, які перфузували за методом Лангендорфа, показано здатність функціонально заміщених похідних тiazолохіназолінонів та тiazолотієнопіримідинонів ($C_{15}H_{15}N_3O_2S$ і $C_{12}H_9KN_2O_3S_2$) збільшувати ефективність кисневого обміну серця та виявляти властивості інгібіторів утворення мітохондріальних пор, що обумовлює їх захисний вплив на функцію серця в умовах ішемії-реперфузії.

Відомо, що утворення високотоксичних активних форм кисню в умовах ішемії та реперфузії відіграє істотну роль при ушкодженні серцевого м'яза [1, 2]. Ішемічний стрес відбувається при гострих гемодинамічних порушеннях, а також під час кардіохірургічних втручань і трансплантації органів. Повернення ділянки тканини, що перебувала в анаеробних умовах при ішемії, до аеробних умов існування внаслідок відновлення кровопостачання супроводжується явищем, відомим як "вільнорадикальний вибух". Останнім часом не залишається ніяких сумнівів стосовно того, що найбільша, часто фатальна, кількість структурних порушень у тканинах відбувається саме під час реоксигенації та пов'язана з ефектом взаємодії O_2 з пулом відновлених електронних носіїв [3]. Раптове надходження кисню до клітин, що попередньо перебували в умовах його нестачі, викликає комплекс змін у дихальному ланцюгу мітохондрій, серед яких центральним є утворення пор у внутрішній мембрані мітохондрій. Відкриття пор призводить до зниження протонного градієнта на мембрані. При спробі компенсувати зниження градієнта та зменшення продукції АТФ підвищується інтенсивність тканинного дихання. Проте внаслідок роз'єднання окисного фосфорилування збільшене споживання кисню за цих умов спричиняє надмірне утворення вільнорадикальних сполук. Наявність неспареного електрона обумовлює дуже високу реакційну здатність цих частинок. Останні справляють свою ушкоджуючу дію через вплив на структури клітини та процеси трансляції генетичної інформації [4].

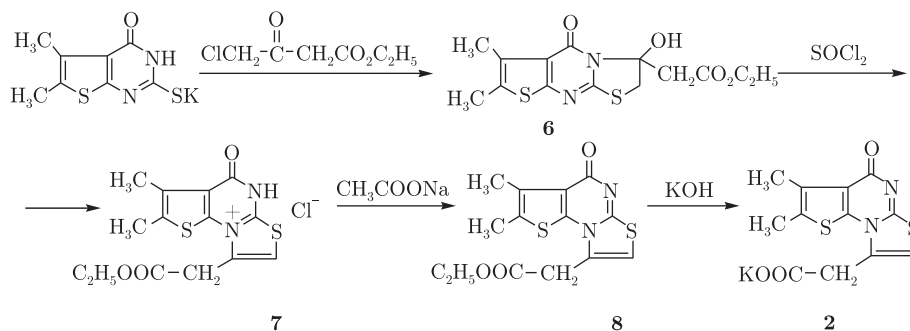
Вважають, що в нормі вільнорадикальні сполуки, які з'являються в процесі біохімічних перетворень, відіграють регуляторну роль, виконуючи сигнальну функцію та впливаючи на активність ферментів, стан скорочувального апарату клітини та ін. [5, 6]. В умовах надзвичайних впливів утворення вільних радикалів набуває неконтрольованого характеру. Як наслідок пошкоджуються життєво важливі клітинні структури, що є одним з головних чинників у розвитку багатьох захворювань та старіння організму [7–9]. Добре відома роль вільних радикалів у розвитку станів, які пов'язані з виникненням дисфункції ендотелію, — атеросклерозу, ішемічної хвороби серця, гіпертонічної хвороби та ряду симптоматичних

гіпертензій [10]. Саме тому синтез нових сполук, що мають антиоксидантну активність, є дуже актуальним завданням.

В Інституті органічної хімії НАН України були синтезовані як потенційні антиоксиданти функціонально заміщені похідні хіназолінону і тієнопіримідинону. За результатами попереднього тестування для проведення медико-біологічних досліджень були вибрані дві сполуки: 1-(4-морфолінілметил)-5*H*-тіазоло[3,2-*a*]хіназолін-5-он (**1**)



та калієва сіль 2,3-диметил-8-карбоксиметил-4*H*-[1, 3]тіазоло[3,2-*a*]тієно[3,2-*e*]піримідин-4-ону (**2**)



Склад і будова синтезованих сполук підтверджені елементним аналізом, а також методами ЯМР ^1H і ІЧ спектроскопії.

Мета дослідження полягала у виявленні серед синтезованих речовин сполук із захисним ефектом щодо розвитку реперфузійних порушень функції серця.

Методика. Експерименти проводили на ізольованих серцях морських свинок масою 300–350 г. Перфузію коронарних судин здійснювали ретроградно (методом Лангендорфа) в умовах постійного тиску (75–80 мм рт. ст.) при 37 °С розчином Кребса–Хензелейта такого складу, ммоль/л: NaCl – 118; KCl – 4,7; MgSO₄ – 1,2; NaHCO₃ – 24; KH₂PO₄ – 1,2; глюкоза – 10; CaCl₂ – 2,5. Перфузійний розчин безперервно аерували карбогеном (95% O₂ і 5% CO₂). Тиск у порожнині лівого шлуночка ($P_{\text{лш}}$) та його першу похідну dP/dt_{max} і dP/dt_{min} , кінцевий діастолічний тиск вимірювали за допомогою латексного балончика тензодатчиками 746 (“Мингограф-82”, “Елема”, Швеція) і реєстрували за допомогою програмного забезпечення Global lab. Розраховували частоту серцевих скорочень (ЧСС), індекс скоротливості міокарда, інтенсивність скорочувальної функції (ІСФ = $P_{\text{лш}} \cdot \text{ЧСС}$). Величину коронарного потоку оцінювали за об’ємом перфузійного розчину, який відтікав від серця протягом 1 хв.

Напругу кисню реєстрували у вихідному стані та через кожні 10 хв експерименту на газоаналізаторі BMS 3 Mk 2 у пробах розчину, що притікав до серця і відтікав від нього. Розраховували об'єм споживання кисню та кисневу вартість роботи серця за співвідношенням споживання кисню до інтенсивності скорочувальної функції.

Ступінь відкриття мітохондріальних пор оцінювали за оптичною густиною проб в діапазоні довжин хвиль 230–260 нм за допомогою спектрофотометра СФ-46 за появою в розчині, який відтікав від серця до ішемії та на 1-й хвилині реперфузії, мітохондріального фактора. Як зазначалось нами раніше, мітохондріальний фактор зумовлює характерний пік поглинання при довжині хвилі 250 нм та може бути маркером утворення мітохондріальних пор в умовах *in situ* та *in vivo* [11]. З метою стимуляції утворення мітохондріальних пор та виявлення захисних можливостей досліджуваних сполук використовували модель ішемії-реперфузії [3]: ішемію моделювали шляхом повної зупинки перфузії серця на 20 хв, реперфузійні зміни спостерігали впродовж 40 хв у контрольних експериментах та після попередньої 10-хвилинної перфузії досліджуваних сполук у дозі 10^{-5} М.

Статистичну обробку даних проводили методом різниць за допомогою критерію Стюдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Скринінг ряду синтезованих сполук показав, що найбільшу фізіологічну активність виявили речовини $C_{15}H_{15}N_3O_2S$ з молекулярною масою 301,37 (далі по тексті — сполука **1**) та $C_{12}H_9KN_2O_3S_2$ з молекулярною масою 332,44 (далі — сполука **2**). Саме ці сполуки використовували при подальших дослідженнях.

Додавання до перфузійного розчину сполуки **1** істотно не позначалося на показниках кардіодинаміки: відмічено невелике зменшення частоти серцевих скорочень та коронарного потоку на тлі покращення процесів розслаблення міокарда. При цьому киснева вартість роботи серця (показник, що відображає функціональний стан дихального ланцюга мітохондрій — одного з основних джерел вільних радикалів) мала тенденцію до зниження. Це свідчить про збільшення ефективності кисневого обміну міокарда у відповідь на введення сполуки **1**. Подібна картина спостерігалася і при перфузії сполуки **2**. Необхідно відзначити, що у цьому випадку були відсутні зміни частоти серцевих скорочень, а зниження кисневої вартості роботи серця було більш істотним — $(10,9 \pm 3,0)\%$.

На сьогодні існують нові підходи в розкритті механізмів реперфузійних порушень функції серця [12]. Відомо, що при відновленні потоку перфузії розчину після ішемічного впливу в кардіоміоцитах розвивається оксидативний стрес, який супроводжується утворенням пор у мембрані мітохондрій. Крізь пори в цитозоль клітини вивільняється ряд сполук, які запускають каскад молекулярних перетворень, що призводять до апоптозу або некрозу клітини. Відповідно до сучасних уявлень, реперфузійні порушення функції серця є наслідком активації мітохондріальних пор [13]. Тому цілком логічно припустити, що потужні антиоксиданти будуть блокувати утворення мітохондріальних пор — безпосередньо, як мелатонін [14, 15], або опосередковано за рахунок уловлювання вільних радикалів та зниження ступеня оксидативного ураження.

Згідно з результатами наших досліджень, попередня перфузія сполуки **1** справляла протективний вплив на розвиток постішемічних порушень діяльності серця. На відміну від контрольних експериментів серцева аритмія після реоксигенації була практично відсутня, а ступінь відновлення показників скорочувальної активності міокарда (рис. 1) та кисневої вартості роботи серця (рис. 2) через 40 хв реперфузії був істотно вищим, ніж у контрольній серії. При цьому концентрація мітохондріального фактора, яка була для нас показником ступеня утворення мітохондріальних пор, знижувалася (рис. 3). На підставі цього ми зроби-

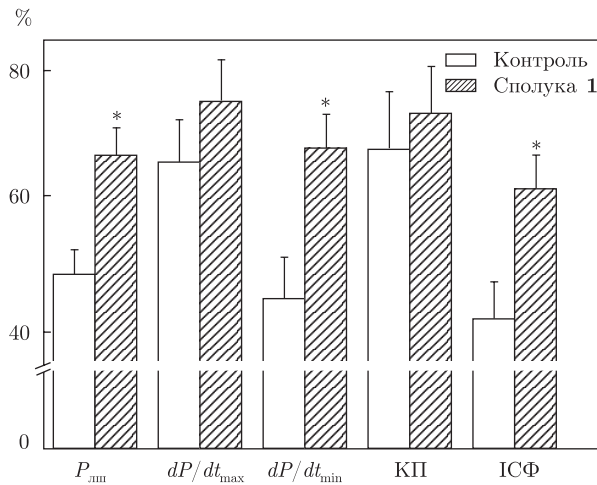


Рис. 1. Ступінь відновлення показників кардіодинаміки на 40-й хвилині реперфузії у контрольній серії та після введення сполуки 1.

* — $P < 0,05$

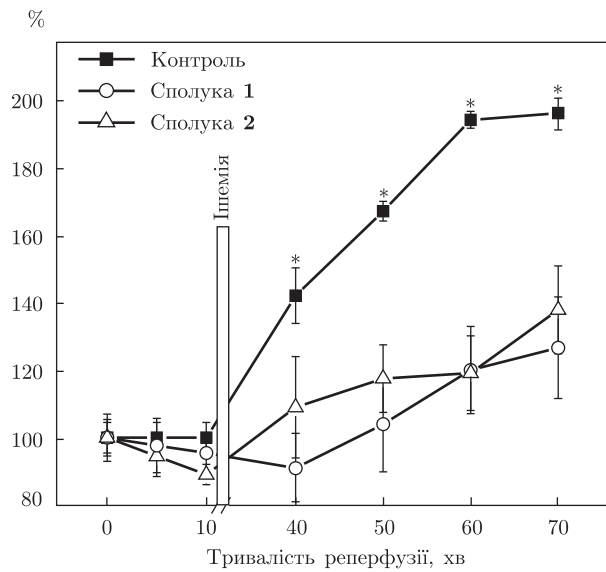


Рис. 2. Вплив сполук 1 та 2 на зміни кисневої вартості роботи серця при ішемії-реперфузії.

* — $P < 0,05$

ли висновок, що захисна дія сполуки 1 на міокард при реперфузії здійснювалася внаслідок пригнічення процесу відкривання мітохондріальних пор.

Попереднє введення сполуки 2 також, як і у першому випадку, зменшувало ступінь реперфузійних порушень функції серця після 20-хвилинної ішемії (рис. 4). Показники кардіодинаміки та скорочувальної активності міокарда на 40-й хвилині реперфузії перевищували в процентному відношенні такі в контрольній серії — тиск у лівому шлуночку знижувався на 36%, а в контрольній серії — на 52%, dP/dt_{\max} та dP/dt_{\min} становили відповідно $(76,1 \pm 7,8)$ і $(69,4 \pm 9,0)\%$ відносно рівня до ішемії, а в контрольній серії — $(67,5 \pm 7,2)$ та $(45 \pm 6,5)\%$. При застосуванні сполуки 2 істотно збільшувалася ефективність кисневого обміну міокарда — киснева вартість роботи серця зростала в 1,5 раза до кінця періоду

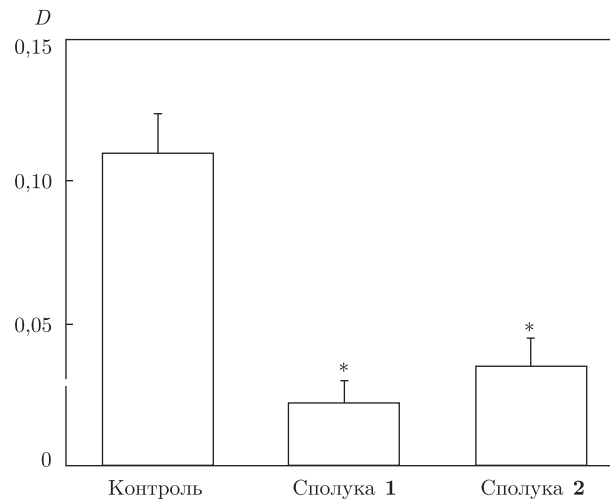


Рис. 3. Вплив сполук **1** та **2** на вивільнення мітохондріального фактора в розчині, що відтікав від серця, на 1-й хвилині реперфузії.

* — $P < 0,05$

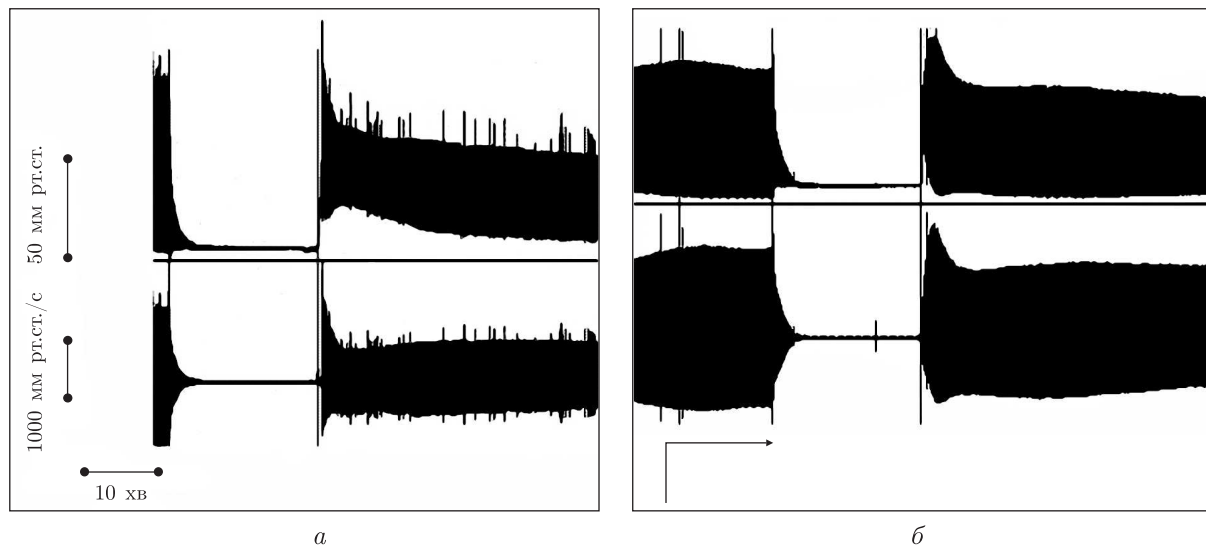


Рис. 4. Криві зміни тиску та скорочувальної активності міокарда при ішемії-реперфузії в контрольних умовах (а) та після введення сполуки **2** (б).

Стрілкою показана тривалість перфузії сполуки

реперфузії, а без введення $C_{12}H_9KN_2O_3S_2$ — на $(82,1 \pm 9,0)\%$, $P < 0,001$ (див. рис. 2). Вивільнення мітохондріального фактора становило одну третину від того, що спостерігали в контрольних експериментах (див. рис. 2). Останнє свідчить про те, що пошкодження мітохондріальних мембран за дії сполуки **2** було значно меншим, ніж у контрольних умовах.

Таким чином, органічні сполуки **1** ($C_{15}H_{15}N_3O_2S$) і **2** ($C_{12}H_9KN_2O_3S_2$), які проходили тестування, справляли протективний вплив на функціональний стан серця в умовах ішемії-реперфузії. Встановлено їх здатність підвищувати ефективність кисневого обміну серця внаслідок зниження кисневої вартості його роботи. Зменшення ступеня порушень

функції міокарда, що ми спостерігали при реоксигенації, відбувалося за рахунок пригнічення утворення мітохондріальних пор. Це підтверджувалося і невеликою кількістю мітохондріального фактора у перфузійному розчині, який відтікав від серця. Тобто здатність досліджуваних сполук уловлювати вільні радикали сприяє зменшенню пошкоджень клітин при реперфузії. Отже, сполуки **1** та **2** — похідні ангулярних тіазолохіназолінонів і тіазологієноспіримідинонів — виявляли властивості інгібіторів утворення мітохондріальних пор. Подальше вивчення цих сполук становить інтерес у зв'язку з їх захисною дією на міокард та його адаптацію до ішемічного стресу.

1. *Zorov D. B., Filburn C. R., Klotz L.-O. et al.* Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes // *J. Exp. Med.* – 2000. – **192**, No 7. – P. 1001–1014.
2. *Kowaltowski A., Castilho R. F., Vercesi A. E.* Mitochondrial permeability transition and oxidative stress // *FEBS Lett.* – 2001. – **495**. – P. 12–15.
3. *Crompton M.* The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death // *Biochem. J.* – 1999. – **341**, pt. 2. – P. 233–249.
4. *Zhu H., Bunn H. F.* Oxygen sensing and signaling: impact on the regulation of physiologically important genes // *Respirat. Physiol.* – 1999. – **115**. – P. 239–247.
5. *Wolin M. S., Burke-Wolin T. M., Mohazzab-H. K. M.* Roles of NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms // *Ibid.* – 1999. – **115**. – P. 229–238.
6. *Herrlich P., Bohmer F. D.* Redox regulation of signal transduction in mammalian cells // *Biochem. Pharmacol.* – 2000. – **59**. – P. 35–41.
7. *Baynes J. W.* Role of oxidative stress in development of complications in diabetes // *Diabetes.* – 1991. – **40**. – P. 405–412.
8. *Alexander R. W.* Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis: oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective // *Hypertension.* – 1995. – **25**. – P. 155–161.
9. *Harman D.* The aging process // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 1981. – **78**. – P. 7124–7128.
10. *Griendling K. K., Sorescu D., Lasse'Gue B., Ushio-Fukai M.* Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2000. – **20**. – P. 2175–2183.
11. *Сагач В. Ф., Максименко В. Б., Дмитрієва А. В. та ін.* Ранній маркер пошкодження міокарда при ішемії-реперфузії серця у собак і при операціях зі штучним кровообігом у людей // *Фізіол. журн.* – 2006. – **52**, № 4. – С. 3–9.
12. *Halestrap A. P.* Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – **34**, pt. 2. – P. 232–237.
13. *Crompton M., Andreeva L.* On the involment of a mitochondrial pore in reperfusion injury // *Basic Res. Cardiol.* – 1993. – **88**. – P. 513–523.
14. *Andrabi S. A., Sayeed I., Siemen D. et al.* Direct inhibition of the mitochondrial permeability transition pore: a possible mechanism responsible for antiapoptotic effects of melatonin // *FASEB.* – 2004. – **18**. – P. 869–871.
15. *Сагач В. Ф., Рудик О. В., Вавілова Г. Л. та ін.* Мелатонін відновлює ішемічну толерантність і зменшує чутливість відкривання мітохондріальної пори в серці старих щурів // *Фізіол. журн.* – 2006. – **52**, № 3. – С. 3–14.

*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця
НАН України, Київ
Інститут органічної хімії НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 29.01.2009

Corresponding Member of the NAS of Ukraine **V. F. Sagach, T. V. Shimanskaya, F. V. Dobrovolsky, Yu. L. Zborovskii, V. V. Orysyk, R. I. Vas'kevich, V. I. Staninets**

Protective effect of the derivatives of angular thiazoloquinazolinones and thiazolothienopyrimidines on heart reperfusion injury

A convenient method to prepare functionally substituted angular thiazoloquinazolinones and thiazolothienopyrimidines is developed. In the experiments on isolated hearts of guinea pigs, it has been shown that ischemia-reperfusion disturbances of heart function were decreased, and the oxygen metabolism was normalized in animals treated with these substances as compared to non-treated control. The cardioprotective effect of angular thiazoloquinazolinones and thiazolothienopyrimidines on heart reperfusion injury can be a condition for the inhibition of the mitochondrial permeability transition pore opening.