УДК 615.225:577.121.7
https://doi.org/10.31612/2616-4868.8.2023.12

ВПЛИВ СИНТЕТИЧНОГО АНАЛОГУ ТИРОНАМІНІВ НА ПРОЦЕСИ ПЕРЕКІСНОГО ОКИСЛЕННЯ ЛІПІДІВ В МОЗКУ ЩУРІВ

Ганна О. Федорова, Наталія В. Величко, Олена В. Богатирьова

Донецький національний медичний університет, кафедра загальної та біологічної хімії, м. Лиман, Україна

Резюме

Вступ. Тиронаміни належать до агоністів рецепторів слідових амінів в головному мозку *TAAR1*. Описано механізм активації процесів аутофагії і нейропластичності під дією синтетичного аналога тиронамінів – 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну. Оскільки найбільш поширеними серед неврологічних захворювань залишаються цереброваскулярні порушення, то розробка і впровадження ліків з нейропротекторними властивостями вважається перспективною стратегією для лікування і реабілітації хворих з ішемічним інсультом.
Метою дослідження було виявити вплив 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну на активність ГПО, СОД і динаміку змін рівня ТБК-АП в мозку щурів після моделювання фокальної ішемії шляхом транзиторної оклюзії лівої середньої мозкової артерії.
Матеріали та методи. Був виконаний синтез 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну. Проводилось спостереження за змінами активності антиоксидантних ферментів і накопиченням вторинних продуктів ПОЛ, що реагують з тиобарбитуровою кислотою (ТБК-АП), в гомогенатах мозку щурів після ін'єкції досліджуваної сполуки в різному дозуванні, а також через 24 години після моделюванні фокальної ішемії. Наявність неврологічного дефіциту у піддослідних щурів підтверджувалась за шкалою Гарсіа і тестуванням на витягування передньої кінцівки.
Результати. Статистична розробка отриманих результатів дозволила знайти сильний зв'язок між кількістю введеного аналога і зростанням активності ГПО в нейронах здорових тварин, а також помірний зв'язок між тією ж кількістю і збільшенням рівня ТБК-АП. У 80 % щурів оклюзія лівої середньої мозкової артерії призводила до виражених сенсомоторних порушень. Через 24 години після введення синтетичного аналогу тиронаміну в гомогенатах ураженої лівої півкулі достовірно підвищувалась активність глутатіонпероксидази, і знижувався вміст ТБК-АП, також спостерігалась тенденція до активації СОД.
Висновки. Отримані дані свідчать про позитивний вплив 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну на ферменти АОЗ в головному мозку у інтактних щурів і після моделювання фокальної ішемії, що дає підстави продовжувати дослідження сполуки з метою виявлення віддалених нейропротекторних ефектів.

Ключові слова: **агоністи TAAR1, моделювання фокальної ішемії головного мозку, нейропротектори, антиоксиданти**

ВСТУП

В 2001 році, незалежно один від одного, *Borowsky и Bunzow* було описано сімейство, спряжених з G-білками, рецепторів слідових амінів (*trace amine associated receptors, TAAR*), і найбільш важливий представник сімейства в нейронах головного мозку – *TAAR1*. До слідових амінів належать β-фенілетиламін, п-тирамін, триптамін і п-октопамін, концентрація цих сполук в тканинах в 100 разів менша, аніж біогенних амінів нейромедіаторів. Ще в 2001 році *Bunzow* довів спорідненість до *TAAR1* цілого ряду синтетичних наркотичних речовин (амфетамін, лізергінова кислота) [1], але інші дослідники зосередились на вивченні синтетичних аналогів слідових амінів.

В 2004 році *Scanlan* показав, що агоністами *TAAR1* є метаболіти тиреоїдних гормонів – тирона-

міни [2]. В свою чергу, *Chiellini* сфокусув свою увагу на синтетичних аналогах тиронамінів, в тому числі – 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліні [3]. *Bellusci* був виявлений механізм нейропротекторної дії цих сполук, якій полягає у індукування експресії фермента сіртуїн-6 (*SIRT6*) [4]. За три роки до того *Bellusci* показав, що деацетилаза *SIRT6* блокує шлях *PI3K/Akt/mTOR*, що сприяє запуску процесів аутофагії в нейронах і є ключовим для пластичності мозку [5].

Аналіз показників захворюваності населення України демонструє, що серед неврологічних захворювань найбільшу частку складають цереброваскулярні патології. Вони також є однією з основних причин зниження працездатності та інвалідності.

Своєчасна госпіталізація у інсультне відділення надає необхідні засоби для спеціалізованої допомоги у перші 6 годин після появи симптомів гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК). Як відмічають неврологи, не завжди є можливість діагностичної візуалізації зони ураження і початку адекватного лікування за таке коротке терапевтичне вікно. У випадку відтермінування необхідних терапевтичних заходів у хворих не вдається зберегти нейрони ішемічної пенумбри, що призводить до вираженого неврологічного дефіциту. Тому комплекс медичної допомоги хворого з ГПМК включає в себе не тільки невідкладну терапію, але також ранню всебічну реабілітацію. Огляд останніх досліджень в запровадженні нейропротекції в клінічну практику, зроблений *Xiong*, зібрав переконливі аргументи на користь нейропротекції, як основного напрямку в стратегії лікування інсульту [6]. В уніфіковані клінічні протоколи медичної допомоги при ГПМК поки не включені ліки з нейропротекторною дією, але зараз відбувається етап накопичення даних про їх позитивний вплив на енергетичний обмін в нейронах і процеси перекісного окислення ліпідів (ПОЛ).

Для вивчення дії експериментальних препаратів на розвиток ішемії головного мозку тварин, на думку *Li & Zhang*, найбільш оптимальною вважається модель фокальної ішемії (ФІ), яка розвивається після однобічної транзиторної оклюзії середньої мозкової артерії (СМА) у щурів, оскільки вона морфологічно і патогенетично відповідає перебігу ішемічного інсульту у людей [7].

Згідно з *Tao*, в основі нейропротекторного ефекту антиоксидантних сполук лежить здатність інгібувати вільнорадикальні сигнальні шляхи, які стимулюють вторинне нейрозапалення [8]. В роботі *Gencarelli* була показана здатність тиронамінів бути пастками для вільних радикалів in vitro [9]. Але вплив синтетичних аналогів тиронамінів на процеси ПОЛ in vitro та in vivo поки не досліджувався.

Метою нашої роботи було вивчення активності ферментів антиоксидантного захисту (АОЗ) та накопичення вторинних продуктів ПОЛ в мозку щурів після введення 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Під час підготовчого етапу був виконаний синтез 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну на базі лабораторії органічного синтезу ТОВ «Стан». В експерименті було використано розчини сполуки в суміші фізіологічного розчину і димексиду у співвідношенні 1:1, які містили кількість 50 мг/кг і 100 мг/кг маси тіла тварин.

Дорослих безпородних самців щурів (200-250 г) тримали при кімнатній температурі у стандартних умовах віварію з вільним доступом до корму та води при 12-годинному циклі світло/темрява не менше 7 днів до та під час експерименту.

Відповідність етичним вимогам. Усі процедури проводились з дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

Перед початком збору матеріалу було проведено тестування тварин за шкалою Гарсіа. Критерієм включення тварини в експеримент було відсутність неврологічного дефіциту.

Методологія експерименту полягала у моделюванні ФІ у щурів, як описано у Шаріпова, шляхом введення монофіламентного оклюдера через сонну артерію для блокування лівої СМА протягом 60 хвилин після анестезії пропофолом [10]. В якості оклюдера застосовувалась поліамідна нить 4/0 («Олімп», Україна).

Дизайн дослідження. Проспективне дослідження, на етапі збору матеріалу для спостереження за впливом 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну на процеси ПОЛ проводилось внутрішньочеревне введення розчинів сполуки 12-ти щурам, які були розділені на дві рівних групи. Група 1 (6 тварин) отримала ін'єкцію 50 мг/кг, групи 2 (6 тварин) – 100 мг/кг маси тіла. Контрольній групі 0 (6 тварин) вводився розчин, якій не містив досліджуваної сполуки. Через 24 години після введення виконувалась декапітація під ефірним наркозом з подальшим вилученням тканини мозку. Також проводилось спостереження за дією 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну при ФІ в групі з 15 щурів. Для чого відбувалось введення його розчину (100 мг/кг) тваринам одразу після видалення оклюдера. Через 24 години тварин декапітували під ефірним наркозом, після чого проводилось відокремлення лівої півкулі головного мозку від правої.

За годину до декапітації у всіх тварин повторно проводилась оцінка неврологічного дефіциту за шкалою Гарсіа.

Всі отримані тканини мозку одразу гомогенізувались відповідно до процедури подальшого дослідження. Вторинні продукти ПОЛ визначались у свіжому гомогенаті по реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК-АП). Для вивчення активності ферментів АОЗ гомогенат заморожувався при –40 °С, а перед початком визначення розморожувався, що призводило до руйнування субклітинних мембран. Активність глутатіонпероксидази (ГПО) розраховувалась в мкмоль відновленого глутатіона (GSH) по різниці в його концентрації до та через 10 хвилин після додаванні трет-бутилу в інкубаційну суміш. Дослідження сумарної активності супероксиддисмутази (СОД) визначалось в умовних одиницях ефективності інгібування автоокислення адреналіну в інкубаційній суміші після додавання гомогенату. Значення показників розраховувались відносно вмісту білка в гомогенатах, визначеному по Лоурі.

Статистика. Статистична розробка зібраних матеріалів відбувалась за допомогою програми STATISTICA 10.0. Для кількісних показників вираховувались середнє і стандартна похибка середнього (M ± m*), а також* медіана (Me) і квартильний розмах (Q25–Q75). Статистично значущими вважали відмінності при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ

Основою побудови вуглецевого каркасу молекули 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну є каталізована фосфіновими комплексами паладію реакція крос-сполучення Судзукі-Міяури між п-нітробензилбромідом та трифторборатом

4-метоксибензенборонової кислоти. Отриманий аддукт обробляли трибромідом бору, в результаті чого одержували фенольне похідне, яке потім алкілювали з використанням бромацетонітрилу. Отриману сполуку відновлювали LiAlH4/AlCl3 для утворення кінцевого продукту.

За даними *Scanlan* внутрішньочеревні ін'єкції препаратів тиронамінів в кількості від 25 мг/кг до 100 мг/кг маси тіла тварин викликали помітні фізіологічні ефекти, пов'язані з терморегуляцією і серцевим викидом [2] тому було прийняте рішення про введення розчинів 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну в кількості 50 мг/кг і 100 мг/кг маси тіла щурів.

Введення синтетичного аналогу тиронаміну призводило до зростання активності ферментів АОЗ. Було виявлено підвищення активності глутатіонпероксидази в 1,7 рази в групі 1 і в 4 рази в групі 2 у порівнянні з холостим введенням розчину.

Також, при додаванні зразку СОД гомогенату мозку щурів в інкубаційну суміш реєструвалась тенденція до збільшення ефективності інгібування аутоокислення адреналіну на 12 % в групі 1, а в групі 2 – на 33 %.

В свою чергу, після ін'єкції агоніста спостерігалась активація процесів вільнорадикального окислення про що свідчило збільшення рівня вторинних продуктів ПОЛ ТБК-АП в 1,6 рази в групі 1 і в 2,5 рази в групі 2 у порівнянні з контрольною групою 0.

Для оцінки зв'язку між введенням різної кількості досліджуваної сполуки і змінами показників ПОЛ в тканині мозку був виконаний множинний регресійний аналіз всіх отриманих даних. Найвищі значення коефіцієнту кореляції r = 0,93, і коефіцієнту детермінації r^2 = 0,86 були виявлені при оцінці змін активності ГПО (графік 1).

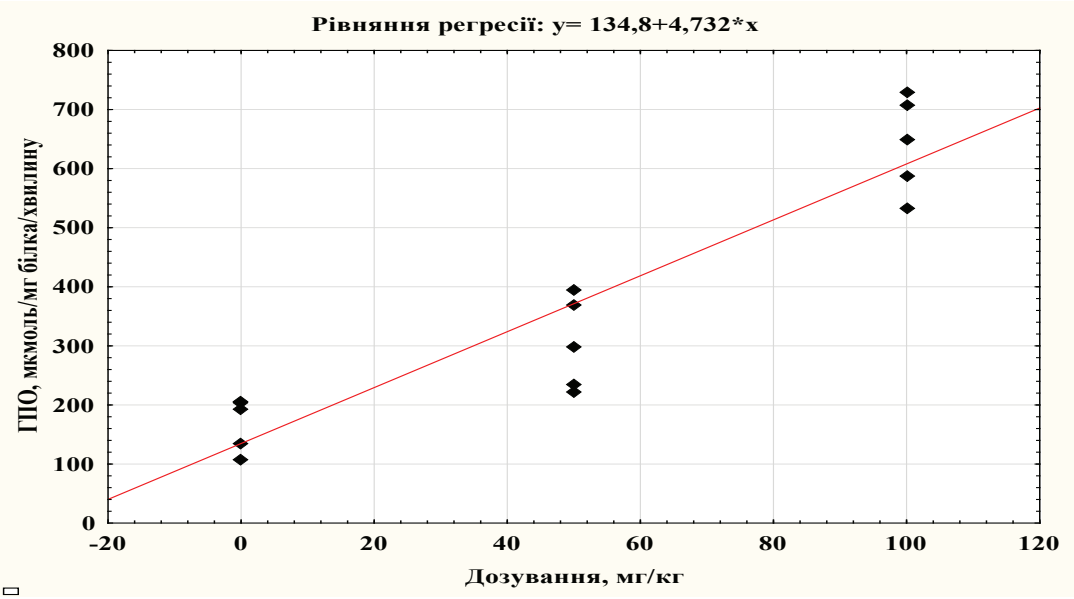

Рис. 1. Діаграма розсіяння даних активності ГПО в мозку щурів при введенні різних доз 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну

Зростання рівня ТБК-АП в гомогенатах тканини мозку також відбувалось в залежності від кількості введеного аналогу, обраховані параметри лінійної регресії складали: r = 0,85; r^2 = 0,72. Між змінами в активності СОД і дозуванням досліджуваного агоніста спостерігався слабкий зв'язок, коефіцієнт кореляції r дорівнював 0,69, а коефіцієнту детермінації r^2-0,48.

На основі отриманих даних було вирішено на наступному етапі дослідження використовувати розчин 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну 100 мг/кг маси тіла тварин.

Напрацювання методології проведення експерименту моделювання фокальної ішемії шляхом транзиторної оклюзії лівої середньої мозкової артерії у щурів відбувалось в два етапи. Спочатку був вибраний критерій включення до групи тварин з неврологічним дефіцитом, для чого через 23 години після процедури оклюзії з кожним щуром проводили тестування на витягування передньої кінцівки (*vibrissae-evoked forelimb placing*), як це рекомендовано *Encarnacion* [11]. Тварину обережно підіймали за тулуб у повітря, при тому лапи вільно висіли, далі її підносили до краю столу, таким чином щоб стіл торкнувся вібриси щура з правого боку. Процедуру повторювали 10 разів: якщо щур не міг поставити одразу після дотику лапу на край столу, то сенсомоторна функція вважалася порушеною. Таких тварин декапітували і вилучали головний мозок. Далі відбувалось відокремлення лівої півкулі від правої. Після чого в гомогенатах тканин мозку досліджувалась активність ферментів АОЗ і вміст ТБК-АП. За допомогою U-критерію Манна-Уітні було підтверджено достовірне підвищення рівня ТБК-АП в лівій півкулі у порівнянні з правою, а також тенденцію до зростання активності ГПО і СОД. Отримані дані разом з наявністю порушення сенсомоторної функції дали підстави вважати ліву півкулю головного мозку щурів ураженою фокальною ішемією, а праву – інтактною.

Попередні висновки дозволили застосовати описану методологію для вивчення впливу 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну на процеси ПОЛ у головному мозку тварин після транзиторної оклюзії лівої СМА. Після 60-ти хвилинного моделювання ФІ оклюдер видалявся, накладалися шви на рану і одразу під наркозом виконувалась внутрішньочеревна ін'єкція синтетичного аналога тиронаміну. Через 23 години після введення всіх щурів тестували на витягування передньої кінцівки. У 80 % експериментальних тварин неврологічний дефіцит був підтверджений. Так, за десятибальною шкалою у 12-ти щурів, яких тримали за тулуб біля поверхні столу, здатність поставити праву кінцівку на стіл для пошуку опори після дотику вібрисами дорівнювала 2 ± 1 бали, ліву: 9 ± 1. Три тварини продемонстрували нормальну моторику і правої і лівої лап. Далі у всіх визначених 12-ти тварин проводилось вивчення неврологічного дефіциту за шкалою Гарсіа (таблиця 1).

Таблиця 1

Показники неврологічного дефіциту за шкалою Гарсіа у щурів після оклюзії лівої СМА

Показник	Розподіл тварин відносно кількості балів, %			
	0 балів	1 бал	2 бали	3 бали
Спонтанна активність в клітці протягом 5 хвилин	-	42	58	-
Симетричні рухи чотирма кінцівками	-	50	50	-
Витягування передньої лапи	-	58	42	-
Здатність дертися на стінку клітки	-	58	42	-
Реакція на дотик до тіла	-	50	50	-
Реакція на дотик до вібриси	-	42	58	-

За шкалою Гарсіа у 5-ти тварин спостерігалось виражене зниження рухомої діяльності в клітці, 7 щурів показували здатність до невеличких рухів. Далі кожну тварину підіймали за хвіст в повітря, у 6 щурів була практично відсутня активність кінцівками, розташованими з правого боку тулуба у порівнянні з лівими кінцівками, у інших 6-ти тварин різниця була трохи менш помітна. Наступне тестування зводилось до того, що щура підносили до краю столу і змушували ходити на передніх кінцівках, тримаючи за хвіст. У 7-х тварин ходьба правою передньою кінцівкою була порушена, у 5-ти відмінності в розгинанні правої та лівої лап були менш виражені. Після чого щура саджали на стінку клітки і спостерігали за його здатністю дертися вище, потім його тягнули за хвіст, щоб відірвати від стінки. Знов у тих самих 7-х тварин виявлялась знижена здатність володіти правими кінцівками і міцно триматись ними за стінки клітки, решта 5 щурів користувались лапами з правої частини тулуба трохи більш активно. Ще одно тестування полягало в дотику до тіла тварини тупим предметом з кожного боку. 6 щурів не реагували на дотики з правого боку, друга половина реагувала трохи активніше, але також мляво. В останньому досліді тупим предметом ззаду проводили по тілу до вібриси з кожного боку. 5 щурів ніяк не реагували на дотик праворуч, 7 показували мляву реакцію. В цілому, за 18-ти бальної шкалою Гарсіа середній бал піддослідних щурів складав 9 ± 3.

Для оцінки впливу синтетичного аналогу тиронаміну на процеси ПОЛ в головному мозку щурів після моделювання ФІ дані були розділені на 4 серії:

А – інтактна (права) півкуля без введення агоністу;

B – інтактна (права) півкуля після ін'єкції 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну;
C – експериментальна (ліва) півкуля без введення агоністу;
D – експериментальна (ліва) півкуля після ін'єкції 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну;

Далі були застосовані методи непараметричної статистики для порівняння отриманих даних. Використання U критерію Манна-Уітні дозволило виявити достовірні відмінності при зростанні рівня ТБК-АП між серіями (графік 2).

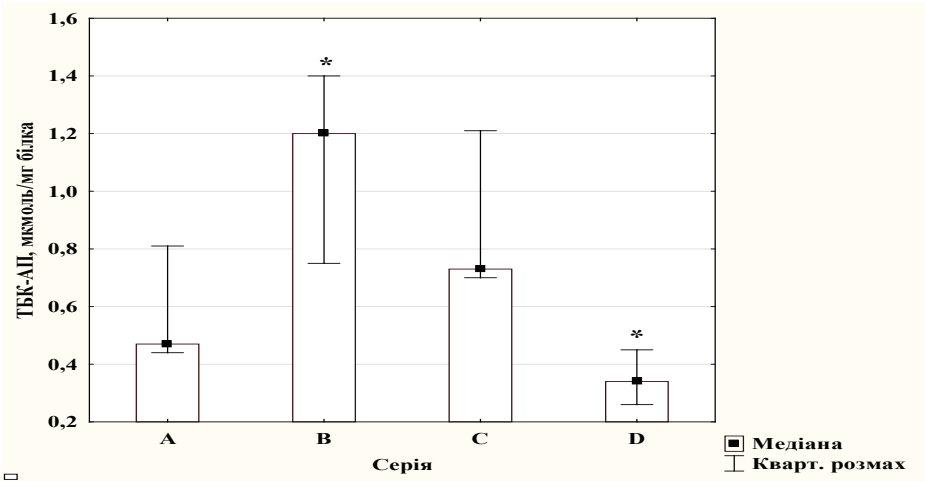

Рис. 2. Зміни рівня ТБК-АП у гомогенаті мозку щурів з ФІ без введення 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну (серії A і C) і після ін'єкції (серії B і D), * p = 0,007 у порівнянні з серією без ін'єкції

Очевидна різноспрямована динаміка змін накопичення вторинних продуктів ПОЛ. Так, при порівнянні серій A і B (інтактна півкуля) введення синтетичного аналогу тиронаміну призводило до активації вільнорадикального окислення, медіанне значення ТБК-АП майже в 2,6 рази вище, аніж в серії A. Дані по експериментальній півкулі з фокальною ішемією показують зменшення медіаного рівня ТБК-АП в серії D в 2 рази після ін'єкції 4-(4-(2-аміноетокси) бензил)аніліну.

Вплив синтетичного аналогу тиронаміну на активність ферментів АОЗ в головному мозку тварин при моделюванні ФІ був більш виражений чим у інтактних щурів. Так, Me активності СОД в серії B була в 1,3 рази вище у порівнянні з серією A, p = 0,004

В півкулях, уражених ФІ, серії C і D медіанні значення активності СОД відрізнялися всього лише на 7 %.

Порівняння медіанних значень активності ГПО також показало достовірні відмінності після введення агоніста (графік 3).

В інтактній правій півкулі серії B ін'єкція синтетичного аналогу тиронаміну призводила до зростання Me активності ГПО в 5 разів. В експериментальній лівій півкулі серії D реєструвалось збільшення величини Me глутатіонпероксидазної реакції в 1,4 рази.

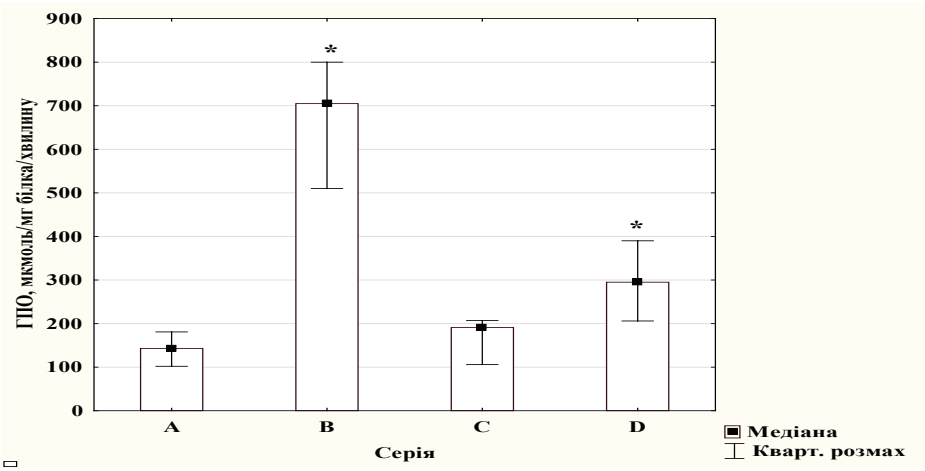

Рис. 3. Активність ГПО у гомогенаті мозку щурів з ФІ без введення 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну (серії A і C) і після ін'єкції (серії B і D), * p = 0,0006 у порівнянні з серією без ін'єкції

ОБГОВОРЕННЯ

Основну стратегію синтезу 4-(4-(2-аміноетокси) бензил)аніліну взято з роботи *Chiellini* [3]. Щоб зменшити можливість протікання побічних реакцій та отримати продукт необхідної чистоти для подальших досліджень нами було внесено деякі зміни. З досліджень, проведених *Cox*, відомо, що вільні арилборонові кислоти в умовах сполучення Судзукі-Міяури можуть протодеборуватися [12]. Тому, на відміну від цієї роботи, в якості С-нуклеофіла для С-С сполучення було взято не саму 4-метоксибензенборонову кислоту, а трифторборат калію цієї кислоти, який значно стійкіший за кислоту та дозоляє провести реакціє без побічної реакції протодеборування.

Крім того, інше дослідження показало, що в присутності кисню вільні арилборонові кислоти здатні окислюватися до фенолів. Трифторборат повільно гідролізується під час реакції, повертаючи ту саму вихідну речовину – боронову кислоту. Це дозволяє уникнути великого утворення небажаних фенольних сполук та продуктів їх окиснення.

В огляді *Lennox & Lloyd-Jones* відмічається, що ще одним небажаним напрямком протікання крос-сполучення Судзукі-Міяури є гомо-сполучення), яке відбувається за рахунок відновної активації прекаталізатору – Pd (II) [13].

За даними, представленими в роботі *Deng*, додавання до каталітичного комплексу солей міді (I) значно зменшує утворення продуктів гомо-сполучення [14]. Тому в якості каталітичної системи було використано 5мол% Pd(OAc)2,10mol% PCy3,1eqCuCl.

Всі перераховані модифікації синтезу дозволи підвищити вихід та отримати досліджуваний аналог тиронаміну 96 % чистоти.

Зростання активності ГПО і СОД в мозку щурів після ін'єкції 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну; і наявність сильного зв'язку між активацією ГПО і дозуванням агоністу, і слабкого зв'язку – між СОД і тим самим агоністом свідчить про антиоксидантні властивості 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну.

В огляді *Silvestro & Mazzon* зазначається, що антиоксидантна дія багатьох відомих препаратів пов'язана з функціонуванням транскрипційного фактору *Nrf2* [15]. Наприклад, в дослідженні *Zhang* було виявлено, що сальвіанолова кислота В, поліфенол, видобутий з трави шавлії мілкорізної, підвищує експресію деацетилази з сімейства сіртуїнів *SIRT1*, в результаті чого зростає рівень *Nrf2*, якій вмикає в ДНК послідовність елемента антиоксидантної відповіді *ARE* (*antioxidant response element*), що призводить до початку експресії всіх основних ферментів АОЗ, в тому числі ГПО і СОД [16].

Роль агоністів *TAAR1* в функціонуванні *Nrf2* поки не доведена, але в роботі *Bellusci* був виявлений вплив тиронаміну і його синтетичних аналогів на активацію іншого представника сімейства сіртуїнів – *SIRT6* [4]. В свою чергу, *Pan* при вивченні культури мезенхімальних стовбурових клітин людини з «виключенням» гену *SIRT6* було виявлено, що досліджувана деацетилаза є коактиватором *Nrf2* [17].

Дослідження *Kawahara* показало, що *SIRT6* взаємодіє з субодиницею *RELA* універсального фактору транскрипції, ядерного фактора каппа В (*NF*-к*B*) і деацетилює лізін 9 в гістоні *H3* (*H3K9*) в промоторі цільового гена *NF-кB*, і таким чином знижує передачу сигналу в *NF*-к*B* сигнальному шляху [18].

В огляді *Bellezza* висвітлюється, що між факторами транскрипції *NF*-к*B* і *Nrf2* існує конкуренція за взаємодію з коактиватором *CBP/P300* в ядрі; зв'язування будь-якого фактора транскрипції з *CBP/P300* залежить від відносної кількості транслокованого *Nrf2* і *NF*-к*B* [19]. *Nrf2* опосередковано активується протизапальними сполуками, які пригнічують активність *NF*-к*B*. Також, *Santos* виявлено, що інгібування *NF*-к*B* сигнального шляху може відбуватися після деацетилювання *SIRT1* субодиниці *p65 NF*-к*B* [20].

Відомо, що в залежності від умов, неферментативні антиоксиданти можуть проявляти прооксидантні властивості. В роботі *Gencarelli* при інкубації культури бурої жирової тканини щурів з 3-монойодтиронаміном спостерігалося зростання рівня ТБК-АП і пригнічення експресії *SIRT1* [9]. В нашому дослідженні також відбувалось достовірне зростання ТБК-АП в тканині мозку після введення синтетичного аналогу тиронамінів, обрахування параметрів лінійної регресії показало наявність зв'язку середньої сили між концентрацією вторинних продуктів ПОЛ і дозуванням 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну.

В огляді *Li & Zhang* відмічається кілька основних недоліків при моделюванні ФІ шляхом транзиторної оклюзії СМА [7]. Серед основних виділяють наявність у щурів розвинутого колатерального кровообігу в головному мозку, що суттєво впливає на розмір зони ураження. Також треба брати до уваги співвідношення діаметру оклюдера з внутрішнім діаметром СМА і глибину введення. Для контролю за даними параметрами рекомендовано проводити процедуру моделювання одночасно з електрокортикографією, лазерною доплерівською флоуметрією або магнітно-резонансною томографією. У нас не було можливості дотримуватись цих рекомендацій, тому у 20 % піддослідних щурів через добу після моделювання ФІ був відсутній неврологічний дефіцит при тестуванні на витягування передньої кінцівки. В поведінці тварин також не було зафіксовано суттєвих відмінностей,

тому було вирішено 3 щурів не включати в подальші дослідження.

Вдвічі нижчий середній бал за шкалою Гарсіа при тестуванні основної групи тварин підтверджує наявність рухомих розладів, розладів чутливості, розладів координації рухів і порушення рівноваги, загальної рухової активності.

Ішемічно-реперфузійне ураження вважається основним патогенетичним чинником ГПМК. Після відновлення кровотоку різко зростає кількість вільних радикалів, які пошкоджують ДНК, запускають механізм апоптозу і вторинного нейрозапалення. Достовірне зростання активності ГПО і тенденція до активації СОД після введення 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну в мозку тварин при моделюванні ФІ свідчить про антиоксидантні властивості досліджуваного аналога.

Варто відмітити зниження вмісту вторинних продуктів ПОЛ практично до рівня, характерного для інтактної півкулі, що також можна пояснити ефективною роботою ферментів АОЗ. Різнонаправлені зміни вмісту ТБК-АП при порівнянні інтактної і ураженої півкулі можна пояснити таким чином, що при ішемічно-реперфузійному пошкодженні після оклюзії лівої СМА надлишок вільних радикалів активують окислюють цистеїнові залишки білка *Keap1*. В свою чергу, *Keap1* виконує функцію корепрессора транскрипційного фактору *Nrf2*, після окислення цистеїнових залишків *Keap1* дисоціює, вивільнений *Nrf2* переміщається у ядро і вмикає експресію ферментів АОЗ. Найбільш вірогідним поясненням отриманих даних є те, що при моделюванні ФІ активація системи АОЗ відбувалася у двох напрямках: природним шляхом і дією 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну.

ВИСНОВКИ

1. Вперше проведене вивчення впливу синтетичного аналогу тиронамінів 4-(4-(2-аміноетокси) бензил)аніліну на процеси перекісного окислення ліпідів в головному мозку щурів.

2. Моделювання фокальної ішемії шляхом транзиторної оклюзії лівої середньої мозкової артерії у щурів показало достовірні відмінності в показниках ПОЛ в гомогенатах лівої півкулі у порівнянні з правою на тлі порушення сенсомоторної активності, що є опосередкованим підтвердженням розвитку ішемічного ураження в лівій півкулі, і відсутність такого – у правій.

3. Досліджувана сполука виявляє здатність активувати основні ферменти антиоксидантного захисту супероксиддисмутазу і глутатіонпероксидазу в мозку щурів у інтактних тварин і при моделюванні фокальної ішемії, також знижувати інтенсивність накопичення вторинних продуктів ПОЛ.

4. Природні протирадикальні властивості 4-(4-(2-аміноетокси)бензил)аніліну in vitro не вивчались, тому виявлена здатність агоніста TAAR1 активувати ферменти АОЗ in vivo свідчить на користь потенційного нейропротекторного ефекту сполуки.

5. Отримані дані розширюють уявлення про вплив синтетичних аналогів тиронамінів на вільні радикали, які є компонентами включення захисних сигнальних шляхів у головному мозку, що підтверджує можливість застосування 4-(4-(2-аміноетокси) бензил)аніліну як нейропротекторного засобу.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Проведена робота показує актуальність подальшого вивчення віддалених ефектів застосування синтетичних аналогів тиронамінів при фокальній ішемії мозку в експерименті для відновлення нормального функціонування внутрішньоклітинних сигнальних систем, пов'язаних з балансом вільних радикалів.

ФІНАНСУВАННЯ ТА КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Робота виконана за рахунок фінансування НДР 0117U005431 «Синтез нових потенційно активних сполук на основі похідних сечовини та тіосечовини, прогнозування їх біологічної активності» по кафедрі загальної та біологічної хімії Донецького національного медичного університету в місті Лиман. Робота відповідає всім етичним вимогам: висновок комісії з біоетики ДНМУ № 8 від 14.12.2023.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bunzow JR, Sonders MS, Arttamangkul S, Harrison LM, Zhang G, Quigley DI, et al. Amphetamine, 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, Lysergic Acid Diethylamide, and Metabolites of the Catecholamine Neurotransmitters Are Agonists of a Rat Trace Amine Receptor. Mol Pharmacol. 2001. № 60(6). P. 1181-8. DOI: http://doi.org/10.1124/mol.60.6.1181
2. Scanlan TS, Suchland KL, Hart ME, Chiellini G, Huang Y, Kruzich PJ, et al. 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. Nat Med. 2004. № 10(6). P. 638-42. DOI: https://doi.org/10.1038/nm1051
3. Chiellini G, Nesi G, Digiacomo M, Malvasi R, Espinoza S, Sabatini M, et al. Design, Synthesis, and

Evaluation of Thyronamine Analogues as Novel Potent Mouse Trace Amine Associated Receptor 1 (m TAAR1) Agonists. J Med Chem. 2015. № 58(12) P. 5096-107. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00526
4. Bellusci L, Runfola M, Carnicelli V, Sestito S, Fulceri F, Santucci F, et al. Endogenous 3-iodothyronamine (T1Am) and synthetic thyronamine-like analog SG-2 act as novel pleiotropic neuroprotective agents through the modulation of SIRT6. Molecules. 2020. № 25(5). P. 1-14. DOI: https://doi.org/10.3390/molecules25051054
5. Bellusci L, Laurino A, Sabatini M, Sestito S, Lenzi P, Raimondi L, et al. New insights into the potential roles of 3-Iodothyronamine (T1AM) and newly developed thyronamine-like TAAR1 agonists in neuroprotection. Front Pharmacol. 2017. № 8. P. 1-17. DOI: https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00905
6. Xiong XY, Liu L, Yang QW. Refocusing neuroprotection in cerebral reperfusion era: New challenges and strategies. Front Neurol. 2018. № 9 (APR). P. 1-11. DOI: https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00249
7. Li Y, Zhang J. Animal models of stroke. Anim Model Exp Med. 2021. № 4(3) P. 204-19. DOI: https://doi.org/10.1002/ame2.12179
8. Tao T, Liu M, Chen M, Luo Y, Wang C, Xu T, et al. Natural medicine in neuroprotection for ischemic stroke: Challenges and prospective. Pharmacol Ther. 2020. № 216. P. 107695. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107695
9. Gencarelli M, Lodovici M, Bellusci L, Raimondi L, Laurino A. Redox Properties of 3-Iodothyronamine (T1AM) and 3-Iodothyroacetic Acid (TA1). 2022. № 23 (5). P. 2718. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms23052718
10. Шаріпов Р.Р., Коцюруба А. В., Коп'як Б.С., Сагач В. Ф. Індукція оксидативного стресу в мітохондріях серця за фокальної ішемії – реперфузії головного мозку та протекторна дія екдистерону. Фізіол журн. 2014. № 60(3). С. 11-7.
11. Encarnacion A, Horie N, Keren-Gill H, Bliss TM, Steinberg GK, Shamloo M. Long-term behavioral assessment of function in an experimental model for ischemic stroke. J Neurosci Methods. 2011. № 196(2). P. 247-57. DOI: https://doi.org.//10.1016/j.jneumeth.2011.01.010
12. Cox PA, Reid M, Leach AG, Campbell AD, King EJ, Lloyd-Jones GC. Base-Catalyzed Aryl-B(OH)2 Protodeboronation Revisited: From Concerted Proton Transfer to Liberation of a Transient Aryl Anion. J Am Chem Soc. 2017. № 139(37). P. 13156-65. DOI: https://doi.org/10.1021/jacs.7b07444
13. Lennox AJJ, Lloyd-Jones GC. Selection of boron reagents for Suzuki-Miyaura coupling. Chem Soc Rev. 2014. № 43(1). P. 412-43. DOI: https://doi.org/10.1039/c3cs60197h
14. Deng JZ, Paone D V., Ginnetti AT, Kurihara H, Dreher SD, Weissman SA, et al. Copper-facilitated Suzuki reactions: Application to 2-heterocyclic boronates. Org Lett. 2009. № 11(2). P. 345-7. DOI: https://doi.org/10.1021/ol802556f
15. Silvestro S, Mazzon E. Nrf2 Activation: Involvement in Central Nervous System Traumatic Injuries. A Promising Therapeutic Target of Natural Compounds. Int J Mol Sci. 2023. № 24(1). DOI: https://doi.org/10.3390/ijms24010199
16. Zhang X, Wu Q, Lu Y, Wan J, Dai H, Zhou X, et al. Cerebroprotection by salvianolic acid B after experimental subarachnoid hemorrhage occurs via Nrf2- and SIRT1-dependent pathways. Free Radic Biol Med. 2018. № 124. P. 504-16. DOI: https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.035
17. Pan H, Guan D, Liu X, Li J, Wang L, Wu J, et al. SIRT6 safeguards human mesenchymal stem cells from oxidative stress by coactivating NRF2. Cell Res. 2016. № 26(2). P. 190-205. DOI: http://doi.org/10.1038/cr.2016.4
18. Kawahara TLA, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, et al. SIRT6 Links Histone H3 Lysine 9 Deacetylation to NF-κB-Dependent Gene Expression and Organismal Life Span. Cell. 2009. № 136(1). P. 62-74. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.052
19. Bellezza I, Giambanco I, Minelli A, Donato R. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. Biochim Biophys Acta – Mol Cell Res. 2018. № 1865(5). P. 721-33. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010
20. Santos L, Escande C, Denicola A. Potential Modulation of Sirtuins by Oxidative Stress. Oxid Med Cell Longev. 2016. № 2016. P. 1-12. DOI: http://doi.org/10.1155/2016/9831825/

REFERENCES

1. Bunzow, J. R., Sonders, M. S., Arttamangkul, S., Harrison, L. M., Zhang, G., Quigley, D. I., Darland, T., Suchland, K. L., Pasumamula, S., Kennedy, J. L., Olson, S. B., Magenis, R. E., Amara, S. G., & Grandy, D. K. (2001). Amphetamine, 3,4-Methylenedioxymethamphetamine, Lysergic Acid Diethylamide, and Metabolites of the Catecholamine Neurotransmitters Are Agonists of a Rat Trace Amine Receptor. Molecular Pharmacology, 60(6), 1181-1188. https://doi.org/10.1124/mol.60.6.1181
2. Scanlan, T. S., Suchland, K. L., Hart, M. E., Chiellini, G., Huang, Y., Kruzich, P. J.,

Frascarelli, S., Crossley, D. A., Bunzow, J. R., Ronca-Testoni, S., Lin, E. T., Hatton, D., Zucchi, R., & Grandy, D. K. (2004). 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. Nature Medicine, 10(6), 638-642. https://doi.org/10.1038/nm1051

3. Chiellini, G., Nesi, G., Digiacomo, M., Malvasi, R., Espinoza, S., Sabatini, M., Frascarelli, S., Laurino, A., Cichero, E., Macchia, M., Gainetdinov, R. R., Fossa, P., Raimondi, L., Zucchi, R., & Rapposelli, S. (2015). Design, Synthesis, and Evaluation of Thyronamine Analogues as Novel Potent Mouse Trace Amine Associated Receptor 1 (m TAAR1) Agonists. Journal of Medicinal Chemistry, 58(12), 5096-5107. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00526
4. Bellusci, L., Runfola, M., Carnicelli, V., Sestito, S., Fulceri, F., Santucci, F., Lenzi, P., Fornai, F., Rapposelli, S., Origlia, N., Zucchi, R., & Chiellini, G. (2020). Endogenous 3-iodothyronamine (T1Am) and synthetic thyronamine-like analog SG-2 act as novel pleiotropic neuroprotective agents through the modulation of SIRT6. Molecules, 25(5), 1-14. https://doi.org/10.3390/molecules25051054
5. Bellusci, L., Laurino, A., Sabatini, M., Sestito, S., Lenzi, P., Raimondi, L., Rapposelli, S., Biagioni, F., Fornai, F., Salvetti, A., Rossi, L., Zucchi, R., & Chiellini, G. (2017). New insights into the potential roles of 3-Iodothyronamine (T1AM) and newly developed thyronamine-like TAAR1 agonists in neuroprotection. Frontiers in Pharmacology, 8(DEC), 1-17. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00905
6. Xiong, X. Y., Liu, L., & Yang, Q. W. (2018). Refocusing neuroprotection in cerebral reperfusion era: New challenges and strategies. Frontiers in Neurology, 9(APR), 1-11. https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00249
7. Li, Y., & Zhang, J. (2021). Animal models of stroke. Animal Models and Experimental Medicine, 4(3), 204-219. https://doi.org/10.1002/ame2.12179
8. Tao, T., Liu, M., Chen, M., Luo, Y., Wang, C., Xu, T., Jiang, Y., Guo, Y., & Zhang, J. H. (2020). Natural medicine in neuroprotection for ischemic stroke: Challenges and prospective. Pharmacology & Therapeutics, 216, 107695. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107695
9. Gencarelli, M., Lodovici, M., Bellusci, L., Raimondi, L., & Laurino, A. (2022). Redox Properties of 3-Iodothyronamine (T1AM) and 3-Iodothyroacetic Acid (TA1). International Journal of Molecular Sciences, 23(5), 2718. https://doi.org/10.3390/ijms23052718
10. Sharipov, R. R., Kotsiuruba, A. V., Kopyak B. S., Sagach V. F. (2014). Induction of oxidative stress in heart mitochondria of brain of focal ischemia-reperfusion and protective effect of ecdysterone. Fiziol. Zh., 60 (3), 11-17.
11. Encarnacion, A., Horie, N., Keren-Gill, H., Bliss, T. M., Steinberg, G. K., & Shamloo, M. (2011). Long-term behavioral assessment of function in an experimental model for ischemic stroke. Journal of Neuroscience Methods, 196(2), 247-257. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.01.010
12. Cox, P. A., Reid, M., Leach, A. G., Campbell, A. D., King, E. J., & Lloyd-Jones, G. C. (2017). Base-Catalyzed Aryl-B(OH)2 Protodeboronation Revisited: From Concerted Proton Transfer to Liberation of a Transient Aryl Anion. Journal of the American Chemical Society, 139(37), 13156-13165. https://doi.org/10.1021/jacs.7b07444
13. Lennox, A. J. J., & Lloyd-Jones, G. C. (2014). Selection of boron reagents for Suzuki-Miyaura coupling. Chemical Society Reviews, 43(1), 412-443. https://doi.org/10.1039/c3cs60197h
14. Deng, J. Z., Paone, D. V., Ginnetti, A. T., Kurihara, H., Dreher, S. D., Weissman, S. A., Stauffer, S. R., & Burgey, C. S. (2009). Copper-facilitated Suzuki reactions: Application to 2-heterocyclic boronates. Organic Letters, 11(2), 345-347. https://doi.org/10.1021/ol802556f
15. Silvestro, S., & Mazzon, E. (2023). Nrf2 Activation: Involvement in Central Nervous System Traumatic Injuries. A Promising Therapeutic Target of Natural Compounds. International Journal of Molecular Sciences, 24(1). https://doi.org/10.3390/ijms24010199
16. Zhang, X., Wu, Q., Lu, Y., Wan, J., Dai, H., Zhou, X., Lv, S., Chen, X., Zhang, X., Hang, C., & Wang, J. (2018). Cerebroprotection by salvianolic acid B after experimental subarachnoid hemorrhage occurs via Nrf2- and SIRT1-dependent pathways. Free Radical Biology and Medicine, 124, 504-516. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.035
17. Pan, H., Guan, D., Liu, X., Li, J., Wang, L., Wu, J., Zhou, J., Zhang, W., Ren, R., Zhang, W., Li, Y., Yang, J., Hao, Y., Yuan, T., Yuan, G., Wang, H., Ju, Z., Mao, Z., Li, J., ... Liu, G. H. (2016). SIRT6 safeguards human mesenchymal stem cells from oxidative stress by coactivating NRF2. Cell Research, 26(2), 190-205. https://doi.org/10.1038/cr.2016.4
18. Kawahara, T. L. A., Michishita, E., Adler, A. S., Damian, M., Berber, E., Lin, M., McCord, R. A., Ongaigui, K. C. L., Boxer, L. D., Chang, H. Y., & Chua, K. F. (2009). SIRT6 Links Histone H3 Lysine 9 Deacetylation to NF-κB-Dependent Gene Expression and Organismal Life Span. Cell, 136(1), 62-74. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.052
19. Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., & Donato, R. (2018). Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. Biochimica et Biophysica Acta — Molecular Cell Research, 1865(5), 721-733. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.02.010
20. Santos, L., Escande, C., & Denicola, A. (2016). Potential Modulation of Sirtuins by Oxidative Stress. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 1-12. https://doi.org/10.1155/2016/9831825

Summary

IMPACT OF THYRONAMINE ANALOGUE ON LIPID PEROXIDATION IN THE BRAIN OF RATS

Hanna O. Fedorova, Nataliya V. Velychko, Olena V. Bogatyrova

Donetsk national medical university, department of general and biological chemistry, Lyman, Ukraine

Introduction. Thyronamines belong to agonists of TAAR1 – trace amine receptors in the brain. The mechanism of activation of the processes of autophagy and neuroplasticity under the action of a synthetic analogue of thyronamines – 4-(4-(2-aminoethoxy)benzyl)aniline is described. Since cerebrovascular disorders remain the most common among neurological diseases, the development and implementation of drugs with neuroprotective properties is considered a promising strategy for the treatment and rehabilitation of patients with ischemic stroke.
The aim of the study was to elucidate the effect of 4-(4-(2-aminoethoxy)benzyl)aniline on the activity of GPO, SOD and the dynamics of changes in the level of TBARS in the brain of rats after modeling focal ischemia by transient occlusion of the left middle cerebral artery.
Materials and methods. The 4-(4-(2-aminoethoxy)benzyl)aniline was synthesized. Changes in the activity of antioxidant enzymes and the accumulation of secondary LPO products that react with thiobarbituric acid (TBARS) in rat brain homogenates were observed after injection of the studied compound in different dosages, as well as 24 hours after modeling focal ischemia. A neurological deficit in experimental rats was detected by the Garcia scale and the vibrissae-evoked forelimb placing test.
Results. Compilation of data made it possible to find a strong relationship between the amount of the injected analogue and the growth of GPO activity in the neurons of healthy animals. In 80 % of rats, occlusion of the middle cerebral artery induced evident sensorimotor disorders. 24 hours after the administration of a synthetic analogue of thyronamine in the homogenates of the affected left hemisphere, the activity of glutathione peroxidase significantly increased, and the content of TBARS decreased, and a tendency to activation of SOD was also observed.
Conclusions. The obtained data indicate a positive effect of 4-(4-(2-aminoethoxy) benzyl) aniline on antioxidant enzymes in the intact rat brain and after modeling of focal ischemia, which is the basis to continue research for the purpose of finding long-term neuroprotective effects.

Key words: **TAAR1 agonists, modeling of focal ischemic stroke, neuroprotectors, antioxidants**