



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **38155** (13) **U**
(51) МПК (2006)
C07D 277/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОЛУКА 3-ДЕЦИЛОКСИКАРБОНІЛМЕТИЛ-4-МЕТИЛ-5-(2-ГІДРОКСІЕТИЛ)ТІАЗОЛІЙ ХЛОРИД, ЯКА МАЄ ІНГІБУЮЧИЙ ЕФЕКТ НА ПРОЦЕС НАТРІЄЗАЛЕЖНОГО НАКОПИЧЕННЯ ГЛУТАМАТУ ІЗОЛЬОВАНИМИ НЕРВОВИМИ ЗАКІНЧЕННЯМИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ**

1

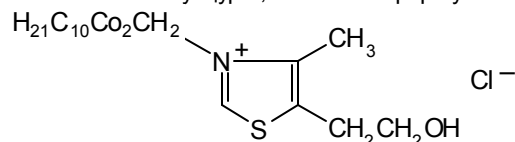
2

(21) u200809322

(22) 17.07.2008

(24) 25.12.2008

(46) 25.12.2008, Бюл.№ 24, 2008 р.

(72) БОРИСОВА ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА, UA,
КРИСАНОВА НАТАЛІЯ ВАЛЕРІЙВНА, UA, СІВКО
РОМАН ВІТАЛІЙОВИЧ, UA, РОМАНЕНКО ОЛЕК-
САНДР ВІКТОРОВИЧ, UA, ВОВК АНДРІЙ ІВАНО-
ВИЧ, UA(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, UA, ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ
ІМ.О.В.ПАЛЛАДІНА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇНАУК УКРАЇНИ, UA, ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ
ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ НАН УКРАЇНИ, UA(57) Сполука 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-
5-(2-гідроксietил)тіазолій хлорид, яка має інгібу-
ючий ефект на процес натрієзалежного накопичення
глутамату ізольованими нервовими закінченнями
головного мозку щурів, загальної формули:Корисна модель відноситься до медицини, а
саме до фармакології.Завданням корисної моделі є дослідження дії
сполуки 3-децилоксикарбонілметил-4-метил-5-(2-
гідроксietил)тіазолій хлориду (ДМГТ) на процес
натрій-залежного накопичення глутамату ізольо-
ваними нервовими закінченнями головного
мозку щурів.Вивчення дії ДМГТ на процес накопичення
глутамату ізольованими нервовими закінченнями
головного мозку щурів проводилось у відділі ней-
рохімії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН
України і на кафедрі біології Національного меди-
чного університету імені О.О. Богомольця. ДМГТ
синтезовано у відділі механізмів біоорганічних
реакцій Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії
НАН України.У забезпеченні функціонування центральної
нервової системи в організмі ссавців важлива роль
належить тіаміну (вітаміну В₁). При його дефіциті в
організмі можуть порушуватися рефлексорна дія-
льність, координація рухів, відбуватися нейроде-
генеративні процеси [1]. Тіамін здатен впливати на
процес квантової секреції медіатора з нервовихзакінчень в синапсах різних типів, посилюючи його
[2-4].Серед ендогенних біологічно активних сполук
тільки в молекулі тіаміну та продуктах його мета-
болізму є тіазолієвий цикл. Раніше було синтезо-
вано похідне вітаміну В₁ з непорушеним тіазоліє-
вим циклом - сполуку ДМГТ [5]. Присутній в складі
молекули ДМГТ тіазолієвий цикл обумовлює здат-
ність молекули реалізовувати свої властивості
через один з шляхів прояву біологічної активності
вітаміну В₁ в організмі, а довголанцюговий вугле-
цеводневний радикал - взаємодіяти з біологічни-
ми мембранами. ДМГТ виявляє ряд властивостей,
що дозволяють характеризувати його як потенцій-
ний лікарський засіб [5-9]. При введенні в організм
лабораторних тварин ДМГТ чинить на них седати-
вний, центральний міорелаксантий, протисудом-
ний, снотворний ефекти, обумовлює підвищення
порогу больової чутливості, послаблення орієнту-
вальних реакцій та пошукової діяльності, а також
нейротоксичного впливу виділеного з отрути паву-
ка каракурта (*Latrodectus mactans tradacmuguttatus*)
білкового токсину α-латротоксину. ДМГТ викликає
блокування в міоневральних синапсах квантової(13) **U**(11) **38155**(19) **UA**

секреції медіатора з нервових закінчень, яка відбувається у відповідь на подразнення нервових волокон або дію α -латротоксину. ДМГТ обумовлює також зменшення іонних струмів через сформовані α -латротоксином, амфотерицином В або ністатинном іонні канали в штучній пласкій фосфоліпідній мембрані.

Наведені вище дані обумовили доцільність дослідження впливу ДМГТ на процес накопичення нервовими терміналами глутамату - нейромедіатору, що обумовлює збудження нервових клітин і відіграє важливу роль у центральній нервовій системі ссавців [10-14]. Глутамат бере участь у здійсненні таких важливих функцій головного мозку, як розпізнавання, пам'ять та навчання. Глутамат синтезується та зберігається в спеціалізованих глутаматергічних нейронах і при дії різних подразників вивільнюється з них у синаптичну щілину. Вивільнений з нервових закінчень глутамат зв'язується з мембранними рецепторами та активує відповідні сигнальні шляхи. Далі він поглинається транспортними білками, високоафінними натрій-залежними переносниками глутамату нервового закінчення, які відіграють центральну роль у видаленні глутамату з синаптичної щілини і припиненні передачі нервового сигналу та гомеостазі зовнішньоклітинного глутамату в центральній нервовій системі ссавців [10-14].

В основу корисної моделі поставлено те, що ДМГТ інгібує процес накопичення L-глутамату, який відбувається за рахунок роботи високо афінних натрій-залежних переносників глутамату, а ступінь інгібуючого ефекту зростає при збільшенні концентрації ДМГТ в середовищі інкубації та часу преінкубації ДМГТ з синапсоматомами. Встановлена здатність ДМГТ (час преінкубації 5хв) в концентрації 0,01мМ зменшувати накопичення L-[14 C] глутамату синапсоматомами за 2хв на $15\pm 3\%$, 0,05мМ - на $22\pm 3\%$, 0,1мМ - на $53\pm 4\%$, 0,2мМ - на $67\pm 6\%$. Дані свідчать, що ДМГТ суттєво знижує як початкову швидкість процесу транспорту, так і накопичення L-[14 C] глутамату синапсоматомами за 10хв. Дія ДМГТ залежить від часу преінкубації, 15хв преінкубація з препаратом синапсоматом 0,1мМ ДМГТ знижує накопичення L-[14 C] глутамату за 2хв на $63\pm 6\%$, 25хв на $75\pm 7\%$.

Методика виділення пресинаптичних нервових закінчень головного мозку щурів та вивчення процесу накопичення глутамату.

Виділення синапсоматом з головного мозку щурів.

Щурів-самців лінії Wistar масою 100-120г декапітували, великі півкулі головного мозку швидко переносили в льодяний розчин 0,32М сахарози, 5мМ Hepes-NaOH (pH 7,4) та 0,2мМ етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА). Усі операції проводилися при 4°C. Синапсомати виділяли з гомогенату мозку диференційним центрифугуванням і центрифугуванням в градієнті фікола, застосовуючи метод Котмана [15] з невеликими модифікаціями: розчин сахарози для приготування градієнту фікола містив 5мМ Hepes-NaOH (pH 7,4) і 0,2мМ ЕДТА. Синапсоматальну фракцію, отриману при фракціонуванні в градієнті фікола, розводили 10 об'ємами 0,32М сахарози, 5мМ Hepes-NaOH (pH

7,4) та центрифугували при 20000g протягом 20хв. Отриманий осад повільно суспендували в 4мл оксигенованого холодного середовища, що містив (в мМ): NaCl - 126, KCl - 5, MgCl₂ - 1,4, NaH₂PO₄ - 1,0, HEPES - 20, CaCl₂ і d-глюкозу -10 (pH 7,4), (кінцева концентрація білка становила біля 4мг/мл), та використовували в експериментах протягом 2-4 годин після виділення. Концентрацію білка визначали за методом Larson [16].

Накопичення L-[14 C] глутамату синапсоматомами.

Накопичення L-[14 C] глутамату синапсоматомами визначали наступним чином: препарат (125мкл суспензії синапсоматом, 0,2мг білка/мл) преінкубували у стандартному сольовому розчині упродовж 10хв при 37°C. Процес накопичення ініціювали додаванням до суспензії синапсоматом 10мкМ L-глутамату разом з 420нМ радіоактивно міченого L-[14 C] глутамату (0,1мкCi/мл) (Amersham, UK), інкубували 1-10хв при 37°C та центрифугували на мікроцентрифузі Beckman 20сек при 10000g. Накопичення L-[14 C] глутамату визначали у аліквотах супернатанту (100мкл) та осадку у сцинтиляційній рідині ACS (1,5мл) Amersham (UK) на сцинтиляційному лічильнику.

В наших експериментах накопичення L-[14 C] глутамату було натрій-залежним та здійснювалося за рахунок роботи високоафінних натрій-залежних переносників глутамату, локалізованих у плазматичній мембрані нервових закінчень. ДМГТ в різних концентраціях додавали до суспензії синапсоматом за 5хв до ініціації процесу накопичення L-[14 C] глутамату. Ступінь інгібування накопичення L-[14 C] глутамату залежала від концентрації ДМГТ в середовищі інкубації. Інгібуючий ефект ДМГТ в концентраціях 0,01мМ; 0,05мМ; 0,1мМ; 0,2мМ на процес накопичення 0,01мМ L-[14 C] глутамату представлено на Фіг.1. В контролі (до преінкубації синапсоматом з ДМГТ) початкова швидкість накопичення глутамату становила $2,5\pm 0,3$ нмоль \times хв.⁻¹ \times мг білка⁻¹, а після преінкубації синапсоматом з ДМГТ в концентрації 0,01мМ - $2,13\pm 0,3$ нмоль \times хв.⁻¹ \times мг білка⁻¹; 0,05мМ - $1,6\pm 0,3$ нмоль \times хв.⁻¹ \times мг білка⁻¹; 0,1мМ - $1,2\pm 0,3$ нмоль \times хв.⁻¹ \times мг білка⁻¹; 0,2мМ - $0,8\pm 0,4$ нмоль \times хв.⁻¹ \times мг білка⁻¹. Накопичення L-[14 C] глутамату за 10хв становило $5,5\pm 0,3$ нмоль/мг білка, а після преінкубації синапсоматом з ДМГТ в концентрації 0,01мМ - $5,3\pm 0,3$ нмоль/мг білка; 0,05мМ - $4,4\pm 0,3$ нмоль/мг білка; 0,1мМ - $3,2\pm 0,3$ нмоль/мг білка; 0,2мМ - $1,48\pm 0,4$ нмоль/мг білка.

Ступінь інгібуючої дії ДМГТ залежала також від часу преінкубації цієї сполуки з синапсоматомами. На Фіг.2 представлено дані щодо залежності процесу накопичення 0,01мМ L-[14 C] глутамату від часу преінкубації синапсоматом з 0,1мМ ДМГТ. При цьому початкова швидкість накопичення глутамату в контрольних препаратах синапсоматом, що інкубувалися 5, 15 та 25хв в середовищі, що не містило ДМГТ, статистично достовірно не відрізнялася і становила $2,5\pm 0,3$ нмоль \times хв.⁻¹ \times мг білка⁻¹, а після 5хв преінкубації з ДМГТ в концентрації 0,1 мМ - $1,2\pm 0,3$ нмоль \times хв.⁻¹ \times мг білка⁻¹; після 15хв преінкубації - $1,0\pm 0,3$ нмоль \times хв.⁻¹ \times мг білка⁻¹; після 25хв преінкубації - $0,57\pm 0,4$ нмоль \times хв.⁻¹ \times мг білка⁻¹. Накопичення L-[14 C] глутамату за 10хв також залежа-

ло від часу преінкубації синапсом з 0,1мМ ДМГТ (Фіг.2). Таким чином, слід підкреслити наступне:

1. ДМГТ суттєво зменшує процес накопичення L-[¹⁴C] глутамату ізольованими нервовими закінченнями (синапсами) головного мозку щурів. Цей ефект є дозозалежним.

2. 50% зниження початкової швидкості та накопичення L-[¹⁴C] глутамату за 10хв відбувається в присутності ДМГТ в середовищі інкубації в концентрації 0,1мМ (час попередньої преінкубації з ДМГТ становить 5хв).

3. Інhibуюча дія ДМГТ на процес накопичення L-[¹⁴C] глутамату залежить від часу його преінкубації з синапсами: чим більше час преінкубації, тим сильнішим є ефект ДМГТ.

Література

1. Bettendorff L. Thiamine in excitable tissues: reflections on a non-cofactor role //Metab. Brain Dis. - 1994. -9, №3. -P.183-209.

2. Романенко А.В. Действие тиамин на нервно-мышечную передачу у лягушки //Нейрофизиология. -1985. -17, №6. -С.794-800.

3. Романенко А.В. Действие тиамин на различные типы синаптических соединений //Нейрофизиология. - 1986. - 18, №5. - С. 621-629.

4. Романенко А.В., Гнатенко В.М., Владимирова И.А. Действие тиамин на нервно-мышечную передачу в гладких мышцах //Нейрофизиология. - 1994. -26, №6. -С.449-457.

5. Вовк А.И., Романенко А.В., Муравьева И.В., Зайцев Л.М. 3-дезоксикарбонилметил-4-метил-5-β-гидроксиэтилтиазолий хлорид или дезоксикарбонилметил-4-метилтиазолий хлорид, угнетающие нервно-мышечную передачу и обладающие транквилизирующей активностью //Авторское свидетельство 1547267 СССР, МКИ⁴ C07D277/24, A61K31/425. Заявлено 18.07.88. Зарегистрировано 01.11.89.

6. Романенко А.В., Вовк А.И., Шатурский О.Я. Действие тиазольевых аналогов витамина В₁ на нервно-мышечную передачу и вызванную α-латротоксином секрецию медиатора в скелетной мышце //Нейрофизиология.-1995.- 27, №5/6.- С.368-374.

7. Романенко А.И., Гнатенко В.М., Владимирова И.А., Вовк А.И. Пре- и постсинаптическая модуляция нервно-мышечной передачи в гладких мышцах тиазольевыми аналогами витамина В₁. //Нейрофизиология.- 1995. -27, №5/6.- С.375-386.

8. Романенко А.В., Вовк А.И., Гиммельрейх Н.Г. Шатурский О.Я. Сполука 3-децилоксикарбонилметил-4-метил-5-(2-гидроксиетил)тиазолий хлорид, яка має блокувальний ефект на іонну провідність каналів, утворених амфотерицином В. //Патент на корисну модель №22875 зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 25 квітня 2007р.- 8с.

9. Шатурский О.Я. Романенко А.В., Вовк А.И., Гиммельрейх Н.Г. Сполука 3-децилоксикарбонилметил-4-метил-5-(2-гидроксиетил)тиазолий хлорид, яка має блокуючий ефект на іонну провідність каналів, утворених ністатином. //Патент на корисну модель №27417 зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 25 жовтня 2007р.- 8с.

10. Borisova T.A., Krisanova N.V., Presynaptic transporter-mediated release of glutamate evoked by the protonophore FCCP increases under altered gravity conditions. //J. Adv. Space Res.- doi:10.1016/j.asr.2008.04.012, 2008.

11. Borisova T.A., Himmelreich N.H., Centrifuge-Induced Hypergravity: [³H]GABA and L-[¹⁴C]glutamate Uptake, Exocytosis and Efflux Mediated by High-Affinity, Sodium-Depended Transporters. //J. Adv. Space Res.- 2005.- 36.- P.1340-1345.

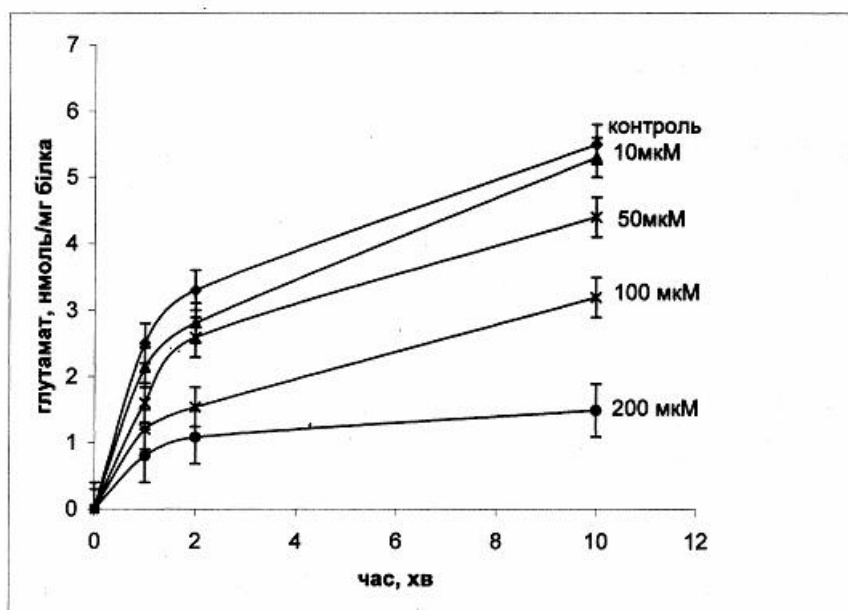
12. Borisova T., Krisanova N. Presynaptic release of glutamate by heteroexchange under altered gravity conditions //Microgravity Science & Technology.- doi 10.1007/s 12217-008-9049-9, 2008.

13. Tarasenko A.S., Kostzevska O.G., Storchak L.G., Linetska M.V., Borisova T.A., Himmelreich N.H. Phenylarsine oxide is able to dissipate synaptic vesicle acidic pool. //Neurochemistry International.- 2005.- 46. -P.541-550.

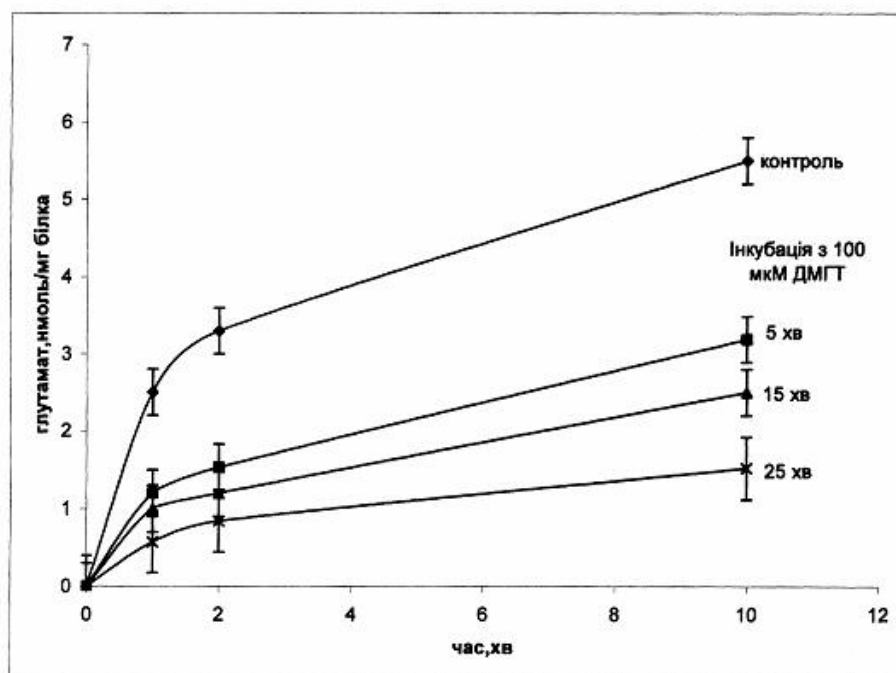
14. Borisova T., Krisanova N. Ground-based hypergravity simulated modeling changed the effects of the glutamate transporter inhibitor on the carrier-mediated glutamate release in low [Na⁺] media from rat brain nerve terminals. //Journal of Gravitational Physiology.- 2006.-13, N1.- P.137-138.

15. Cotman C.W. Isolation of synaptosomal and synaptic plasma membrane fractions //Meth. Enzymol.- 1974.- 31. -P.445-452.

16. Larson E., Hewlett B., Jagendorf A. Artificial reductant enhancement of the Lowry method for protein determination //Anal. Biochem. -1986.- 155. - P.243-248.



Фіг. 1



Фіг. 2