

Recommended by Doctor of Pharmacy, professor T. S. Sakharova

UDC 615.2:547.571'292:616.831-00

DOI: 10.24959/cphj.17.1413

I. I. Zamorskii, Yu. S. Bukataru, S. V. Kolisnyk*

Higher State Educational Establishment of Ukraine "Bukovinian State Medical University"
National University of Pharmacy*

THE EFFECT OF 2-BENZAMIDO-2-(2-OXOINDOLIN-3-ILIDEN) ACETIC ACID DERIVATIVE ON THE ACTIVITY OF LIPID PEROXIDATION PROCESSES AND THE ANTIOXIDANT DEFENSE IN CHRONIC HYPOBARIC HYPOXIA

Hypoxia is a typical pathological process developing due to the decreased concentration of oxygen in the organism or in the particular tissues and organs, as well as disturbances of oxygen utilization during biological oxidation.

Aim. To determine the antihypoxic and antioxidant activity of the ZNM derivative of 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-iliden) acetic acid in the brain and blood plasma of rats under the conditions of chronic hypobaric hypoxia (CHH) by the indicators of the lipid peroxidation processes activity and the state of the antioxidant defense.

Materials and methods. The studies were conducted under the conditions of CHH modeled by the standard method. The ZNM substance in the dose of 15 mg/kg and the reference drug mexidol in the dose of 100 mg/kg were injected intraperitoneally starting from the 14th day of the experiment 30 min prior to the hypoxia simulation.

Results. In the group of animals treated with ZNM a significant decrease in the content of malondialdehyde in the blood plasma and brain structures (by 1.2 and 1.1 times, respectively), as well as in the content of oxidative modified proteins (by 1.2 times in the blood plasma and 1.4 times in the brain tissue) was observed. The content of ceruloplasmin in the blood plasma decreased by 1.7 times; the content of SH-groups increased by 3.1 times; the catalase activity increased by 1.2 times in the blood plasma, and by 1.9 times in brain homogenates. The reduced glutathione level in brain homogenates increased by 1.4 times; the glutathione peroxidase activity significantly increased by 2.1 times in the blood plasma and by 1.3 times in brain homogenates compared to the model pathology group.

Conclusions. It has been found that both mexidol and the ZNM substance demonstrate a significant antioxidant activity under the conditions of CHH by stabilizing the balance between prooxidant and antioxidant systems of the body in rats, and it is particularly important in oxidative stress caused by chronic hypoxia.

Key words: antihypoxants; chronic hypobaric hypoxia; 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-iliden) acetic acid derivative; mexidol

I. I. Заморський, Ю. С. Букатару, С. В. Колісник*

Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет»
Національний фармацевтичний університет*

Вплив похідного 2-бензамідо-2-(2-оксоіндолін-3-іліден) оцтової кислоти на активність процесів ліпопероксидації та стан антиоксидантного захисту при хронічній гіпобаричній гіпоксії

Гіпоксія – типовий патологічний процес, що виникає при зниженому вмісті кисню в організмі або окремих тканинах і органах, а також при порушенні утилізації кисню в процесі біологічного окиснення.

Мета. Метою дослідження стало встановлення антигіпоксанта та антиоксидантної активності похідного 2-бензамідо-2-(2-оксоіндолін-3-іліден) оцтової кислоти ZNM в головному мозку та плазмі крові щурів за умов хронічної гіпобаричної гіпоксії (ХГГ) за показниками активності процесів ліпопероксидації та стану антиоксидантного захисту у щурів.

Матеріали та методи. Дослідження проводились за умов ХГГ, яку моделювали за стандартною методикою. Речовину ZNM у дозі 15 мг/кг та препарат порівняння мексидол у дозі 100 мг/кг вводили внутрішньоочеревинно, починаючи з 14 доби моделювання гіпоксії за 30 хв до початку сеансу.

Результати. У групі тварин, яким вводили досліджувану речовину ZNM, спостерігали достовірне зниження вмісту малонового діальдегіду як у плазмі крові, так і в структурах головного мозку (відповідно в 1,2 рази та в 1,1 рази), а також вміст продуктів окиснювальної модифікації білків (для плазми крові – в 1,2 рази, а для тканини головного мозку – в 1,4 рази). Вміст церулоплазміну в плазмі крові зменшився в 1,7 рази, а вміст SH-груп збільшився в 3,1 рази. При цьому активність каталази в плазмі крові підвищилась в 1,2 рази, а в гомогенатах головного мозку – в 1,9 рази. Вміст глутатіону відновленого у гомогенатах головного мозку підвищився в 1,4 рази, а активність глутатіонпероксидази підвищилась в плазмі крові в 2,1 рази, а в гомогенатах – в 1,3 рази.

Висновки. Отже, встановлено, що речовина ZNM суттєво не поступається дії мексидолу при ХГГ щодо антигіпоксанта та антиоксидантних властивостей, а також сприяє нормалізації прооксидантно-антиоксидантного балансу в плазмі крові та головному мозку щурів.

Ключові слова: антигіпоксанти; хронічна гіпобарична гіпоксія; похідні 2-бензамідо-2-(2-оксоіндолін-3-іліден) оцтової кислоти; мексидол

И. И. Заморский, Ю. С. Букатару, С. В. Колесник*

Высшее государственное учебное заведение Украины «Буковинский государственный медицинский университет»

*Национальный фармацевтический университет**

Влияние производных 2-бензамидо-2(2-оксоиндолин-3-илиден) уксусной кислоты на активность процессов липопероксидации и состояния антиоксидантной защиты при хронической гипобарической гипоксии

Гипоксия – типовой патологический процесс, возникающий при пониженном содержании кислорода в организме или отдельных тканях и органах, а также при нарушении утилизации кислорода в процессе биологического окисления.

Цель. Целью исследования стало установление антигипоксикантной и антиоксидантной активности производного 2-бензамидо-2(2-оксоиндолин-3-илиден) уксусной кислоты ZNM в головном мозге и плазме крови крыс в условиях хронической гипобарической гипоксии (ХГГ) по показателям активности процессов липопероксидации и состояния антиоксидантной защиты у крыс.

Материалы и методы. Исследования проводились в условиях ХГГ, которую моделировали по стандартной методике. Вещество ZNM в дозе 15 мг/кг и препарат сравнения мексидол в дозе 100 мг/кг вводили внутривенно, начиная с 14 суток моделирования гипоксии за 30 мин до начала сеанса.

Результаты. В группе животных, которым вводили исследуемое вещество ZNM, наблюдали достоверное снижение содержания малонового диальдегида как в плазме крови, так и в структурах головного мозга (соответственно в 1,2 раза и в 1,1 раза), а также содержание продуктов окислительной модификации белков (для плазмы крови – в 1,2 раза, а для ткани головного мозга – в 1,4 раза). Содержание церулоплазмينا в плазме крови уменьшилось в 1,7 раза, а содержание SH-групп увеличилось в 3,1 раза. При этом активность каталазы в плазме крови повысилась в 1,2 раза, а в гомогенатах головного мозга – в 1,9 раза. Содержание глутатиона восстановленного в гомогенатах головного мозга повысилось в 1,4 раза, а активность глутатионпероксидазы повысилась в плазме крови в 2,1 раза, а в гомогенатах – в 1,3 раза.

Выводы. Итак, установлено, что вещество ZNM существенно не уступает действию мексидола при ХГГ по антигипоксикантным и антиоксидантным свойствам, а также способствует нормализации прооксидантно-антиоксидантного баланса в плазме крови и головном мозге крыс.

Ключевые слова: антигипоксиканты; хроническая гипобарическая гипоксия; производные 2-бензамидо-2(2-оксоиндолин-3-илиден) уксусной кислоты; мексидол

Hypoxia is a typical pathological process developing due to the decreased concentration of oxygen in the organism or in the particular tissues and organs, as well as disturbances of oxygen utilization during biological oxidation [1]. Hypobaric hypoxia occurs due to reduction of oxygen partial pressure in the inhaled air under the conditions of the rarified atmosphere. It is characterized by multiorgan morphofunctional disturbances, which manifestation depends on duration and intensity of the hypoxia effect, the body's state (age, gender) and the presence of other environmental factors such as temperature, time of the day, season, etc. [2, 3]. The whole organism participates in development of the adaptation and compensatory reactions in hypoxia; however, but the brain is the most sensitive organ to changes in oxygen supply due to peculiarities of its oxidative metabolism [4, 5].

The antihypoxic activity of some 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-iliden) acetic acid derivatives was found in our screening research conducted under the conditions of acute hypobaric hypoxia. The most significant antihypoxic activity was shown by substance 15 under the conditional name ZNM [6]. The aim of the current study was to determine the antihypoxic and antioxidant activity of the ZNM derivative of 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-iliden) acetic acid in the brain and blood plasma of rats under the conditions of chronic hypobaric hypoxia (CHH) by the indices of the lipid peroxidation pro-

cesses activity and the state of the antioxidant defense.

Materials and Methods

The study was conducted on 32 white nonlinear mature male rats weighting 180-200 g divided into 4 groups (n = 8): the intact control animals, the model pathology group (CHH), the group of animals injected the ZNM substance intraperitoneally in the dose of 15 mg/kg in the form of an aqueous suspension stabilized by polysorbate 80 (Tween 80), and the group of animals administered the reference drug mexidol in the dose of 100 mg/kg [7, 8].

Animals were kept under the standard vivarium conditions at a constant temperature and humidity with free access to food and water. All manipulations and euthanasia of animals were carried out in accordance with the European Union Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

CHH was simulated in a modified flow pressure chamber by imitation of the lifting of rats to an altitude of 4000 m (463 mm Hg, partial pressure of oxygen pO₂ in the atmospheric air of the altitude of 97 mm Hg). The ascension rate of animals was 24 km/h, and it corresponded to the change in barometric pressure of 0.5 mm Hg per sec. Animals were maintained on the «altitude» for 2 h in the morning daily for 4 weeks [9].

Drugs were administered in the therapeutic regimen starting from the 14th day of the experiment

Table 1

The effect of the ZNM derivative of 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-iliden) acetic acid on the content of lipid and protein peroxidation products and the activity of the antioxidant system in the blood plasma of rats with chronic hypobaric hypoxia (M±m, n=8)

Index	Control	Model pathology (CHH)	CHH + ZNM	CHH + mexidol
MDA, μmol/l	12.34±0.65	15.78±0.46*	13.36±3.17#	12.27±2.52#
OMP, o.d.u./ml	0.78±0.07	1.16±0.02*	0.93±0.05#	0.82±0.08#
CAT, μmol/(min×l)	14.46±1.65	9.92±0.64*	12.27±0.48#	13.65±0.53#
GPx, nmol/(min×l)	113.43±1.13	50.71±3.60*	105.47±2.82#	109.87±0.31#>
CP, mg/l	166.2±2.43	320.7±2.30*	185.4±4.27#	173.6±4.44#>
SH-groups, μmol/ml	4.58±0.03	1.24±0.02*	3.83±0.07#	4.22±0.23#>

Note. * – the index of significance compared to the intact control; # – the index of significance compared to the model pathology; > – the index of significance compared to the ZNM substance; o.d.u. – optical density units; MDA – malondialdehyde; OMB – oxidative modified proteins; CAT – catalase; GPx – glutathione peroxidase; CP – ceruloplasmin; CHH – chronic hypobaric hypoxia.

30 min prior to the hypoxia simulation. At the end of the 4th week animals were decapitated under the light ether anesthesia.

To study the free radical processes the plasma and brain homogenates of animals were used. The activity of lipid peroxidation was assessed by the content of malondialdehyde (MDA) determined by the reaction with 2-thiobarbituric acid, and protein peroxidation – by the content of oxidative modified proteins (OMP) determined by the reaction with 2,4-dinitrophenylhydrazine to form hydrazones of the characteristic absorption spectrum. The state of the antioxidant system (AOS) was assessed by the activity of catalase (CAT) in the reaction with ammonium molybdate, by the ceruloplasmin level (CP) determined by the oxidation reaction of phenylenediamine and by the content of SH-groups. The glutathione peroxidase (GPx) activity was assessed by the amount of reduced glutathione (G-SH) which was not used in the enzymatic reaction. The G-SH level was determined in the reaction with potassium iodide [10, 11].

Statistical analysis of the results was performed using SPSS Statistics 17.0 and Microsoft Excel 2013. The statistical significance was assessed using parametric Student's t-test (for normal distribution)

and non-parametric Mann-Whitney U-test (in case of non-normal distribution). The critical level of significance was accepted as $p \leq 0.05$.

Results and Discussion

The results of the experiments conducted (Tab. 1 and 2) demonstrated that there was intensification of free radical processes along with reduction of the activity of both enzymatic and non-enzymatic components of the antiradical defense in the model pathology group. Particularly, in the blood plasma the MDA level increased by 1.3 times, the OMP level – by 1.5 times, and the CAT activity significantly decreased by 1.5 times compared to the intact animals. The CP level compensatorily increased by 1.9 times with simultaneous decrease the content of SH-groups by 3.7 times, and GPx – by 2.2 times.

In addition, the CAT activity reduced by 2.2 times in brain homogenates, the GPx activity – by 1.3 times, and the content of G-SH – by 1.5 times. The content of lipid and protein peroxidation products increased by 1.3 times compared to the intact control.

In the group of animals treated with ZNM the normalization of free radical oxidation of macromolecules and the AOS activity was observed. The use of ZNM significantly decreased the MDA level

Table 2

The effect of the ZNM derivative of 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-iliden) acetic acid on the content of lipid and protein peroxidation products and the activity of the antioxidant system in the brain of rats with chronic hypobaric hypoxia (M±m, n=8)

Index	Control	Model pathology (CHH)	CHH + ZNM	CHH + mexidol
MDA, μmol/g	33.4±1.60	43.3±1.5*	37.8±1.20#	35.32±1.73#>
G-SH, μmol/g	4.25±0.02	2.83±0.01*	3.97±0.05#	4.07±0.09#>
OMP, o.d.u./g	10.83±0.45	14.53±0.62*	12.17±1.35#	11.69±2.04#
CAT, μmol/(min×mg)	3.85±0.50	1.76±0.69*	3.27±0.50#	3.42±0.54#
GPx, nmol/(min×mg)	170.4±3.40	130.9±5.66*	164.23±3.52#	167.14±3.78#>

Note. G-SH – reduced glutathione; other symbols are the same as in Table 1.

in the blood plasma and brain structures (by 1.2 and 1.1 times, respectively), the OMP level (by 1.2 times in the blood plasma and by 1.4 times in the brain tissue). The CP content in the blood plasma had 1.7 times decrease, and the content of SH-groups increased by 3.1 times. The CAT activity in the blood plasma increased by 1.2 times in the blood plasma, and in brain homogenates – by 1.9 times. The G-SH level in brain homogenates increased by 1.4 times, the GPx activity significantly increased by 2.1 times in the blood plasma and by 1.3 times in brain homogenates compared to the model pathology group.

The action of the ZNM substance corresponds to the action of the antihypoxant reference drug mexidol by the effect on the prooxidant-antioxidant indices studied in the blood plasma and in brain structures although somewhat inferior to it.

In general, the ZNM substance prevents negative shifts of the prooxidant-antioxidant balance in the organism of rats affected by CCH.

Therefore, both mexidol and the ZNM substance demonstrate a significant antioxidant activity under the conditions of CCH by stabilizing the balance between prooxidant and antioxidant systems of the body in rats, and it is particularly important in oxidative stress caused by chronic hypoxia.

CONCLUSIONS

The ZNM derivative of 2-benzamido-2-(2-oxoindolin-3-ylidene) acetic acid exhibits the antioxidant properties under the conditions of chronic hypobaric hypoxia and promotes normalization of the prooxidant-antioxidant balance in the blood plasma and the brain of rats.

Conflicts of Interest: authors have no conflict of interest to declare.

Перелік використаних джерел інформації

1. Зарубина, И. В. Молекулярная фармакология антигипоксантов / И. В. Зарубина, П. Д. Шабанов. – СПб.: ООО «Изд-во Н-Л», 2004. – 368 с. – («Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии»; вип. 2).
2. Андреева, Н. Н. Экспериментальные и клинические аспекты применения мексидола при гипоксии / Н. Н. Андреева // Мед. альманах. – 2009. – № 4. – С. 193-197.
3. Катунина, Н. П. Об изучении влияния антигипоксантов и новых производных 3-оксипиридина на выживаемость мышей в условиях острой гипоксии / Н. П. Катунина // Наука и современность. – 2010. – № 5. – С. 298-300.
4. Лукьянова, Л. Д. Молекулярные механизмы тканевой гипоксии и адаптация организма / Л. Д. Лукьянова // Физиол. журн. – 2003. – Т. 49, № 3. – С. 17-35.
5. Основные механизмы формирования защиты головного мозга при адаптации к гипоксии / А. А. Солкин, Н. Н. Белявский, В. И. Кузнецов, А. Г. Николаева // Вестник ВГМУ. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 6-14.
6. Screening of derivatives of 2-(benzoylamino)(1-R-2-oxoindolin-3-ylidene)acetic acid under the conditions of acute hypobaric hypoxia / I. I. Zamorskii, Y. S. Bukataru, E. L. Lenga et al. // Вісник фармації. – 2016. – № 1. – С. 67-70.
7. Важнича, О. М. Антистрессорна активність мексидолу і роль структурних компонентів препарату в її реалізації / О. М. Важнича // Клінічна фармація. – 2001. – Т. 5, № 2. – С. 60-63.
8. Зв'язок «структура-антигіпоксична активність» у ряду похідних 2-бензамідо-2-(2-оксоіндолініліден-3)-оцтової кислоти / С. В. Колісник, Н. П. Кононенко, Д. В. Гаман, О. М. Котенко // Вісник фармації. – 2011. – № 4. – С. 64-66.
9. Пасевич, С. П. Антиоксидантний потенціал похідних 3-оксипіридину за умов хронічної гіпоксичної гіпоксії / С. П. Пасевич, І. І. Заморський // Укр. біофармац. журн. – 2014. – № 5. – С. 9-12.
10. Камышников, В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с.
11. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. М. И. Прохоровой. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – 272 с.

References

1. Zarubina, I. V., Shabanov, P. D. (2004). *Molekuliarnaia farmakologiia antigipoksantov*. Sankt-Peterburg, 368.
2. Andreeva, N. N. (2009). *Meditsinskii almanah*, 4, 193–197.
3. Katunina, N. P. (2010). *Nauka i sovremennost*, 5, 298–300.
4. Lukianova, L. D. (2003). *Fiziologichnyi zhurnal*, 49 (3), 17–35.
5. Solkin, A. A., Belianskii, N. N., Kuznetsov, V. I., Nikolaeva, A. G. (2012). *Vestnik VHMU*, 11 (1), 6–14.
6. Zamorskii, I. I., Bukataru, Y. S., Lenga, E. L. et al. (2016). Screening of derivatives of 2-(benzoylamino)(1-r-2-oxoindolin-3-ylidene)acetic acid under the conditions of acute hypobaric hypoxia. *Visnyk farmatsii – News of Pharmacy*, 1, 67–70.
7. Vazhnycha, O. M. (2001). *Klinichna farmatsiia – Clinical pharmacy*, 5 (2), 60–63.
8. Kolisnyk, S. V., Kononenko, N. P., Gaman, D. V., Kotenko, O. M. (2011). *Visnyk farmatsii – News of Pharmacy*, 4, 64–66.
9. Pasevich, S. P., Zamorskii, I. I. (2014). *Ukrainskyi biofarmatsevtichnyi zhurnal*, 5, 9–12.
10. Kamyshnikov, V. S. (2009). *Spravochnik po kliniko-biohimicheskim issledovaniiam i laboratornoi diagnostike*. Moscow: MEDpress-inform, 896.
11. Prohorova, M. I. (Ed.). (1982). *Metody biohimicheskikh issledovani (lipidnyi i energeticheskii obmen)*. Leningrad: Izd-vo LHMU, 272.

Information about authors / Відомості про авторів / Інформація об авторах

Zamorskii I. I., Doctor of Medicine (Dr. habil.), professor, head of the Pharmacology Department, Higher State Educational Institution of Ukraine «Bukovinian State Medical University»

Заморський І. І., доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри фармакології, Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет»

Zamorskii I. I., доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии, Высшее государственное учебное заведение Украины «Буковинский государственный медицинский университет»

Bukataryu Yu. S., teaching assistant of the Pharmacology Department, Higher State Educational Institution of Ukraine «Bukovinian State Medical University»

Букаатару Ю. С., асистент кафедри фармакології, Вищий державний навчальний заклад України «Буковинський державний медичний університет»

Букаатару Ю. С., ассистент кафедры фармакологии, Высшее государственное учебное заведение Украины «Буковинский государственный медицинский университет»

Kolisnyk S. V., Doctor of Pharmacy (Dr. habil.), professor of the Analytical Chemistry Department, National University of Pharmacy

Колісник С. В., доктор фармацевтичних наук, професор кафедри аналітичної хімії, Національний фармацевтичний університет

Kolesnik S. V., доктор фармацевтических наук, профессор кафедры аналитической химии, Национальный фармацевтический университет

Mailing address: 2, Theatralna sq., Chernivtsi, 58002, Pharmacology Department, Higher State Educational Institution of Ukraine «Bukovinian State Medical University». E-mail: zamorskii@mail.ru

Адреса для листування: 58002, м. Чернівці, Театральна пл., 2, кафедра фармакології ВДНЗ України «Буковинський державний медичний університет». E-mail: zamorskii@mail.ru

Адрес для переписки: 58002, г. Черновцы, Театральная пл., 2, кафедра фармакологии ВГУЗ Украины «Буковинский государственный медицинский университет». E-mail: zamorskii@mail.ru

Надійшла до редакції 25.01.2017 р.