

# Похідне бензодіазепіну – метрездіазенон усуває порушення поведінки та нормалізує вміст жовчних пігментів у щурів з паркінсонічним синдромом

Л.Я. Штанова<sup>1</sup>, С.П. Весельський<sup>1</sup>, П.І. Янчук<sup>1</sup>, Р.А. Рожнова<sup>2</sup>, В.С. Москвіна<sup>1</sup>,  
О.В. Шабликіна<sup>1</sup>, Є.М. Решетнік<sup>1</sup>, О.В. Кравченко<sup>3</sup>, В.П. Хиля<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка;

<sup>2</sup>Інститут хімії високомолекулярних сполук; Київ;

<sup>3</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ; e-mail: shtanova@ukr.net

Хвороба Паркінсона (ХП) пов'язана не лише з неврологічними проблемами, але й змінами в периферичних органах та периферичному метаболізмі. Метою нашої роботи було вивчити локомоторну та орієнтовно-дослідницьку поведінку, вміст пігментів жовчі у щурів з ротеноновою моделлю паркінсонічного синдрому (ПС), а також оцінити дію нового похідного бензодіазепіну – метрездіазенону. У роботі використовували тест «відкритого поля» та метод тонкошарової хроматографії. Одержані результати показали, що ротенон на 30,6% порівняно з контролем зменшував концентрацію жовчних пігментів. Під впливом метрездіазенону в дозі 1 мг/кг вміст пігментів жовчі відновився до 85% від контрольних значень, при дозі 2 мг/кг – сягав норми, а при 4 мг/кг – перевищував таку на 12,7%. За відсутності лікування вміст пігментів був істотно меншим, ніж у контролі. У щурів з експериментальним ПС як локомоторна, так і орієнтовно-дослідницька поведінка порівняно з контролем були суттєво ослабленими. Зокрема, кількість перетнутих квадратів «відкритого поля» зменшилася на 84%, а частота вставання на задні лапи – на 67%. Під впливом метрездіазенону рухова та дослідницька активність експериментальних тварин істотно покращилася. Так, при всіх дозах препарату як кількість перетнутих квадратів, так і частота вставання на задні лапи у відповідних групах не відрізнялися від норми. Без застосування метрездіазенону повного відновлення показників не було. Таким чином, він у всіх застосованих дозах, хоч і з різною ефективністю, але суттєво поліпшував як вміст пігментів у жовчі, так і загальний стан щурів з ротеноновою моделлю ПС.

Ключові слова: ротенон; паркінсонічний синдром; метрездіазенон; рухова поведінка; орієнтувальна поведінка; жовч; пігменти жовчі.

## ВСТУП

Хвороба Паркінсона (ХП) – поширене нейро-дегенеративне захворювання, клінічною ознакою якого є руховий синдром, що характеризується ригідністю, брадикінезією, тремором спокою та змінами пози й ходи [1]. Окрім рухових розладів, ХП пов'язана ще й з різними немоторними симптомами (НМС), включаючи когнітивні порушення, депресію, тривожність, порушення сну, шлунково-кишкові розлади тощо [2, 3]. Відомо, що класичні рухові ознаки ХП пов'язані з

дегенерацією дофамінергічних нейронів (ДА-нейронів) у *substantia nigra pars compacta* (SNpc) – критичній для контролю рухової поведінки ділянці мозку, та виснаженням дофаміну в смугастому тілі (*corpus striatum*). НМС, вірогідно, мають зв'язок із патологією  $\alpha$ -синуклеїну, яка, окрім стріатонігральної системи, залучає інші частини стовбура мозку, а також симпатичні, парасимпатичні, кишкові та тазові сплетення, серцеву систему, піднижньощелепну залозу, мозкову речовину надниркових залоз, шкіру, сітківку та ще деякі вісцеральні органи [4, 5]. Це свідчить

про топографічне та хронологічне поширення уражень, особливо на продромальних стадіях захворювання, що, однак, очікує подальшого підтвердження. Як виявилось, ХП також пов'язана з дисфункцією печінки, хоча це питання досі залишається мало вивченим [6]. Патологічний механізм розвитку ХП залишається невідомим, проте декілька негативних факторів, зокрема окисний стрес, нейрозапалення та мітохондріальна дисфункція, вважаються важливими ознаками патогенезу ХП [7]. Вікові зміни, генетична схильність та фактори навколишнього середовища (наприклад, пестициди) вважаються значущими для ризику ХП. На клітинних моделях і в дослідженнях на тваринах певні хімічні речовини можуть руйнувати ДА-нейрони. Деякі з цих агентів є мітохондріальними токсинами, які інгібують мітохондріальний комплекс І ланцюга транспортування електронів. Однією з таких токсичних сполук є ротенон, який широко використовують для моделювання паркінсонічного синдрому (ПС) у тварин [8]. Сучасна клінічна фармакотерапія лише тимчасово полегшує симптоми ХП, що супроводжується багатьма побічними ефектами. Тому пошукам природних протизапальних, антиоксидантних і нейропротекторних агентів приділяється велика увага. Проте досі жоден запропонований препарат не продемонстрував ефекту, що серйозно модифікує перебіг ХП. Серед ендогенних захисних механізмів було показано, що білірубін, метаболіт гемі, має важливу протизапальну і потужну антиоксидантну дію і тому запобігав загибелі ДА-нейронів у моделі ХП [9, 10]. Останнім часом було запропоновано застосування декількох медикаментозних терапій або комбінації в одній молекулі кількох структурних груп з різними фармакологічними мішенями (ліки з декількома механізмами). Фактично, спеціально для лікування ХП, були створені деякі мультилігандні препарати, зокрема в лабораторії університету Гавани. Тут на основі

1,5-бензодіазепіну розробили нову молекулу, яку назвали JM-20 (3-етоксикарбоніл-2-метил-4-(2-нітрофеніл)-4,11-дигідро-1H-піrido[2,3-b][1,5]бензодіазепін). Ця сполука була досліджена на ротенонових моделях ПС *in vitro* та *in vivo* і продемонструвала нейропротекторний потенціал збереженням життєздатності мітохондрій, а отже й клітин, і послабленням поведінкових змін, викликаних дією ротенону [11]. Високий рівень нейропротекторної активності у нейрональних клітинах нейробластоми людини SH-SY5Y, оброблених токсинами 6-OHDA і MPP<sup>+</sup>, виявили й у інших препаратів бензодіазепінового ряду, таких як 4-феніл-1H-1,5-бензодіазепін-2(3H)-он і 4-(3,4,5-триметоксифеніл)-1H-1,5-бензодіазепін-2(3H)-он [12]. Ми створили свою родину препаратів на основі бензодіазепіну, які добре себе проявили в корекції енергетичного та ліпідного обмінів на ротенонових моделях ПС [13, 14].

Метою нашої роботи було з'ясування змін моторної та орієнтовно дослідницької поведінки, а також вмісту пігментів у жовчі щурів з ротеноновою моделлю ПС та можливості модуляції цих змін за допомогою нового препарату – метрездіазенону, створеного на основі бензодіазепіну.

## МЕТОДИКА

Експерименти проводили згідно з чинними міжнародними вимогами та нормами гуманного ставлення до тварин (Страсбург, 1986 р., Закон України від 21 лютого 2006 р. № 3447-IV), відповідно до рішення Комітету з біологічної етики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 3 від 9 квітня 2009 р.). У роботі були використані ротенон, диметилсульфоксид виробництва фірми “Sigma” (США). Досліджуваний препарат – (E)-4-(2,4-діметокси)-2H-бензо[d][1,2]діазепін-1(5H)-он – метрездіазенон був синтезований

у нашій лабораторії. Елементальний аналіз метрездіазенону проводили в аналітичній лабораторії Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ [15]. Для відбору біологічного матеріалу (жовчі) дослідних тварин наркотизували тіопенталом натрію («Київмедпрепарат, Україна»). Дослідження проводили в гострому експерименті на 60 самцях щурів материнської лінії Вістар, отриманих з Інституту фармакології і токсикології АМН України. Маса тварин була 300–350 г, вік – 14 тиж. Протягом експериментального періоду тварини перебували в стандартних умовах: за вологості середовища 60%, з контрольованою температурою  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 12-годинним циклом світло / темрява, вільним доступом до водопровідної води та комерційних продуктів харчування. На початку експерименту тварин випадковим чином розподілили на шість дослідних груп (по 10 тварин у кожній): 1-ша – контрольна – тварини, які отримували рафіновану соняшникову олію (1 мл/кг); тваринам 2-ї групи вводили лише ротенон (2 мг/кг); 3-ї – ротенон і 1%-й розчин диметилсульфоксиду (1 мл/кг); щурам 4, 5 і 6-ї груп – після курсу введення ротенону робили ін'єкції метрездіазенону в дозі 1, 2 і 4 мг/кг відповідно. Ротенон як ліпофільну сполуку суспендували в рафінованій соняшниковій олії безпосередньо перед використанням і вводили інтраперитоніально, 1 раз за добу, в дозі 2 мг/кг [16]. Процедура введення тривала впродовж 4 тиж, проводили її в один і той самий час: з 10:00. Після завершення 28-денного терміну введення ротенону припиняли, натомість починали давати щурам дослідний препарат метрездіазенон. Термін уведення сягав 28 днів. Суспензію метрездіазенону в 1%-му розчині диметилсульфоксиду готували в день експерименту, безпосередньо перед використанням, і вводили одноразовими внутрішньоочеревинними ін'єкціями. Доза препарату була визначена на основі найнижчої дози інших нейропротекторних препаратів,

які виявилися ефективними.

*Локомоторна активність та орієнтовно-дослідницька поведінка.* Для оцінки спонтанної активності щурів використовували тест «відкритого поля». Через 28 днів після лікування щурів поміщали у квадратну коробку відкритого поля (100 см завдовжки, 100 см завширшки та 40 см заввишки), де досліджувана зона була поділена на квадрати і добре освітлена. Експеримент проводили в спокійній обстановці. Рухи щурів записували на відео протягом 6 хв: 1 хв надавали для звикання та 5 хв – для аналізу поведінки. Перед тестом внутрішню стінку та нижню поверхню боксу ретельно протирали 70%-м етанолом, щоб усунути сліди присутності інших тварин. Щура поміщали в центр дна коробки і спостерігали за допомогою відеокамери протягом 5 хв за його поведінкою. Під час цього тесту кількісно оцінювали моторний і немоторний параметри, а саме: частоту пересування як показник моторної поведінки (кількість перетинань квадратів, визначену як кількість квадратів, перетнутих чотирма лапами), і частоту вставання на задні лапи як показник орієнтовно-дослідницької активності (кількість разів, коли тварина піднімається принаймні на 2 с на задніх лапах у повітрі або до стін бокса). Потім тварину замінювали на іншу, і експеримент повторювали [11].

*Біохімічні дослідження.* У жовчі визначали концентрацію загальних пігментів (у міліграм процентах). Попередньо щурів анестезували тіопенталом натрію (60 мг/кг), здійснювали лапаротомію та знаходили загальну жовчну протоку, в яку вводили поліетиленову канюлю з приєднаною до неї градуйованою мікропіпеткою. Жовч, зібрану за перші 30 хв, до уваги не брали (період рівноваги для стабілізації швидкості відтоку жовчі). Далі її збирали кожні 10 хв протягом двох 30-хвилинних періодів часу і піддавали хімічній обробці.

*Загальні пігменти жовчі* (білірубін та білівердин) визначали методом тонкошарової

хроматографії [17]. Одержані біопробы зі стабілізуючим водним розчином (містить 5% карбаміду та 0,5% аскорбінової кислоти) адсорбували на обеззоленому фільтрувальному папері за допомогою напіваватоматичних піпеток аліквотами по 20–50 мкл. Екстракцію загальних пігментів проводили однофазною системою комбінації розчинників у співвідношенні: вода–бутанол–ацетон 2:2:7. До об'єму проби суміш розчинників екстрагентів брали у співвідношенні 20:1 і після інтенсивного перемішування центрифугували впродовж 10 хв при 3000 об/хв на центрифугі ОПН-8 (Україна). В екстрагованих пробах після випаровування ацетону утворювалися два чітко сформованих шари рідини з різними відтінками. Так, нижній водний шар мав рожево-червоний відтінок (містить диглюкуронід і сульфат білірубину), а верхній бутаноловий шар забарвлювався в зеленувато-синій колір (включає фракції: некон'югованого білірубину, моноглюкуроніду білірубину, моноглюкуронідмоноглюкозид білірубину, суміш уробіліну і стеркобіліну). Розділяли екстраговані пігменти на хроматографічному папері FN-16 фірми «Fitrak» (Німеччина) та пластинах фірми «Silufol» (Чехія). Хроматограми фарбували модифікованим діазореактивом, який збагачували додаванням мурашиного альдегіду (1 мл). Денситометричну кількісну оцінку похідних білірубину проводили як в ультрафіолетовому діапазоні хвиль, так і у видимій зоні світла з використанням денситометрів ДО-1М (Україна) та Camag-2 (Швейцарія). Калібрувальну криву будували за вільним білірубіном із прямою денситометричною оцінкою в діапазоні прямопропорційної залежності між вмістом білірубину та екстинкцією і відповідною площею піка, що відповідає інтервалу від 5 до 25 мкг за максимального поглинання світла плямою ( $\lambda = 450$  нм).

*Експериментальні результати обробляли методами варіаційної статистики із вико-*

*ристанням програми Statistica 12. Їхню перевірку на приналежність до нормально розподілених генеральних сукупностей здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок, які відповідали нормальному розподілу і мали гомогенні дисперсії, використовували однофакторний дисперсійний аналіз із апостеріорним порівнянням середніх тестом Тьюкі; достовірними вважали результати при  $P < 0,05$ . Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами вибірок частоти вставання на задні лапи і кількістю перетнутих квадратів використовували непараметричний дисперсійний аналіз Крускала-Уолліса, із апостеріорним тестом Данна з поправкою Бонферроні (із використанням критичного рівня  $\alpha$ , який сягав 0,0033). Результати представлені як середнє арифметичне  $\pm$  стандартна похибка середнього або медіана (нижній кuartиль; верхній кuartиль),  $n$  – кількість дослідів.*

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

*Тест “відкритого поля”.* У щурів 2-ї групи, яким вводили лише ротенон, спостерігали істотну зміну рухових навичок і ослаблену пошукову поведінку. Зокрема, контрольні щури здійснювали на задні лапи  $16,1 \pm 0,8$  раз за 5 хв, тоді як тварини 2-ї групи – лише  $5,3 \pm 0,7$  раз, що на 67% менше ( $P < 0,0001$ ). У 3-й групі цей показник був менший, ніж у контролі, на 42,2% ( $P < 0,001$ ), але на 43% ( $P < 0,001$ ) більший, ніж у 2-й групі. У групах 4, 5 і 6 результати не відрізнялися від контролю, проте були вірогідно більшими, ніж у 2-й та 3-й групі на 61,6; 60,8; 57,65 та 32,6; 31,1; 25,6% відповідно. Кількість перетнутих щурами квадратів у контрольній групі сягала  $42,4 \pm 1,1$ . Уведення ротенону значно ослаблювало рухову активність дослідних тварин щодо контролю, тому в 2-й групі цей показник зменшився до  $6,8 \pm 0,4$  квадратів (на 84%,  $P < 0,0001$ ). У

3-й групі кількість перетнутих квадратів щодо контролю була меншою вже на 32% ( $P < 0,001$ ), але на 76,4% більшою щодо значень 2-ї групи ( $P < 0,0001$ ). У 4, 5 та 6-й групах, де щурів із ПС лікували різними дозами метрездіазенону, показники не відрізнялися від норми, проте між цими групами та щурами з ПС, які не одержували препарату (3-тя група), вірогідна різниця між значеннями сягала 23; 22,6; 23,2% відповідно (табл. 1; 2). Наші результати узгоджуються з даними інших авторів, які показали зміну рухових навичок і ослаблену пошукову поведінку у щурів, що одержували ін'єкції ротенону [18], а покращення під впливом метрездіазенону зазначених вище форм поведінки у тварин з ПС свідчить про наявність у препараті певних захисних властивостей щодо нейродегенеративних процесів, викликаних ротеноном. Як було показано Fonseca-Fonseca та співавт. [11], препарати, створені на основі бензодіазепінів, мають свій, особливий механізм захисту нейронів, уражених ротеноном, який полягає в антиоксидантній дії та протидії дисфункції мітохондрій, тобто в покращенні енергетичного статусу. Окрім цього, Mendes та співавт. [19] на ротеноновій моделі ПС у щурів виявили, що у клітинах скелетних м'язів порушується функціональна активність мітохондріальних комплексів I та II разом із невеликими змінами активності ліпідами, що не може не впливати на їхню рухову функцію (див. табл. 1; 2).

Біохімічний аналіз жовчі щурів виявив кількісні зміни жовчних пігментів, пов'язані з розвитком ПС. Зокрема, у щурів контрольної групи концентрація пігментів у жовчі відповідала  $38,6 \pm 1,1$  мг%, тоді як у тварин 2-ї групи цей показник сягав  $26,8 \pm 1,1$  мг%, що на 30,6% менше ( $P < 0,0001$ ). Вміст пігментів залишався достовірно меншим щодо контролю у щурів 3-ї та 4-ї груп на 22,3 та 15% відповідно. При введенні метрездіазенону в дозі 2 мг/кг концентрація жовчних пігментів відповідала значенням контролю, а при 4 мг/кг – перевищувала його на 12,7%. Концентрація жовчних пігментів у 4, 5 і 6-й групах перевищувала таку у групі, якій вводили ротенон, на 22,4, 56,7 та 62,3% відповідно, вірогідне перевищення відмічали лише в 5-й і 6-й групах, і воно сягало 49,5 і 54,8% відповідно. Більше того, в 5-й і 6-й групах вміст пігментів перевищував значення в 4-й групі на 28 і 32,6% відповідно. Між значеннями у тварин 5-ї і 6-ї груп вірогідної різниці не спостерігали (рисунк).

Печінка відіграє ключову роль у метаболізмі та розподілі гему та його первинного продукту розпаду – білірубіну. У гепатоцитах функціонують дві ферментні системи, які відповідають за ці перетворення. Перший фермент – гемоксигеназа – важливий, оскільки він регулює окиснювальний баланс, у тому числі й в ДА-нейронах, які піддаються впливу окисного стресу і через це можуть втрачати свою функцію [9]. Вище вже згаду-

Таблиця 1. Зміна частоти вставання на задні лапи у щурів з паркінсонічним синдромом, індукованим ротеноном, до і після введення метрездіазенону (тест відкритого поля), ( $M \pm SE$ ;  $n = 10$ )

| Схема досліджу                   | Частота вставання на задні лапи |
|----------------------------------|---------------------------------|
| Контроль                         | $16,1 \pm 0,8$                  |
| Ротенон                          | $5,3 \pm 0,7^{****}$            |
| Ротенон і 1%-й диметилсульфоксид | $9,3 \pm 0,4^{***}$             |
| Ротенон і метрездіазенон         |                                 |
| 1 мг/кг                          | $13,8 \pm 0,4$                  |
| 2 мг/кг                          | $13,5 \pm 0,4$                  |
| 4 мг/кг                          | $12,5 \pm 0,3$                  |

Примітка:  $***P < 0,001$ ,  $****P < 0,0001$  порівняно з контрольними щурами.

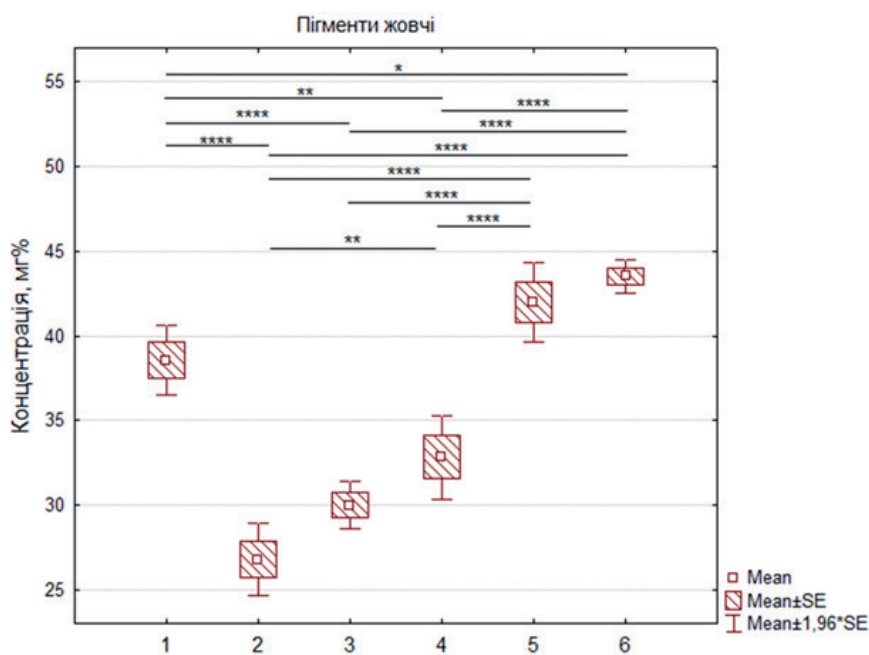
**Таблиця 2. Кількість квадратів, перетнутих щурами з паркінсонічним синдромом, індукованим ротеноном, до і після введення метрездіазенону (тест відкритого поля), ( $M \pm SE$ ;  $n = 10$ )**

| Схема досліджу                   | Кількість локомоцій |
|----------------------------------|---------------------|
| Контроль                         | 42,4 $\pm$ 1,1      |
| Ротенон                          | 6,8 $\pm$ 0,4****   |
| Ротенон і 1%-й диметилсульфоксид | 28,8 $\pm$ 1,1***   |
| Ротенон і метрездіазенон         |                     |
| 1 мг/кг                          | 37,4 $\pm$ 1,3      |
| 2 мг/кг                          | 37,2 $\pm$ 1,0      |
| 4 мг/кг                          | 37,5 $\pm$ 1,0      |

Примітка:  $M \pm SEM$ ;  $n = 10$ ; \*\*\* $P < 0,001$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$  порівняно з контрольними щурами.

валосся, що окисний стрес та нейрозапалення відіграють ключову роль в етіопатології ХП. Фізіологічна роль гемоксигенази полягає в перетворенні молекули гему на монооксид вуглецю, залізо та білівердин/білірубін. Білірубін вважається потужним природним антиоксидантом, який підвищує активність гемоксигенази, і його концентрація в сироватці крові розглядається як можливий маркер активності цієї молекули (її ізоформи 1) [20]. Після руйнування старих еритроцитів

гемовий залишок гемоглобіну розщеплюється до білівердину ферментом гемоксигеназою, і згодом він відновлюється до білірубину іншим ферментом – білівердинредуктазою. Цей процес є зворотним і окиснення білірубину знову призводить до утворення білівердину. Непрямий (некон'югований) білірубін циркулює в плазмі, міцно зв'язаний з альбуміном, звідки він і поглинається клітинами печінки (хімічні сполуки, які мають слабкі зв'язки з альбумінами, вида-



Ефекти метрездіазенону на вміст пігментів у жовчі щурів з паркінсонічним синдромом, викликаним ротеноном. 1 – контроль, 2 – ротенон, 3 – ротенон і 1%-й ДМСО, 4, 5, 6 – ротенон і метрездіазенон у концентраціях 1, 2, 4 мг/кг відповідно.

\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\*\* $P < 0,0001$  щодо значень контрольної групи;  $M \pm SE$ ;  $n = 10$

ляються із сечею через нирки без серйозних метаболічних перетворень). У печінці незв'язаний білірубін кон'югується з глюкуроноювою кислотою і в такому вигляді виводиться з жовчю в кишечник. Концентрації пігментів у жовчі в 40 разів більші, ніж у плазмі крові. При деяких захворюваннях печінки виділення жовчі порушується, а вміст білірубину в крові підвищується. Тому цей пігмент вважається маркером функції печінки [21]. Роль метаболітів гемоглобіну при ХП досі мало вивчена, а наявні дані досліджень є суперечливими. Одні автори вказують на те, що концентрація загального білірубину вища у хворих на ХП [22], інші демонструють протилежний результат [23]. Білірубін раніше вважався потенційно небезпечним продуктом життєдіяльності, проте наразі стає все більш очевидним, що ця молекула є важливим модулятором різних біологічних функцій в організмі людини: від передачі сигналів клітинам (поводиться майже як «справжня» гормональна речовина), модуляції метаболізму і до імунної регуляції, впливаючи на біологічну активність з очевидними клінічними та навіть терапевтичними наслідками. Вважають, що помірне підвищення концентрації некон'югованого білірубину в сироватці крові може слугувати важливим захисним фактором проти таких хвороб цивілізації, як серцево-судинні розлади, артеріальна гіпертензія, діабет, метаболічний синдром, деякі види раку, аутоімунні та нейродегенеративні патології [24]. Як антиоксидантна молекула, білірубін може захищати ДА-нейрони від наслідків окисного стресу поглинанням вільних радикалів [25]. Крім цього, у моделі ХП *in vitro* він запобігає загибелі ДА-клітин, впливаючи на фактор некрозу пухлини  $\alpha$  через його протизапальні властивості [26]. Було також встановлено, що вираженість моторних симптомів ХП негативно пов'язана зі вмістом білірубину в крові. Водночас низький вміст білірубину (нижче від фізіологічного діапазону

0,4–1 мг/дл) спостерігався на фоні неврологічних станів, тобто, можна припустити, що цей пігмент є фактором ризику або маркером захворювань ЦНС [27]. Нами встановлено, що у щурів при модельованому ротеноном ПС, вміст жовчних пігментів зменшувався на 30,6%, а наш новий препарат метрездіазенон у дозі 1 мг/кг відновлював його до 85%. Без застосування препарату (3-тя група) концентрація пігментів у жовчі за той самий період часу відновлювалася повільніше – до 72,8 % від норми. З іншого боку, доза метрездіазенону 4 мг/кг викликала легку гіпербілірубінемію, що може відігравати захисну роль при нейродегенерації. В наших попередніх працях показано, що у щурів з ПС, викликаним дією ротенону, на 38% зменшувався синтез АТФ у печінці, а інший наш препарат – метаніндіазенон, який теж був створений на базі бензодіазепіну, нормалізував цей процес [13]. Ми припускаємо, що в цій роботі до зменшення вмісту пігментів жовчі у дослідних щурів міг призвести збій у роботі ферментних системи у клітинах печінки, які відповідають за перетворення гему, спричинений зменшенням енергетичного статусу гепатоцитів, а метрездіазенон через покращення синтезу АТФ зміг нормалізувати метаболічні процеси, пов'язані з перетворенням гемоглобіну. Кажучи про користь для організму легкої білірубінемії слід пам'ятати, що занадто високий вміст білірубину в крові має негативні наслідки для здоров'я, зокрема й для мозку [28].

## ВИСНОВКИ

При ПС, індукованому ротеноном, суттєво порушується як локомоторна, так і орієнтувальна поведінка дослідних щурів. За цих умов істотно зменшується вміст пігментів у жовчі, що свідчить про погіршення функціональних спроможностей печінки. Метрездіазенон поліпшує як моторну, так і немоторну поведінку щурів, суттєво змінені на тлі ПС: у дозі 1 мг/кг він відновлював вміст

пігментів у жовчі до 85%, в дозі 2 мг/кг – до 100% і при 4 мг/кг – викликав незначне, проте вірогідне, підвищення концентрації жовчних пігментів. Без застосування препарату показники, які ми вивчали, відновлювалися значно повільніше. За умов ХП такі результати дії препарату можуть мати терапевтичні ефекти, які покращуватимуть стан пацієнтів. Краще розуміння механізмів функціонування органів травлення при ХП допоможе започаткувати нові діагностичні та терапевтичні підходи.

*Робота виконана в рамках НДР кафедри органічної хімії хімічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка на тему “Природні біомолекули та їх аналоги – основа для створення молекулярних ансамблів для вирішення проблем хімії, медицини та агрохімії” (2022–2024).*

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**L.Ya. Shtanova<sup>1</sup>, S.P. Veselsky<sup>1</sup>, P.I. Yanchuk<sup>1</sup>, R.A. Rozhnova<sup>2</sup>, V.S. Moskvina<sup>1</sup>, O.V. Shablykina<sup>1</sup>, E.M. Reshetnik<sup>1</sup>, O.V. Kravchenko<sup>3</sup>, V.P. Khilya<sup>1</sup>**

# **BENZODIAZEPINE DERIVATIVE – METRESDIAZENONE ELIMINATES BEHAVIORAL DISORDERS AND NORMALISES BILE PIGMENT CONTENT IN RATS WITH PARKINSONIAN SYNDROME**

<sup>1</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv;

<sup>2</sup>Institute of Macromolecular Chemistry of the NAS of Ukraine, Kyiv;

<sup>3</sup>O.O. Bogomolets National Medical University, Kyiv; e-mail: shtanova@ukr.net

Parkinson's disease (PD) is associated not only with neurological problems, but also with significant changes in peripheral organs and peripheral metabolism. This study aimed to investigate the locomotor and exploratory behavior as well as bile

pigment content in rats subjected to a rotenone-induced model of parkinsonian syndrome (PS), and to evaluate the effect of a novel benzodiazepine derivative, metresdiazene, on these parameters. Motor and exploratory activity was assessed using the “open field” test, while bile pigment levels were determined through thin-layer chromatography. Metresdiazene administration at a dose of 1 mg/kg restored bile pigment content to 85% of control levels. At a dose of 2 mg/kg, the content of bile pigments reached control values, and at 4 mg/kg, it exceeded this indicator by 12.7%. In the absence of treatment, the concentration of pigments was significantly lower than in the control. In PS model rats, both locomotor and exploratory behavior were markedly reduced, with a 67% decrease in the frequency of rearing and an 84% reduction in the number of squares crossed in the open field test. Metresdiazene significantly improved motor activity. Thus, with 1, 2, and 4 mg/kg doses, both the frequency of rearing and the number of crossed squares in the respective groups did not differ from the control levels, whereas without application of metresdiazene the indicators were not fully restored. These findings suggest that metresdiazene, across all tested doses, significantly enhances both bile pigment content and behavior in rats with a rotenone-induced model of PS.

**Key words:** rotenone; parkinsonian syndrome; metresdiazene; locomotor behavior; exploratory behavior; bile; bile pigments.

## **REFERENCES**

1. Deliz JR, Tanner CM, Gonzalez-Latapi P. Epidemiology of Parkinson's disease: An update. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2024;24(6):163-79. doi: 10.1007/s11910-024-01339-w.
2. Ramalho Leite Silva Ana Beatriz, Roger Wilson Gonçalves de Oliveira, Guilherme Pinheiro Diógenes, Marina Feitosa de Castro Aguiar, Camilla Costa Sallem, Micael Porto Portela Lima. Premotor, nonmotor and motor symptoms of Parkinson's Disease: A new clinical state of the art. *Ageing Res Rev.* 2023;84:101834. doi: 10.1016/j.arr.2022.101834.
3. Lintel H, Corpuz T, Paracha S-Ur-R, Grossberg GT. Mood disorders and anxiety in Parkinson's disease: Current concepts. *J Geriatr Psychiatr Neurol.* 2021;34(4):280-88. doi: 10.1177/08919887211018267.
4. Higinbotham AS, Kilbane CW. The gastrointestinal tract and Parkinson's disease. *Front Cell Infect Microbiol.* 2024;15:13:1158986. doi: 10.3389/fcimb.2023.1158986.
5. Bonaz B. The gut-brain axis in Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris).* 2024;180(1-2):65-78. doi: 10.3389/fcimb.2023.1158986.
6. Wang X, Liang T, Mao Y, Li Z, Li X, Zhu X. Nervonic acid improves liver inflammation in a mouse model of Parkinson's disease by inhibiting proinflammatory signaling pathways and regulating metabolic pathways. *Phytomedicine.* 2023;117:154911. doi: 10.1016/j.phymed.2023.154911.

7. Morris HR, Spillantini MG, Sue Carolyn M, Williams-Gray CH. The pathogenesis of Parkinson's disease. *Lancet*. 2024;403(10423):293-304. doi: 10.1016/S0140-6736(23)01478-2.
8. Chia SJ, Tan E-K, Chao Y-X. Historical perspective: Models of Parkinson's disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7):2464. doi: 10.3390/ijms21072464.
9. Jayanti S, Verde CD, Tiribelli C, Gazzin S. Int. Inflammation, dopaminergic brain and bilirubin. *J Mol Sci*. 2023;24(14):11478. *Int J Mol Sci*. 2023;24(14):11478. doi: 10.3390/ijms241411478.
10. Jayanti S, Vitek L, Verde CD, Llido JP, Sukowati C, Tiribelli C, Gazzin S. Role of natural compounds modulating heme catabolic pathway in gut, liver, cardiovascular, and brain diseases. *Biomolecules*. 2024;14(1):63. doi: 10.3390/biom14010063.
11. Fonseca-Fonseca L, Wong-Guerra M, Ramírez-Sánchez J, Montano-Peguero Y, Padrón Yaqueis A, Rodríguez A, da Silva V, Costa S, Pardo-Andreu Y. JM-20, a novel hybrid molecule, protects against rotenone-induced neurotoxicity in experimental model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2019;690:29-35. doi: 10.1016/j.neulet.2018.10.008.
12. de Zárate AO, Pérez-Torralba M, Isidro IB, López C, Claramunt RM, Martínez-Casanova D, Sánchez-Vera I, González JJ and Lavandera JL. 1,5-Benzodiazepin2 (3H)-ones: *In vitro* evaluation as antiparkinsonian agents. *Antioxidants*. 2021;10,1584. doi: 10.3390/antiox10101584.
13. Shtanova LY, Veselsky SP, Yanchuk PI, Tsymbalyuk OV, Moskvina VS, Shablykina OV, Reshetnik EN, Kravchenko OV, Khilya VP. Energy metabolism in the liver of rats with rotenone-induced Parkinsonian syndrome under the influence of methanindiazeneone. *Fiziol Zh*. 2024;70(5):79-87. doi: 10.15407/fz70.05.079
14. Shtanova LY, Veselsky SP, Yanchuk PI, Tsymbalyuk OV, Moroz OF, Reshetnik EN, Moskvina VS, Shablykina OV, Kravchenko OV, Khilya VP. Benzodiazepine derivative methanindiazeneone modulates lipid metabolism in the liver of rats with rotenone-induced Parkinson's syndrome. *Fiziol Zh*. 2023;69(6):77-87. <https://doi.org/10.15407/fz69.06.077>.
15. Shablykina O, Krekhova O, Konovalenko A, Moskvina V, Khilya V. Interaction of 3-pyridyl- and 3-(imidazo[1,2-a]pyridin-2-yl) isocoumarins with hydrazine. *Dopov Nac Akad Nauk Ukr*. 2018;(12):71-8. <http://jnas.nbuv.gov.ua/article/UJRN-0000939597>.
16. Zeng X, Geng W, Jia J. Neurotoxin induced animal models of Parkinson disease: Pathogenic mechanism and assessment. *ASN Neuro*. 2018;10:1759091418777438. doi: 10.1177/1759091418777438.
17. Melnychuk DO, Hryshchenko VA, Veselsky SP. Indicators of exchange of bile pigments under the action of ecopathogenic factors on the organism and correction with liposomes. *Ukr Biochem J*. 2014;86(3):125-32. doi: <http://dx.doi.org/10.15407/ubj86.03.125>.
18. Angeline MS, Chatterjee P, Anand K, Ambasta RK, Kumar P. Rotenone-induced parkinsonism elicits behavioral impairments and differential expression of parkin, heat shock proteins and caspases in the rat. *Neuroscience*. 2012;291-301. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.06.021.
19. Mendes D, Peixoto F, Oliveira MM, Andrade PB, Videira RA. Mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of rotenone-induced rat model of Parkinson's Disease: SC-nanophytosomes as therapeutic approach. *Int J Mol Sci*. 2023;24(23):16787. doi: 10.3390/ijms242316787.
20. McCarty MF. Serum bilirubin may serve as a marker for increased heme oxygenase activity and inducibility in tissues – a rationale for the versatile health protection associated with elevated plasma bilirubin. *Med Hypothes*. 2013;81:607-10. doi: 10.1016/j.mehy.2013.07.013.
21. Mironczuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci*. 2018; 63 (1): 68-78. doi: 10.1016/j.advms.2017.05.005.
22. Macías-García D, Méndez-Del Barrio C, Jesús S, Labrador MA, Adames-Gómez A, Vargas-González L, Carrillo F, Gómez-Garre P, Mir P. Increased bilirubin levels in Parkinson's disease. *Parkinson Relat Dis*. 2019;63:213-16. doi: 10.1016/j.parkreldis.2019.01.012.
23. Songsomboona C, Tanprawate S, Soontornpunc A, Wantaneeawong C, Louthrenoo W. Serum uric acid, serum uric acid to serum creatinine ratio and serum bilirubin in patients with Parkinson's disease: A case-control study. *J Clin Med Res*. 2020;12(3):172-79. doi: 10.14740/jocmr4079.
24. Vitek L, Tiribelli C. Bilirubin: The yellow hormone? *J Hepatol*. 2021;75(6):1485-90. doi: 10.1016/j.jhep.2021.06.010.
25. Schipper HM, Liberman A, Stopa EG. Neural heme oxygenase-1 expression in idiopathic Parkinson's disease. *Exp Neurol*. 1998;150(1):60-68. doi: 10.1006/exnr.1997.6752.
26. Jayanti S, Verde DC, Tiribelli C, Gazzin S. Inflammation, dopaminergic brain and bilirubin. *Int J Mol Sci*. 2023;24(14):11478. doi: 10.3390/ijms241411478.
27. Kazemi D, Hajishah H, Chadeganipour AS. Association of total Bilirubin with motor signs in early Parkinson's disease in LRRK2 variant carriers. *J Mol Neurosci*. 2022;72(11):2338-44. doi: 10.1007/s12031-022-02067-x.
28. Riordan SM, Shapiro SM. Review of bilirubin neurotoxicity I: molecular biology and neuropathology of disease. *Pediatr Res*. 2020;87(2):327-31. doi: 10.1038/s41390-019-0608-0.

Матеріал надійшов  
до редакції 15.02.2025