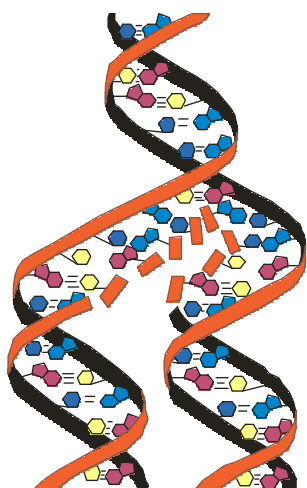


*Академія медичних наук України  
Тернопільська державна медична академія ім. І.Я. Горбачевського  
Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця  
Українська Академія наук національного прогресу*

# МЕДИЧНА ХІМІЯ

**НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ**



*Academy of Medical Sciences of Ukraine  
Ternopil State Medical Academy by I.Ya. Horbachevsky  
National Medical University by O.O. Bogomolets  
Ukrainian Academy of Sciences of National Progress*

# MEDICAL CHEMISTRY

**SCIENTIFIC JOURNAL**

**4** TOM 5  
2003

- ❖ *Молекулярні механізми розвитку патології*
- ❖ *Біохімія у діагностиці та лікуванні*
- ❖ *Біохімія серцево-судинних хвороб*
- ❖ *Біохімічна гепатологія та нефрологія*
- ❖ *Біохімія ендокринних хвороб*
- ❖ *Патохімія спадкових хвороб*
- ❖ *Патохімія екстремальних станів*
- ❖ *Біохімія в хірургічній клініці*
- ❖ *Нейрохімія та патохімія головного мозку*
- ❖ *Імунохімія*
- ❖ *Біохімія радіаційних уражень*
- ❖ *Біохімічні аспекти моделювання патологічних процесів*
- ❖ *Ксенобіохімія*
- ❖ *Методи біохімічних досліджень*
- ❖ *Історія біохімії*
- ❖ *Проблеми і досвід викладання біологічної та медичної хімії*
- ❖ *Інформація, хроніка, ювілеї*
  
- ❖ *Molecular Mechanisms of Pathology Development*
- ❖ *Biochemistry in Diagnostics and Treatment*
- ❖ *Biochemistry of Cardiovascular Diseases*
- ❖ *Biochemical Hepatology and Nephrology*
- ❖ *Biochemistry of Endocrinopathy*
- ❖ *Pathochemistry of Hereditary Diseases*
- ❖ *Pathochemistry of Extremal States*
- ❖ *Biochemistry in Surgical Clinics*
- ❖ *Neurochemistry and Pathochemistry of Cerebrum*
- ❖ *Immunochemistry*
- ❖ *Biochemistry of Radiation Injuries*
- ❖ *Biochemical Aspects of Simulation of Pathologic Processes*
- ❖ *Xenobiochemistry*
- ❖ *Methods of Biochemical Investigations*
- ❖ *History of Biochemistry*
- ❖ *Problems and Experience of Biological and Medical Chemistry Teaching*
- ❖ *Information, Chronicle, Jubilees*

## МЕДИЧНА ХІМІЯ

Науковий журнал

## MEDICAL CHEMISTRY

Scientific Journal

ISSN 1681-2557

Виходить з 1999 року  
Published since 1999

Свідоцтво про державну реєстрацію: серія КВ № 3647  
Certificate of state registration: series KB № 3647

Передплатний індекс: 22869  
Subscription index: 22869

Відповідно до постанови Президії ВАК України № 1-05/7 від 09.06.1999 р. журнал "Медична хімія" внесений до переліку фахових видань, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата медичних, фармацевтичних і біологічних наук.

Журнал "Медична хімія" акредитований науково-видавничою радою Президії АМН України (лист № 02-17/1341 від 25.10.2001 р.).

**АДРЕСА РЕДАКЦІЇ:**  
Журнал "Медична хімія"  
Видавництво "Укрмедкнига"  
Майдан Волі, 1  
46001, м. Тернопіль  
УКРАЇНА

**EDITORIAL OFFICE ADDRESS:**  
Journal "Medical Chemistry"  
Publishing House "Ukrmedknyga"  
Maidan Voli, 1  
46001, Ternopil  
UKRAINE

Tel.: (0352) 22-97-29  
(0352) 25-47-84  
Fax: (0352) 22-41-83  
E-mail: [korda@tdma.edu.te.ua](mailto:korda@tdma.edu.te.ua)  
<http://tdma.edu.te.ua>

За зміст рекламних матеріалів відповідальність несе рекламодавець. При передруці або відтворенні повністю чи частково матеріалів журналу "Медична хімія" посилання на журнал обов'язкове.

© Науковий журнал "Медична хімія"  
© Scientific Journal "Medical Chemistry"

## Зміст

## Contents

### ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

- Донченко Г.В., Мхітарян Л.С., Кузьменко І.В., Кучменко О.Б., Звайд Ф.Р. (Київ) ВПЛИВ  $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛУ І ЙОГО КОРОТКОЛАНЦЮГОВОЇ ПОХІДНОЇ НА ОРГАНІЗМ ЗА УМОВ ДІЇ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ РІЗНОЇ ПРИРОДИ 5
- Радченко В.В., Кухарчук О.Л. (Київ) ВПЛИВ ЕМБРІОНАЛЬНИХ ПЛЮРИПОТЕНТНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ПРОТЕОЛІЗУ В ТКАНИНАХ АОРТИ СТАРИХ ЩУРІВ 11
- Висоцький І.Ю., Комаревцева І.О., Качанова А.А., Висоцький В.І., Калікін К.Г., Гречишкіна Т.П. (Суми, Луганськ, Київ) ЗАСТОСУВАННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ПРИ ТОКСИЧНОМУ УРАЖЕННІ ПЕЧІНКИ ЛЕТКИМИ КОМПОНЕНТАМИ ЕПОКСИДНОЇ СМОЛИ ЕД-20 16
- Ерстенюк Г.М. (Івано-Франківськ) ДИНАМІКА ЗМІН ОКСИГЕМОГЛОБІНУ В ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ ХЛОРИДУ КАДМІЮ 23
- Білоус І.І., Мещишен І.Ф. (Чернівці) ВПЛИВ МІЛДРОНАТУ ТА ТІОТРИАЗОЛІНУ НА ВМІСТ ОКИСНЮВАЛЬНОМОДИФІКОВАНИХ БІЛКІВ ТА МАЛОНОВОГО ДІАЛЬДЕГІДУ В КОМПЛЕКСНОМУ ЛІКУВАННІ ДІАБЕТИЧНОЇ ПОЛІНЕЙРОПАТІЇ 26
- Зупанець І.А., Туляков В.О. (Харків) СТИМУЛЮВАННЯ МЕТАБОЛІЗМУ ГЛІКОЗАМІНОГЛІКАНІВ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ В УМОВАХ ДИСТРОФІЇ КОМПОЗИЦІЄЮ ГЛЮКОЗАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ З ПАРАЦЕТАМОЛОМ 31
- Ступницька Г.Я. (Чернівці) ВПЛИВ КОМПЛЕКСНОГО ЛІКУВАННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ ІНГАЛЯЦІЙ ЛІПІНУ НА ПРОТЕОЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ КОНДЕНСАТУ ВИДИХУВАНОВОГО ПОВІТРЯ І ФУНКЦІЮ ЗОВНІШНЬОГО ДИХАННЯ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ОБСТРУКТИВНИЙ БРОНХІТ 35
- Фальфушинська Г.І., Демків І.Я., Столяр О.Б., Флекей П.П. (Тернопіль) АНАЛІЗ МЕТАЛОЗВ'ЯЗУВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ ЗА ЇХ УФ-СПЕКТРАМИ 39
- Носач О.В. (Київ) ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕСІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ХВОРИХ З РІЗНИМ ВМІСТОМ ТБК-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ У КРОВІ 42
- Качула С.О. (Вінниця) ВПЛИВ АЦЕТОНУ, ФЕНОБАРБІТАЛУ ТА ПРЕПАРАТУ "INOD'AIL" НА ТОКСИЧНІСТЬ БРОМБЕНЗОЛУ І ТЕТРАХЛОРМЕТАНУ ТА БІОТРАНСФОРМАЦІЮ БРОМБЕНЗОЛУ В ЩУРІВ 46
- Маковійчук А.А., Мещишен І.Ф. (Чернівці) ВПЛИВ ЛІНЕКСУ ТА БІОСПОРИНУ НА ПРО- ТА АНТИОКСИДНИЙ СТАН КРОВІ ТА ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ГІПОТИРЕОЗУ 51
- Тихомиров А.О., Недзвєцький В.С., Корякіна Ж.О., Неруш П.О. (Дніпропетровськ) ВПЛИВ МАЛОЇ ДОЗИ АЦЕТАТУ СВИНЦЮ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЛІАЛЬНОГО ФІБРІЛЯРНОГО КИСЛОГО БІЛКА В МОЗКУ ЩУРІВ У РАННІЙ ПОСТНАТАЛЬНИЙ ПЕРІОД 55

### ORIGINAL INVESTIGATIONS

- Donchenko G.V., Mkhitarjan L.S., Kuzmenko I.V., Kuchmenko O.B., Zwaid F.R. (Kyiv) THE INFLUENCE OF  $\alpha$ -TOCOPHEROL AND ITS SHORT-CHAIN DERIVATIVE ON THE ORGANISM UNDER THE ACTION OF STRESS FACTORS OF DIFFERENT ORIGIN 5
- Radchenko V.V., Kukharchuk O.L. (Kyiv) INFLUENCE OF EMBRYONIC PLURIPOTENT PROGENITOR CELLS ON THE INTENSIVNESS OF PROTEOLYSIS IN AORTA TISSUES OF OLD RATS 11
- Vysotsky I.Yu., Komarevtseva I.O., Kachanova A.A., Vysotsky V.I., Kalikin K.G., Grechyshkina T.P. (Sumy, Luhansk, Kuiv) USING OF MEDICINES AT THE TOXIC DAMAGE OF LIVER BY THE FLYING COMPOUNDS OF THE EPOXYDE RESINE ED-20 16
- Ersteniuk H.M. (Ivano-Frankivsk) THE DYNAMICS OF OXYHEMOGLOBIN CHANGES IN RATS AFTER CADMIUM CHLORIDE INJECTION 23
- Bilous I.I., Meshchishen I.F. (Chernivtsi) THE INFLUENCE OF MILDRONAT AND TIOTRIAZOLIN ON THE CONTENTS OF OXIDATIVE MODIFIED PROTEINS AND MALON DIALDEHYDE IN COMPLEX TREATMENT OF DIABETIC POLYNEUROPATHY 26
- Zupanets I.A., Tuliakov V.O. (Kharkiv) COMBINATION OF GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE WITH PARACETAMOL STIMULATES THE CONNECTIVE TISSUE GLYCOSAMINOGLYCANS METABOLISM IN DYSTROPHY CONDITION 31
- Stupnytska G.Y. (Chernivtsi) THE INFLUENCE OF COMPLEX TREATMENT WITH THE USE OF LIPIN INHALATION UPON PROTEOLYTIC ACTIVITY OF EXHALED AIR CONDENSATE AND FUNCTION OF EXTERNAL BREATHING IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE BRONCHITIS 35
- Falfushynska H.I., Demkiv I.Ya., Stolyar O.B., Phlekey P.P. (Ternopil) ANALYSIS OF METAL-BINDING CAPACITY OF METALLOTHIONEINS BY THEIR UV-SPECTRA 39
- Nosach O.V. (Kyiv) THE CHARACTERISTIC OF LIPID PEROXIDATION PROCESSES IN PATIENTS WITH DIFFERENT CONTENTS OF TBA-ACTIVE SUBSTANCES IN BLOOD 42
- Kachula S.O. (Vinnytsia) THE EFFECT OF ACETONE, PHENOBARBITAL AND DRUG INOD'AIL ON THE TOXICITY OF BROMBENZENE AND TETRACHLORMETHANE AND BIOTRANSFORMATION OF BROMBENZENE IN RATS 46
- Makoviychuk A.A., Meschyshen I.F. (Chernivtsi) LINEX AND BIOSPORIN INFLUENCE UPON THE PRO- AND ANTIOXIDANT BLOOD CONDITION ANDASTRO-INTESTINAL TRACT OF RATS AT HYPOTHYROIDISM 51
- Tykhomyrov A.O., Nedzvetsky V.S., Koryakina Zh.O., Nerush P.O. (Dnipropetrovsk) RAT BRAIN GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN EXPRESSION IN THE EARLY POSTNATAL PERIOD FOLLOWING LOW-LEVEL LEAD ACETATE EXPOSURE 55

<i>Зупанець І.А., Леонтєєва Ф.С., Туляков В.О., Тимошенко О.П., Хвисьюк О.М. (Харків)</i> ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЧНОГО СТАТУСУ ХВОРИХ ІЗ СИНДРОМОМ "HIP-SPINE"	60	<i>Zupanets I.A., Leontjeva F.S., Tuliakov V.O., Tymoshenko O.P., Khvysjuk O.M. (Kharkiv)</i> THE METABOLIC STATUS FEATURES OF PATIENTS WITH "HIP-SPINE" SYNDROME
<i>Тржецинський С.Д., Колесник Ю.М., Дунаєв В.В. (Запоріжжя)</i> ВПЛИВ ХОЛЕЦИСТОКІНІНУ-ТЕТРАПЕПТИДУ НА СТАН ГОРМОНАЛЬНОГО ТА ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ В ДІАБЕТИЧНИХ ТВАРИН	66	<i>Trzhetsynsky S.D., Kolesnyk Y.M., Dunayev V.V. (Zaporizhzhia)</i> CHOLECYSTOKININ-TETRAPEPTIDE INFLUENCE ON STATUS OF HORMONAL AND CARBOHYDRATE METABOLISM IN DIABETIC ANIMALS
<i>Столяр О.Б. (Тернопіль)</i> РОЛЬ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ У ЗВ'ЯЗУВАННІ ЦИНКУ І МІДІ В ТКАНИНАХ КОРОПА ЗА ДІЇ НА ОРГАНІЗМ ЦИНКУ	71	<i>Stolyar O.B. (Ternopil)</i> THE ROLE OF METALLOTHIONEINS IN THE ZINC AND COPPER BINDING IN CARP TISSUES UNDER THE ZINC EFFECT ON THE ORGANISM
<i>Тєфтіюєва Н.Б., Мєщишен І.Ф. (Чернівці)</i> ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА СТАН АНТИОКСИДНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ ТА ДІЇ НАСТОЯНКИ ПЕРСТАЧУ ПРЯМОСТОЯЧОГО	75	<i>Teftiyeva N.B., Meshchishen I.F. (Chernivtsi)</i> LIPID PEROXIDATION AND THE STATE OF ANTIOXIDANT SYSTEM OF RAT BLOOD IN CASE OF TOXIC HEPATITIS UNDER EFFECT OF THE POTENTILLA ERECTA SPIRITUOUS TINCTURE
<b>КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ</b>		<b>BRIEF REPORTS</b>
<i>Філь В.М. (Дрогобич)</i> ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ХОЛЕРИЧНОЇ І УРИКОЗОТРОПНОЇ ДІЇ НОВОГО ОЗДОРОВЧОГО НАПОЮ "ТРУСКАВЕЦЬКА КРИШТАЛЕВА, ЗБАГАЧЕНА АЛОЕ"	80	<i>Fil V.M. (Drohobych)</i> COMPARATIVE INVESTIGATION OF CHOLERETIC AND URICOSOTROPIC EFFECT OF NEW CURATIVE DRINK WATER "TRUSKAVETSKA CRISTALINE, INRICHED WITH ALOE"
<i>Максимов Ю.М., Трінус Ф.П., Аркадьєв В.Г., Ядловський О.Є., Омельяненко З.П., Хоменко В.С., Шатиркіна Т.В. (Київ)</i> ВПЛИВ НЕОПІОЇДНИХ АНАЛЬГЕТИКІВ НА ВТОРИННУ ІМУННУ ВІДПОВІДЬ	83	<i>Maxymov Yu.M., Trinus F.P., Arkadiyev V.G., Yadlovsky O.Ye., Omelianenko Z.P., Khomenko V.S., Shatyrykina T.V. (Kyiv)</i> INFLUENCE OF NONOPIOID ANALGETICS ON THE SECONDARY IMMUNE RESPONSE
<i>Кузів О.І. (Тернопіль)</i> ВПЛИВ ПОВНОГО ГОЛОДУВАННЯ НА ВМІСТ ПРОДУКТІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ І СТАН АНТИОКСИДНОЇ СИСТЕМИ НА ФОНІ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОГО ГЕПАТОЗУ	86	<i>Kuziv O.I. (Ternopil)</i> EFFECT OF COMPLETE FASTING ON CONTENT OF LIPID PEROXIDATION PRODUCTS AND STATE ANTIOXIDANT SYSTEM AGAINST A BACKGROUND OF TETRACHLOROMETHANE HEPATOSIS
<i>Ярцева Л.В., Свєчнікова О.М., Ісаєв С.Г., Бєвз Н.Ю., Шевельова Н.Ю. (Харків)</i> СОЛІ ТА МЕТАЛОКОМПЛЕКСИ НА ОСНОВІ ЗАМІЩЕНИХ 3,5-ДИНІТРО-Н-ФЕНІЛАНТРАНИЛОВИХ КИСЛОТ, ЇХ СИНТЕЗ ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ	90	<i>Yartseva L.V., Sviechnikova O.M., Isayev S.G., Bevz N.Y., Shevelyova N.Y. (Kharkiv)</i> SALTS AND METALLOCOMPLEXES ON THE BASIS OF SUBSTITUTED 3,5-DINITRO-N-PHENYLANTRANYL ACIDS, THEIR SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY
<i>Панасенко О.І. (Запоріжжя)</i> ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ ДЕЯКИХ БЕНЗИЛІДЕНПОХІДНИХ 4-АМІНО- І 3,5-ДИМЕТИЛ-4-АМІНО-1,2,4-ТРИАЗОЛУ	94	<i>Panasenko O.I. (Zaporizhzhia)</i> ACUTE TOXICITY OF SOME BENZILYDEN-DERIVATIVES OF 4-AMINO- AND 3,5-DIMETHYL-4-AMINO-1,2,4-TRIAZOLE
<i>Сирова Г.О. (Харків)</i> ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ РЕНІН-АНГІОТЕНЗИНОВОЇ СИСТЕМИ НА ГОСТРУ ТОКСИЧНІСТЬ АНТИГІПЕРТЕНЗИВНИХ ЗАСОБІВ З РІЗНИМИ МЕХАНІЗМАМИ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ ДІЇ	97	<i>Syrova H.O. (Kharkiv)</i> THE INFLUENCE OF INHIBITORS OF RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM ON ACUTE TOXICITY OF ANTIHYPERTENSIVE MEANS WITH DIFFERENT MECHANISMS OF PHARMACOLOGICAL ACTION
<i>Діка Абдуллах Абдулгані (Львів)</i> КИСНЕВОЗВ'ЯЗУВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ГЕМОГЛОБІНУ ЗА УМОВ ІШЕМІЧНОЇ ХВОРОБИ СЕРЦЯ	101	<i>Dica Abdullakh Abdulgani (Lviv)</i> OXYGEN-BINDING PROPERTIES OF HEMOGLOBIN AT ISCHEMIC HEART DISEASE
<b>МЕТОДИ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>		<b>METHODS OF BIOCHEMICAL INVESTIGATIONS</b>
<i>Ісаєв С.Г., Бризицький О.А., Свєчнікова О.М. (Харків)</i> СИНТЕЗ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ МЕТАЛОКОМПЛЕКСІВ N-ФЕНІЛАНТРАНИЛОВИХ КИСЛОТ	104	<i>Isayev S.G., Bryzitsky O.A., Sviechnikova O.M. (Kharkiv)</i> SYNTHESIS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF METAL COMPLEXES OF N-PHENYLANTHRANILIC ACIDS
<i>Дівоча В.А., Михальчук В.М. (Одеса)</i> ТРИПСИНОПОДІБНІ ПРОТЕАЗИ КРОВІ ЛЮДИНИ – ОСНОВА ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ	108	<i>Divocha B.A., Mykhalchuk V.M. (Odesa)</i> TRIPSIN-SIMILAR PROTEASES OF HUMAN BLOOD SERUM IS THE BASIS FOR OBTAINING ANTI-VIRAL REMEDIES
<b>ОГЛЯДИ</b>		<b>REVIEWS</b>
<i>Гонський Я.І., Максимчук Т.П. (Тернопіль, Івано-Франківськ)</i> БІОХІМІЧНІ АСПЕКТИ ДІЇ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ. І. ВПЛИВ НА МІЖ-І ВНУТРІШНЬОКЛІТИННУ СИГНАЛІЗАЦІЮ	113	<i>Honsky Ya.I., Maksymchuk T.P. (Ternopil, Ivano-Frankivsk)</i> BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE DRUGS ACTION. I. EFFECTS ON INTER- AND INTRACELLULAR SIGNALLING

УДК 577.161.3

ВПЛИВ  $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛУ І ЙОГО КОРОТКОЛАНЦЮГОВОЇ ПОХІДНОЇ НА ОРГАНІЗМ ЗА УМОВ ДІЇ СТРЕСОВИХ ФАКТОРІВ РІЗНОЇ ПРИРОДИГ.В. Донченко<sup>1</sup>, Л.С. Мхітарян<sup>2</sup>, І.В. Кузьменко<sup>1</sup>, О.Б. Кучменко<sup>1</sup>, Ф.Р. Звайд<sup>1</sup>  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ, КИЇВ<sup>1</sup>  
ІНСТИТУТ КАРДІОЛОГІЇ ІМ. М.Д. СТРАЖЕСКА АМН УКРАЇНИ, КИЇВ<sup>2</sup>

На моделях стресу різної етіології було досліджено можливість корекції змін, які виникають за умов впливу на організм стресових факторів, за допомогою вітаміну Е і його коротколанцюгової похідної з С<sub>6</sub> у бічному ланцюзі. Встановлено, що при введенні похідної вітаміну Е в дозах від 5 до 50 мг/кг зростають тривалість життя і виживання тварин, нормалізується ліпідна структура мембран, функціонування Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-АТФази і вільнорадикальні процеси окиснення, забезпечується збереження активності ферментів антиоксидантного захисту і тканинного енергетичного обміну, що свідчить про його антиоксидні властивості і достатньо високі антистресову та адаптогенну дії. Похідна вітаміну Е проявляє більш виражену активність порівняно з  $\alpha$ -токоферолом фармакопейним.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: стрес, вітамін Е, похідна вітаміну Е, адаптоген.

**ВСТУП.** Стрес, або загальний адаптаційний синдром, універсальний стереотипний механізм реакції живої системи на впливи різних, незалежно від природи, екстремальних факторів. Стрес-реакція є важливим компонентом механізму виникнення і розвитку найбільш розповсюджених захворювань людини: атеросклерозу, ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда, гіпертонічної хвороби, аритмій серця, онкологічних, гематологічних патологій та інших, що супроводжуються порушенням рівноваги між про- і антиоксидними системами і розвитком оксидативного стресу [7, 11, 12].

Важливою проблемою є пошук і розробка ефективних засобів профілактики та лікування патологічних станів, що спричинені дією стресових факторів. Відомо, що  $\alpha$ -токоферол є потужним природним жиророзчинним мембранопротектором і біоантиоксидантом, який здатен стабілізувати ліпідний склад мембран. Він ефективно регулює процеси ліпопероксидації та тканинного енергетичного обміну, які порушуються при стресових ситуаціях [5, 13, 19, 20]. В Україні відсутня база для виробництва вихідних продуктів для синтезу  $\alpha$ -токоферолу, а той, що застосовується, випускається з імпоротної сировини і має високу вартість, що економічно не вигідно. Тому пошук нових активних похідних  $\alpha$ -токоферолу та створення

доступних технологій їх виробництва є вельми актуальною проблемою.

Метою даної роботи було дослідження можливості корекції змін, що виникають за умов впливу на організм стресових факторів різної природи, за допомогою вітаміну Е і його коротколанцюгової похідної.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** У роботі використано 4 експериментальні моделі стресових станів. Модель гіпоксичного стресу викликали шляхом "піднімання" білих безпородних щурів віком 28-30 тижнів у барокамері на умовну висоту 11 тис. м (93,33 гПа, 170 мм рт. ст.) зі швидкістю 37,5 м/с [2]. При визначанні строків виживання тварини перебували в барокамері до їх загибелі.  $\alpha$ -ТФА і  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> вводили щурам з розрахунку 20 мг/кг маси тіла внутрішньовенно за 3 год до гіпоксичного стресу. Модель адреналінового ішемічного ураження міокарда викликали у щурів-самців масою 160-180 г шляхом внутрішньом'язового введення 0,4 мл 0,1 % розчину адреналіну гідрохлориду на фізіологічному розчині [14].  $\alpha$ -ТФА і  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> вводили внутрішньом'язово в дозі 50 мг/кг маси тіла тварин 1 раз на день протягом 5 діб. Суть моделі Е-гіповітамінозу полягає в утриманні білих щурів масою 70-80 г на Е-авітамінозному раціоні за методикою Едвіна [21] протягом 2-х місяців. За умов *in vitro*  $\alpha$ -ТФА та  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> вводили безпосередньо в інкубаційне середовище у дозі 25 мкг/мл середовища.

© Г.В. Донченко – д.біол.н., чл.-кор. НАН України, Л.С. Мхітарян – д.мед.н., проф., І.В. Кузьменко – к.біол.н., О.Б. Кучменко – к.біол.н., Ф.Р. Звайд, 2003.

Мітохондрії і гомогенати печінки інкубували протягом 30 і 120 хв відповідно. За умов *in vivo*  $\alpha$ -ТФА та  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> вводили внутрішньовенно за 3 год до забою одноразово у кількості 5 мг/кг маси тіла тварин. Модель експериментальної гіперхолестеринемії викликали шляхом додавання в раціон безпородних кролів масою 2,8-3,0 кг холестерину в дозі 0,5 г/кг маси тіла щоденно протягом 2-х місяців [9].  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> вводили з лікувально-профілактичною метою перорально у вигляді олійного розчину в дозі 5 мг/кг маси тіла, починаючи з 30-го дня від запровадження гіперхолестеринової дієти.

Гомогенат тканини печінки готували із розрахунку 1:9 (маса:об'єм) на 1,2 % розчині КСІ. Мітохондрії виділяли методом диференційного ультрацентрифугування [25]. За зміною активності ферментів дихального ланцюга (NADH-дегідрогенази [26], сукцинат- і NADH-убіхінонредуктази [17]), вмістом убіхінону [6] робили висновок про можливість впливу  $\alpha$ -ТФА і  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> на енергетичний обмін, зокрема на процеси транспорту електронів в дихальному ланцюзі мітохондрій. У печінці визначали вміст вітаміну Е [6] і загальних ліпідів [8].

Фракцію плазматичних мембран кардіоміоцитів отримували за методом [23]. Якість і ступінь чистоти препаратів мембран контролювали на основі визначення активності маркерного ферменту Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-АТФази [3]. Ліпідні екстракти одержували із суспензії мембран хлороформметаноловою сумішшю (у співвідношенні 2:1) за методом [22]. Отримані екстракти використовували для кількісного визначення холестерину (Хс), фосfolіпідів (Фл) з застосуванням біохімічного автоматичного аналізатора "Express-550" (Ciba-Corning, Великобританія) і діагностичних тест-систем, реагентів фірми.

Індуковану хемілюмінесценцію (ІХЛ) реєстрували на хемілюмінометрі ХЛМІЦ-01 за методом [1]. Вміст дієнових кон'югатів (ДК) і малонового діальдегіду (МДА) визначали спектрофотометрично за методами [15, 16], рівень білка – за Лоурі [24], глутатіонредуктазну активність (ГРА) – за методом [10].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили методами варіаційної статистики з використанням програми "Statgrafics". Достовірність різниці двох середніх величин оцінювали за критерієм Стьюдента (t).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Відомо, що гіпоксичний стрес призводить до інтенсифікації процесів вільнорадикального окиснення ліпідів, інгібування процесів тканинного дихання та утворення АТФ, що негативно впливає на всі види обміну і викликає цілий ряд ускладнень [14].

При дослідженні впливу  $\alpha$ -ТФА і  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> на виживання тварин за умов гіпоксичного стресу нами було використано два способи введення для порівняння їх ефективності: внутрішньом'язовий (табл. 1) і внутрішньовенний (табл. 2).

Як видно з представленого матеріалу,  $\alpha$ -ТФА і  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> помітно подовжують термін виживання тварин за умов гіпоксичного стресу. При цьому очевидним є те, що  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> проявляє виражену біологічну активність, що перевищує активність  $\alpha$ -ТФА фармакопейного, і може бути використаним для попередження та профілактики гіпоксичного стресу. Важливо, що для прояву біологічної активності досліджуваних сполук спосіб їх введення не має істотного значення.

Ішемія міокарда, гіпоксія та інтоксикація організму є основними факторами в клінічних проявах стресових ситуацій різноманітного генезу. У зв'язку з цим, використовували комбіновану модель, що викликає ураження міокарда у вигляді тканинної гіпоксії та ішемії після токсичної дії адреналіну з додатковим гіпоксичним впливом. Внаслідок цього розвиваються циркуляторно-тканинна гіпоксія, порушення біоенергетики, кровообігу та ішемія міокарда. У тварин з ішемією (для посилення стресового впливу) через 24 год після введення адреналіну, у період максимальних морфологічних порушень у міокарді [14], додатково викликали гіпоксичний стрес [2]. Нами встановлено, що за даних умов введення  $\alpha$ -ТФА і

Таблиця 1 – Виживання тварин (хв) при гіпоксичному стресі та після внутрішньом'язового введення  $\alpha$ -ТФА і  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> в дозі 20 мг/кг маси тіла тварин (M±m, n=37-56)

Гіпоксичний стрес (контроль)	Після введення	
	$\alpha$ -ТФА	$\alpha$ -ТФА-С <sub>6</sub>
25,1±0,7	33,0±0,9*	35,4±0,8*

Примітка. \* – тут і в наступних таблицях різниця достовірна порівняно з контролем (p≤0,05).

Таблиця 2 – Виживання тварин (хв) при гіпоксичному стресі та після внутрішньовенного введення  $\alpha$ -ТФА і  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> в дозі 20 мг/кг маси тіла тварин (M±m, n=37-56)

Гіпоксичний стрес (контроль)	Після введення	
	$\alpha$ -ТФА	$\alpha$ -ТФА-С <sub>6</sub>
24,0±1,25	35,5±0,81*	38,8±0,86*

$\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> значно подовжує термін виживання піддослідних тварин (табл. 3). При цьому дія  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> перевищує вплив на досліджуваний показник  $\alpha$ -ТФА фармакопейного, у зв'язку з чим він може бути адаптогеном при комбінованих стресорних впливах.

Останнім часом спостерігається багато випадків гіповітамінозів, які можна віднести до групи харчових стресорних факторів [18]. Е-гіповітаміноз характеризується підсиленням процесів перекисного окиснення ліпідів, зниженням вмісту убіхінону в тканинах і зменшенням активності ферментів ланцюга транспорту електронів, де він є кофактором [17, 26]. Ефективність запропонованої похідної  $\alpha$ -ТФА вивчали за умов *in vitro* на мітохондріях та тканині печінки у тварин після відтворення у щурів Е-недостатньої стресової ситуації. Після інкубації мітохондрій та гомогенатів печінки протягом 30 та 120 хв відповідно в пробах визначали швидкість утворення МДА, за якою оцінювали інтенсивність процесів перекисоутворення, які неодмінно супроводжують стресові ситуації і можуть бути критерієм їх вираження (табл. 4).

Як показали дослідження *in vitro*, додавання за умов Е-гіповітамінозу  $\alpha$ -ТФА і  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> супроводжується значним пригніченням процесів перекисного окиснення ліпідів у гомогенатах печінки та мітохондріях. Так, при додаванні  $\alpha$ -ТФА вміст МДА зменшується в гомогенатах печінки і мітохондріях, відповідно, в 5,0 і 1,4 раза,  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> – в 14,0 і 7,6 раза, що свідчить про більш виражену активність цієї сполуки, порівняно з  $\alpha$ -ТФА, щодо інгібування процесів перекисоутворення. Висока антиоксидна дія похідної токоферолацетату, можливо, пов'язана з кращою проникністю його в клітину та її компартменти у зв'язку з укороченням бічного ланцюга.

За умов *in vivo* нами показано, що при введенні  $\alpha$ -ТФА і  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> щурам з Е-гіповітамі-

нозом в печінці відбувається підвищення вмісту загальних ліпідів, убіхінону і вітаміну Е: для  $\alpha$ -ТФА – на 11, 63 і 10 % відповідно, для  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> – на 39, 78 і 49 % (табл. 5). Отже,  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> значно активніший за  $\alpha$ -ТФА. Можливо, вкорочення бічного ланцюга до С<sub>6</sub> – природного метаболіту  $\alpha$ -токоферолу зумовлює збільшення гідрофобності молекули та полегшення процесів її транспорту до клітини – мішені та місця реалізації її біологічної активності. Очевидно,  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> бере на себе функції вітаміну Е, зменшуючи його використання, що призводить до підвищення вмісту останнього в печінці.

Підвищення вмісту убіхінону (коензиму Q) спричиняє активацію ферментів дихального ланцюга. Результати експерименту, що представлені в таблиці 6, свідчать про більш ефективну активацію ферментів ланцюга транспорту електронів при введенні  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> порівняно з  $\alpha$ -ТФА. Так, за умов застосування  $\alpha$ -ТФА в мітохондріях печінки тварин з Е-гіповітамінозом активність NADH-дегідрогеназної системи зростає на 11 %, NADH-убіхіонредуктазна активність не змінюється, а сукцинатубіхіонредуктазна збільшується на 15 %. При введенні  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> активність NADH-дегідрогеназної системи, NADH-убіхіонредуктазного і сукцинатубіхіонредуктазного комплексів підвищується, відповідно, на 18, 44 і 39 %. Зростання кількості ліпідів, вітаміну Е й убіхінону, а також активності досліджуваних ферментів ланцюга транспорту електронів, після введення тваринам  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> (табл. 5, 6) свідчить про нормалізацію процесів метаболізму, що пов'язані з перекисним окисненням ліпідів і тканинним енергетичним диханням, та активацію адаптаційних систем організму в період стресу.

Враховуючи широку розповсюдженість серцево-судинних захворювань і той факт, що саме стрес – індуковане підсилення вільнорадикальних процесів окиснення – відіграє

Таблиця 3 – **Виживання щурів (хв) з експериментальною ішемією міокарда в умовах додаткової гострої гіпоксії і після внутрішньом'язового введення їм протягом 5 діб  $\alpha$ -ТФА і  $\alpha$ -ТФА-С<sub>6</sub> (M±m, n=10-13)**

Ішемія міокарда і гіпоксичний стрес (контроль)	Після введення	
	$\alpha$ -ТФА	$\alpha$ -ТФА-С <sub>6</sub>
9,9±1,8	25,9±4,6*	27,5±3,9*

Таблиця 4 – **Інгібування *in vitro*  $\alpha$ -ТФА і його похідною (в дозі 25 мкг/мл середовища інкубації) швидкості утворення МДА (нмоль) в мітохондріях та гомогенаті печінки щурів за умов дії стрес-фактора Е-гіповітамінозу (M±m, n=10-12)**

Е-гіповітаміноз (контроль)	Після введення	
	$\alpha$ -ТФА	$\alpha$ -ТФА-С <sub>6</sub>
Гомогенат		
76,10±1,91	15,25±0,65*	5,47±0,34*
Мітохондрії		
140,86±8,66	98,61±14,24*	18,54±0,22*

провідну роль у їх виникненні і прогресуванні, доцільно вивчити вплив похідної  $\alpha$ -ТФА на біохімічні і функціональні властивості плазматичних мембран кардіоміоцитів тварин з експериментальною гіперхолестеринемією (ГХЕ).

За даними літератури відомо, що застосування  $\alpha$ -ТФА при ГХЕ призводить через 1,5 місяця до достовірного зменшення вмісту МДА та ДК порівняно з тваринами за умов ГХЕ, що автори пов'язують з впливом токоферолу на глутатіонредуктазну активність (ГРА). Проте рівні МДА і ДК залишаються, відповідно, на 34 і 10 % вищими за контрольні величини [4].

Як видно з таблиці 7, за умов експериментальної ГХЕ збільшується величина молярного співвідношення Хс/Фл в плазматичних мембранах кардіоміоцитів (в 1,8 рази), що може свідчити про зростання мікров'язкості ліпідного матриксу. Разом з цим, відбувається значна інтенсифікація вільнорадикальних процесів окиснення – інтенсивність ІХЛ підвищується в 4 рази, вміст ДК – на 62 %, МДА – на 76 % порівняно з контролем. При цьому каталітична активність  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази, основного іонного насоса сарколеми кардіоміоцитів, що підтримує електрофізіологічні властивості клітин серця і регулює їх функції, зменшується на 33 % порівняно з контролем. Враховуючи ліпідоза-

лежний характер функціонування  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФази, встановлені зміни можуть бути зумовлені як зростанням величини співвідношення Хс/Фл, так і інтенсифікацією вільнорадикальних процесів окиснення. Глутатіонредуктазна активність за умов експериментальної ГХЕ в плазматичних мембранах кардіоміоцитів знижується на 37 % порівняно з контрольними значеннями. Очевидно, гальмування ГРА пов'язане з інтенсифікацією вільнорадикальних процесів окиснення, що може призводити до окиснення сульфгідрильних груп ферменту.

Результати досліджень впливу  $\alpha$ -ТФА- $\text{C}_6$  на стан плазматичних мембран кардіоміоцитів представлено в таблиці 7. Так, встановлено зменшення величини молярного співвідношення Хс/Фл, що може свідчити про нормалізацію ліпідної фази плазматичних мембран кардіоміоцитів та створення сприятливих умов для нормального функціонування ферментних систем і мембранозв'язаних білків. Застосування  $\alpha$ -ТФА- $\text{C}_6$  призводить до суттєвого зниження інтенсивності ІХЛ, вмісту ДК і МДА у фракції плазматичних мембран кардіоміоцитів, наближаючи показники до їх рівня у інтактних кролів. За цих умов ГРА збільшується порівняно з групою тварин з ГХЕ і складає 80 % від контрольного рівня. Введення  $\alpha$ -ТФА- $\text{C}_6$  сприяє

Таблиця 5 – Вміст ліпідних компонентів в печінці щурів з Е-недостатнім стресом та після введення їм  $\alpha$ -ТФА та  $\alpha$ -ТФА- $\text{C}_6$  ( $M \pm m$ ,  $n=7-10$ )

Групи тварин	Досліджувані показники		
	Загальні ліпіди, мг/г печінки	Вітамін Е, мкг/мг білка	Убіхінон, мкг/мг білка
Контроль	49,18 $\pm$ 0,78	0,47 $\pm$ 0,02	0,93 $\pm$ 0,03
Вводили $\alpha$ -ТФА	54,61 $\pm$ 2,27*	0,52 $\pm$ 0,04	1,52 $\pm$ 0,09*
Вводили $\alpha$ -ТФА- $\text{C}_6$	68,60 $\pm$ 3,51*	0,70 $\pm$ 0,03*	1,66 $\pm$ 0,12*

Таблиця 6 – Активність ферментів ланцюга транспорту електронів в мітохондріях печінки тварин з Е-гіповітамінозом та при введенні їм per os по 5 мг/кг маси  $\alpha$ -ТФА та його активного метаболіту  $\alpha$ -ТФА- $\text{C}_6$  (мкмоль/мг білка за 1 хв) ( $M \pm m$ ,  $n=10-12$ )

Активність	Е-гіповітаміноз	Після введення	
		$\alpha$ -ТФА	$\alpha$ -ТФА- $\text{C}_6$
NADH-дегідрогеназна	2901 $\pm$ 162	3229 $\pm$ 80*	3437 $\pm$ 202*
NADH-убіхінонредуктазна	0,59 $\pm$ 0,03	0,61 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,06*
Сукцинатубіхінонредуктазна	23,38 $\pm$ 0,9	26,80 $\pm$ 0,99*	32,51 $\pm$ 1,23*

Таблиця 7 – Структурно-функціональний стан плазматичних мембран кардіоміоцитів кролів за умов гіперхолестеринемії та введення  $\alpha$ -ТФА- $\text{C}_6$  ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Показники, що досліджуються	Умови експерименту		
	Контроль (інтактні тварини)	ГХЕ	ГХЕ+ $\alpha$ -ТФА- $\text{C}_6$
Хс/Фл, моль/моль	1,25 $\pm$ 0,12	2,27 $\pm$ 0,21*	1,42 $\pm$ 0,14
ДК, $E_{232}$ /мг білка	36,6 $\pm$ 2,9	59,5 $\pm$ 5,8*	43,6 $\pm$ 5,6*
МДА, мкмоль/мг білка	0,47 $\pm$ 0,05	0,83 $\pm$ 0,11*	0,50 $\pm$ 0,07
ІХЛ, імп/хв	279,2 $\pm$ 41,4	1117,5 $\pm$ 132,3*	610,2 $\pm$ 134,8*
ГР, $E_{340}$ /мг білка	5,17 $\pm$ 0,34	3,25 $\pm$ 0,42*	4,14 $\pm$ 0,48*
$\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФаза, мкмоль фосфату неорганічного / мг білка за 1 год	9,4 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 0,5*	8,4 $\pm$ 0,4*



стабілізації каталітичної активності  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази. Отримані експериментальні результати можуть свідчити про антиоксидні властивості і мембранопротекторну дію даної сполуки відносно плазматичних мембран кардіоміоцитів.

**ВИСНОВКИ.** 1. Під час проведення досліджень було встановлено, що при впливі таких стрес-факторів, як гіпоксична гіпоксія, токсична дія адреналіну, що проявляється в основному у виникненні ішемії міокарда, в поєднанні з дією гіпоксичного стресу, Е-гіповітамінозу та навантаження холестерином спостерігаються зміни, що корегуються досліджуваними препаратами. Це свідчить про наявність оксидативного стресу в патогенезі даних патологічних станів.

2. Отримані експериментальні дані підтверджують переваги  $\alpha$ -ТФА- $\text{C}_6$ , порівняно з  $\alpha$ -ТФА фармакопейним, у здатності підвищувати адаптивні реакції організму стосовно як збільшення терміну виживання, так і нормалізації метаболічних зрушень, що виникають під впливом стресових навантажень. Введення  $\alpha$ -ТФА- $\text{C}_6$ , який є активним метаболітом  $\alpha$ -ТФА, забезпечує подовження життя та виживання тварин в стресових умовах, збереження активності ферментів антиоксидної системи захисту організму (ГРА) та тканинного енергетичного обміну, нормалізує ліпідну структуру мембран та функціонування життєво важливого для міокарда іонного насоса  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФази, ефективно нормалізує вільнорадикальні процеси окиснення.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Барабой В.А., Брехман И.И., Голотин В.Г., Кудряшов Ю.Б. Перекисное окисление и стресс. – С.Пб.: Наука, 1992. – 148 с.
2. Гацура В.В. Фармакологическая регуляция энергетического обмена ишемизированного миокарда // Фармакол. и токсикол. – 1978. – **41**, № 5. – С. 517-529.
3. Даниленко М.П., Ким Э.А., Омарова Р.Д. Действие ацетилхолина на  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазную активность разных препаратов сарколеммы миокарда // Вопросы мед. химии. – 1983. – **29**, № 1. – С. 29-33.
4. Деримедвідь Л.В. Вивчення впливу рекомбінантної супероксиддисмутази на процеси вільнорадикального окиснення при модельному холестеринозі // Фармацевт. журн. – 2000. – № 2. – С. 69-72.
5. Донченко Г.В. Биохимия убихинона (Q). – К.: Наукова думка, 1988. – 240 с.
6. Донченко Г.В., Коваленко В.Н., Забарная Е.Н. и др. Действие производных  $\alpha$ -токоферола на содержание природных хинонов в тканях витамин Е-недостаточных крыс // Биохимия. – 1979. – **44**, вып. 5. – С. 923-930.
7. Дубініна О.Є. Окиснювальний стрес і окиснювальна модифікація білків // Мед. хімія. – 2001. – **3**, № 2. – С. 5-12.
8. Кейтс М. Техника липидологии. – М.: Мир, 1975. – 322 с.
9. Климов А.Н., Рыженков В.Е. Экспериментальное изучение гиполлипидемических и антисклеротических средств // Метод. рекомендации. – М., 1988. – 16 с.
10. Кругликова Г.О., Штутман И.М. Глутатионпероксидазная и глутатионредуктазная активность печенки крыс после введения селената натрия // Укр. биохим. журн. – 1976. – **48**, № 2. – С. 223-228.
11. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Своднорадикальные процессы при заболеваниях сердечной-сосудистой системы // Кардиология. – 2000. – **40**, № 7. – С. 48-61.
12. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. – М.: Медицина, 1984. – 269 с.
13. Наумов В.З., Ющенко А.А., Теплый Д.Л. и др. Сравнительное изучение антиоксидантного действия соллюсульфона и  $\alpha$ -токоферола // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2000. – **129**, № 1. – С. 48-49.
14. Непомнящих Л.Н., Курбатов В.С., Фуксман В.И. и др. Моделирование очаговых сосудисто-метаболических повреждений миокарда // Метаболизм и структура сердца в норме и патологии. – Новосибирск: Изд-во АМН СССР, 1972. – С. 66-127.
15. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 63-64.
16. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения мономерного диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
17. Тарасова Н.В., Иванова Г.И., Гололобов А.Д. Участие убихинона-9 в цепи транспорта электронов у *Candida guilliermondii* // Микробиология. – 1976. – **45**, № 3. – С. 400-405.
18. Терехин С.П., Муравлева Л.Е., Боденова Т.Г. Влияние характера питания на окислительный метаболизм у электросварщиков // Вопросы питания. – 2001. – **70**, № 4. – С. 13-16.
19. Шилов П.И., Яковлев Т.Н. Основы клинической витаминологии. – Л.: Медицина, 1974. – 367 с.
20. Яхнина Д.Н., Агабекова И.И., Кузьмина М.Я. Участие а-токоферола в регуляции активности де-гидрогеназ при стрессовых воздействиях // V конф. биохимиков Средней Азии и Казахстана: Тез докл., 12-15 ноября 1991. – Ташкент, 1991. – С. 348.
21. Edwin E.E., Diplock A.T., Bunyan J., Green J.

Studies on vitamin E in the rat and the effect of  $\alpha$ -tocopherol and dietary selenium on ubiquinone and ubiquinone in tissues // *Biochem. J.* – 1961. – **79**. – P. 91-105.

22. Folch J.M., Lees G.H., Sloane-Stanley A. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // *J. Biol. Chem.* – 1957. – **226**, № 1. – P. 497-509.

23. Louis P.J., Sulakhe P.V. Isolation of sarcolemma membranes from cardiac muscle // *Int. J. Biochem.* – 1976. – **77**. – P. 547-558.

24. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**. – P. 265-276.

25. Schneider V.C. Intracellular distribution of enzymes. III. The oxidation of octanoic acid by rat liver fraction // *J. Biol. Chem.* – 1948. – **176**, № 2. – P. 259-262.

26. Ziegler D., Doeg K.A. Preparation and properties of succinate dehydrogenase coenzyme Q reductase (complex II) // *Methods in Enzymology.* – 1967. – **10**. – P. 231-235.

## ВЛИЯНИЕ $\alpha$ -ТОКОФЕРОЛА И ЕГО КОРОТКОЦЕПНОГО ПРОИЗВОДНОГО НА ОРГАНИЗМ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СТРЕССОВЫХ ФАКТОРОВ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

Г.В. Донченко<sup>1</sup>, Л.С. Мхитарян<sup>2</sup>, И.В. Кузьменко<sup>1</sup>, Е.Б. Кучменко<sup>1</sup>, Ф.Р. Звайд<sup>1</sup>  
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А.В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАИНЫ, КИЕВ<sup>1</sup>  
ИНСТИТУТ КАРДИОЛОГИИ ИМ. Н.Д. СТРАЖЕСКА АМН УКРАИНЫ, КИЕВ<sup>2</sup>

### Резюме

На моделях стресса различной этиологии была исследована возможность коррекции изменений, которые возникают при воздействии на организм стрессовых факторов, с помощью витамина Е и его короткоцепного производного с  $C_6$  в боковой цепи. Установлено, что при введении производного витамина Е в дозах от 5 до 50 мг/кг возрастают продолжительность жизни и выживаемость животных, нормализуются липидная структура мембран, функционирование  $Na^+, K^+$ -АТФазы и свободнорадикальные процессы окисления, обеспечивается сохранение активности ферментов антиоксидантной защиты и тканевого энергетического обмена, что свидетельствует о его антиоксидантных свойствах и достаточно высоких антистрессовом и адаптогенном действиях. Производное витамина Е проявляет более выраженную активность по сравнению с  $\alpha$ -токоферолом фармакопейным.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стресс, витамин Е, производное витамина Е, адаптоген.

## THE INFLUENCE OF $\alpha$ -TOCOPHEROL AND ITS SHORT-CHAIN DERIVATIVE ON THE ORGANISM UNDER THE ACTION OF STRESS FACTORS OF DIFFERENT ORIGIN

G.V. Donchenko<sup>1</sup>, L.S. Mkhitarjan<sup>2</sup>, I.V. Kuzmenko<sup>1</sup>, O.B. Kuchmenko<sup>1</sup>, F.R. Zwaid<sup>1</sup>  
INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY BY O.V. PALLADIN OF NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE, KYIV<sup>1</sup>  
INSTITUTE OF CARDIOLOGY BY M.D. STRAZHESKO OF ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES OF UKRAINE, KYIV<sup>2</sup>

### Summary

In the experiments on the models of stress of different aetiology the possibility of correction of changes, which are arised under the influence of stress factors by the vitamin E and its short-chain derivative –  $\alpha$ -tocopheryl acetate with  $C_6$  in the side chain was investigated. Under supplementation of derivative of vitamin E with  $C_6$  in the side chain at the concentration from 5 to 50 mg/kg the increase of life duration of animals, the normalization of lipid structure of membranes and function of  $Na^+, K^+$ -ATPase, the normalization of processes of free-radical oxidation, the preservation of activity of enzymes of antioxidant defense and tissue energetic metabolism were determined. All of these can be the evidence of antioxidant properties and effective antistress and adaptogenic action of the  $\alpha$ -tocopherol acetate with  $C_6$  in the side chain. Under these conditions the derivative of vitamin E with  $C_6$  in the side chain is more active in comparison with the vitamin E.

KEY WORDS: stress, vitamin E, derivative of vitamin E, adaptogen.

Отримано 25.06.2003 р.

Адреса для листування: О.Б. Кучменко, а/с 148, Київ, 02100, Україна.

## ВПЛИВ ЕМБРІОНАЛЬНИХ ПЛЮРИПОТЕНТНИХ ПРОГЕНІТОРНИХ КЛІТИН НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ПРОТЕОЛІЗУ В ТКАНИНАХ АОРТИ СТАРИХ ЩУРІВ

**В.В. Радченко, О.Л. Кухарчук**

КООРДИНАЦІЙНИЙ ЦЕНТР ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ОРГАНІВ, ТКАНИН І КЛІТИН МОЗ УКРАЇНИ  
ЦЕНТР РЕГЕНЕРАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ "КРС МТ", КИЇВ

*Досліджено зміни альбуміно-, казеїно- і колагенолітичної активності в тканинах грудного відділу аорти старих і статевозрілих білих щурів- самців. Встановлено, що у старих тварин віком 24 міс. у грудному відділі аорти суттєво знижується тканнна протеолітична активність, визначена за лізисом азоальбуміну, азоказеїну і азоколагену. Через 2 міс. після призначення старим щурам короткого курсу програмованої імунодепресивної терапії (бусульфан, неорал, преднізолон) альбуміно- і колагенолітична активність в тканинах аорти не змінюється, тоді як лізис азоказеїну зростає, хоча і залишається значно меншим за такий у статевозрілих тварин віком 7 міс. Через 2 міс. після алотрансплантації ембріональних плюрипотентних прогеніторних клітин у малих дозах ( $8 \cdot 10^5$ /мл) на тлі програмованої імунодепресії або у великих дозах ( $8 \cdot 10^7$ /мл) без застосування імунодепресантів інтенсивність протеолітичного розпаду низько- та високомолекулярних білків і колагену в тканинах грудного відділу аорти старих щурів відповідає показникам у статевозрілих тварин віком 7 міс.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** старіння, протеоліз, аорта, клітини, трансплантація.

ВСТУП. У ході експериментальних досліджень з клітинної алотрансплантації доведено, що мічені зеленим флуоресцентним протеїном ембріональні стовбурові клітини донора вбудовуються в зону ішемічного ураження серцевого м'язу, де зазнають диференціювання в кардіоміоцити і заміщують некротизовану тканину серця [8]. Клінічні випробування застосувань авто- і аlogenних гемопоетичних стовбурових клітин для лікування коронарного атеросклерозу у людини показали, що клітинна трансплантація сприяє утворенню ендотеліоцитів або навіть нових судин [9]. При цьому встановлено, що фіксація похідних стовбурових клітин у зоні ушкодження відбувається внаслідок ранньої експресії на них рецепторів клітинної адгезії і компонентів екстрацелюлярного матриксу, а напрямок диференціювання адгезованих клітин визначається мікрооточенням через вплив специфічної для даного локусу тканин комбінаторики цитокинових і ростових сигналів [11, 16, 17], що може забезпечувати утворення нових клітин в судинах старіючого організму.

© В.В. Радченко, О.Л. Кухарчук – д.мед.н., проф., 2003.

Ми розглядаємо старіння як перманентне зменшення розмірів стовбурових просторів організму внаслідок постійного його ремоделювання, тобто оновлення клітинного складу всіх тканин і органів за рахунок клітин стовбурових просторів, що має безперервний характер і триває впродовж усього життя багатоклітинного організму. Після виснаження клітинних резервів стовбурових просторів інтенсивність і швидкість старіння визначаються механізмами старіння соматичних диференційованих клітин у межах ліміту Хейфліка [15]. За нашими даними, саме регіональні мультипотентні клітини створюють стовбуровий простір дорослого організму ссавців, що й є морфологічним еквівалентом вітаукта – поняття, введеного В.В. Фролькісом для позначення процесу, який стабілізує життєздатність організму і збільшує тривалість якісного життя [12-14].

Отже, збільшення тривалості та якості життя індивіда можливе шляхом розширення стовбурових просторів організму на етапі післянатального онтогенезу через введення аlogenних ембріональних плюрипотентних

прогеніторних клітин (ЕППК) з одночасним перепрограмуванням імунної системи реципієнта в результаті введення великих доз ЕППК [6]. Якщо наші дані про механізм старіння є правильними, то введення ЕППК повинно нормалізувати вікові зміни біохімічних процесів на рівні клітин, а також відновлювати нормальні функціональні параметри на рівні органів і систем старіючого організму. Раніше ми встановили, що одноразове внутрішньовенне введення ЕППК нормалізує системний артеріальний тиск у спонтанно гіпертензивних щурів [7]. У даній роботі досліджено вплив алотрансплантації ЕППК на біохімічний рівень організації життєдіяльності судинної тканини.

Метою роботи було дослідити зміни інтенсивності тканинного протеолізу в грудному відділі аорти старих щурів та визначити вплив на судинну альбуміно-, казеїно- і колагенолітичну активність одноразової трансплантації ЕППК.

**ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди проведено на 22 білих щурах-самцях віком 24 міс. (сертифікат розплідника Інституту фізіології НАН України). Контрольну групу склали 8 статевозрілих тварин віком 7 міс. Щурам 1-ї дослідної групи (внутрішній контроль – 6 старих щурів) внутрішньовенно вводили розчин Хенкса – носій суспензії ЕППК, які отримували тварини 2-ї і 4-ї груп за розробленою нами методикою [6]. Тваринам 3-ї групи призначали імунодепресивну терапію, вони були контролем для щурів 4-ї дослідної групи, яким після імуносупресії проводили трансплантацію ЕППК. Для імуносупресії використовували послідовне введення бусульфану (2 мг на 1 кг маси тіла один раз на день упродовж 3 діб), преднізолону (50 мг на 1 кг один раз) і неоралу (25 мг на 1 кг один раз). Трансплантацію ЕППК проводили через 3 дні після останнього введення імунодепресантів. Щурам 2-ї групи ЕППК вводили в яремну вену під нембуталовим наркозом у дозі в  $8 \cdot 10^7$ /мл, 4-ї групи –  $8 \cdot 10^5$ /мл.

Усі дослідження проведено через 2 міс. після трансплантації ЕППК. Щурів забивали під нембуталовим наркозом, дотримуючи правил гуманного ставлення до тварин. Кільця грудного відділу аорти заморожували у рідкому азоті. Наважки аорти в боратному буфері (рН=9,0) гомогенізували в скляному гомогенізаторі.

Протеолітичну активність визначали за лізисом азоальбуміну, азоказеїну та азоколагену ("Simko Ltd", Україна) [3]. Принцип методу полягає в тому, що при інкубації білкових

азосполук у присутності активаторів та інгібіторів протеолізу, які містяться у тканинах, відбувається лізис азоальбуміну (деградація низькомолекулярних протеїнів), азоказеїну (розпад високомолекулярних білків) та азоколагену (колагеноліз), інтенсивність якого оцінювали за ступенем забарвлення інкубаційного середовища на спектрофотометрі СФ-46.

Результати досліджень опрацьовували методами варіаційного статистичного аналізу з визначенням критерію Стьюдента за програмою "Biostat" [4] на РС IBM 586.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Результати досліджень наведено у таблиці 1. У перерахунку на 1 г вологої маси тканини протеолітична активність тканин аорти за лізисом азоальбуміну і азоказеїну у старих щурів (1-ша група) виявилася, відповідно, в 2,2 і 4,6 раза нижчою, ніж у семимісячних тварин. Колагенолітична активність зменшувалась недостовірно. Через 2 міс. після алотрансплантації ЕППК інтенсивність протеолітичного розпаду низькомолекулярних білків в аорті старих щурів 2-ї групи зростала до величин, які достовірно не відрізнялись ані від контрольних даних, ані від показників у тварин 1-ї групи. Водночас казеїнолітична активність збільшувалась втричі і відповідала контролю, так само, як лізис азоколагену, який підвищувався на 53,6 % і не відрізнявся від такого у статевозрілих тварин контрольної групи.

Через 2 міс. після комплексної прогрованої імунодепресії у старих щурів 3-ї групи додаткового пригнічення тканинного лізису низькомолекулярних білків і колагену в аорті не спостерігалось, оскільки інтенсивність лізису азоальбуміну і азоколагену достовірно від такої у тварин 1-ї групи не відрізнялась. Однак імунодепресія впливала на казеїнолітичну активність, яка в тканинах аорти зростала в 2,3 раза, хоча і залишалась вдвічі нижчою за контроль. Введення зменшених доз ЕППК на тлі імуносупресивної терапії через 2 міс. після алотрансплантації призводило до нормалізації у тварин 4-ї групи всіх зазначених параметрів тканинного протеолізу. Особливих змін зазначали показники лізису азоальбуміну і азоказеїну, які після алотрансплантації зростали, відповідно, в 2,8 і 4,2 раза.

При стандартизації протеолітичної активності тканин аорти за вмістом білка встановлено більш глибокі зміни протеолізу в аорті старих щурів: альбумінолітична активність виявилась нижчою за контроль в 3,3 раза, казеїнолітична – у 6,8 раза, колагенолітична – в 2,1 раза. Однак через 2 міс. після внутріш-

ньовенного введення великих доз ЕППК всі зазначені показники тканинного протеолізу в аорті старих тварин 2-ї групи зростали і достовірно від контролю не відрізнялись.

Через 2 міс. після імунодепресії у старих щурів 3-ї групи інтенсивність лізису азоальбуміну і азоколагену була меншою за контроль, відповідно, на 65,8 і 49,5%, але не відрізнялась від такої у тварин 2-ї групи. Отже, призначення імуносупресивних препаратів не змінювало альбуміно- і колагенолітичної активності в аорті старих щурів. Лізис азоказеїну після застосування імунодепресивної терапії збільшувався майже втричі, однак залишався на 58,3 % нижчим за контрольні показники. Внутрішньовенне введення зменшених доз ЕППК на тлі програмованого імуносупресивного лікування нормалізувало інтенсивність тканинного протеолізу в аорті старих щурів 4-ї групи: лізис азоальбуміну зростав в 4,3 раза, азоказеїну – майже в 7 разів, а колагенолітична активність підвищувалась на 85,4 %. Усі зазначені показники через 2 міс. після імунодепресії і алотрансплантації ЕППК відповідали таким у статевозрілих тварин контрольної групи.

Згідно із сучасними даними, протеоліз поділяється на загальний і обмежений лізис білків. При загальному протеолізі в багатьох локусах білкової молекули відбувається розщеплення поліпептидних ланцюжків з утворенням низькомолекулярних продуктів, наприклад за дії на білок пепсину, трипсину,

хемотрипсину або комплексу бактеріальних протеїназ. При обмеженому протеолізі в білковій молекулі розриваються лише поодинокі пептидні зв'язки. При цьому молекула залишається білковою, але одержує нову функціональну якість, наприклад перетворення проферменту в активну форму: трипсиногену – в трипсин, протромбіну – в тромбін, фібриногену – у фібрин. Реакції обмеженого протеолізу високоспецифічні і є основою згортання крові і лізису тромбів, регуляції судинного тонуусу і кров'яного тиску, утворення низки білкових гормонів (інсуліну тощо) та інших важливих фізіологічно активних пептидів. Тканини організму захищені від впливу протеїназ інгібіторами протеолізу. Співвідношення систем з про- і антипротеолітичною діями перебуває в динамічній рівновазі, тому кожній з них належить надзвичайно важлива роль у життєдіяльності організму. Інгібітори протеолізу також виконують важливі фізіологічні функції, затримуючи передчасну активацію протеолітичних ферментів, регулюють гемокоагуляцію і фібриноліз, впливають на артеріальний тиск і проникність судинної стінки [1, 2, 5, 10]. Тому зниження протеолітичної активності тканин аорти у старих щурів не є випадковим, індивідуальним явищем, а свідчить про накопичення біохімічних помилок і ферментативного дефіциту у клітинах, що вийшли в серію термінальних поділів ліміту Хейфліка [15]. Цілком можливо, що відновлення після клітинної

Таблиця 1 – Вплив ембріональних прогеніторних стовбурових клітин (ЕППК) на протеолітичну активність у тканині грудного відділу аорти старих щурів ( $\bar{x} \pm Sx$ )

Групи тварин	Показники					
	Лізис азоальбуміну	Лізис азоказеїну	Лізис азоколагену	Лізис азоальбуміну	Лізис азоказеїну	Лізис азоколагену
	мкг на 1 г вологої тканини за 1 год			мкг на 1 мг білка за 1 год		
Контроль (статевозрілі щури), n=8	287,00±29,52	267,00±16,95	85,46±10,54	3,45±0,37	3,21±0,28	0,99±0,10
Старі щури, n=6 1-ша група	132,20±16,33 p=0,001*	58,58±6,01 p<0,001*	60,54±7,39 p>0,09	1,04±0,11 p<0,001*	0,47±0,05 p<0,001*	0,48±0,04 p=0,001*
Старі щури+ ЕППК, n=6 2-га група	195,50±36,96 p>0,07 p <sub>1</sub> >0,1	176,60±41,53 p<0,05* p <sub>1</sub> <0,02*	93,00±11,41 p>0,6 p <sub>1</sub> <0,05*	2,50±0,47 p>0,1 p <sub>1</sub> <0,02*	2,23±0,51 p>0,09 p <sub>1</sub> <0,01*	1,20±0,15 p>0,2 p <sub>1</sub> <0,001*
Старі щури+ імунодепресія, n=5 3-тя група	115,10±11,16 p=0,001* p <sub>1</sub> >0,4	133,50±18,19 p<0,001* p <sub>1</sub> <0,01*	48,79±4,81 p<0,05* p <sub>1</sub> >0,2	1,18±0,07 p<0,001* p <sub>1</sub> >0,3	1,34±0,11 p<0,001* p <sub>1</sub> <0,001*	0,50±0,05 p<0,01* p <sub>1</sub> >0,7
Старі щури+ імунодепресія+ ЕППК, n=5 4-та група	369,50±62,54 p>0,2 p <sub>1</sub> <0,01* p <sub>2</sub> <0,05* p <sub>3</sub> <0,01*	244,20±23,49 p>0,4 p <sub>1</sub> <0,001* p <sub>2</sub> >0,2 p <sub>3</sub> <0,01*	70,99±8,75 p>0,3 p <sub>1</sub> >0,3 p <sub>2</sub> >0,1 p <sub>3</sub> >0,05	4,48±0,43 p>0,1 p <sub>1</sub> <0,001* p <sub>2</sub> <0,02* p <sub>3</sub> <0,001*	3,23±0,62 p>0,9 p <sub>1</sub> <0,001* p <sub>2</sub> >0,2 p <sub>3</sub> <0,02*	0,89±0,08 p>0,4 p <sub>1</sub> <0,001* p <sub>2</sub> >0,1 p <sub>3</sub> <0,01*

Примітка. p – ступінь достовірності відмінностей показників відносно таких у контролі;

p<sub>1,2,3</sub> – ступінь достовірності відмінностей показників стосовно таких у відповідній групі тварин;

n – кількість спостережень;

\* – достовірні результати.

алотрансплантації інтенсивності протеолізу, який здійснюється нейтральними пептидазами, є наслідком приживлення ЕППК і вбудовування їх похідних у судинну стінку за механізмом заміщення старіючих клітин.

**ВИСНОВКИ.** 1. У старих щурів віком 24 міс. у грудному відділі аорти суттєво знижується тканнна протеолітична активність, визначена за лізисом азоальбуміну, азоказеїну і азоколагену.

2. Через 2 міс. після призначення старим тваринам короткого курсу програмованої імундепресивної терапії (бусульфан, неорал,

преднізолон) альбуміно- і колагенолітична активність в тканинах аорти не змінюється, тоді як лізис азоказеїну зростає, хоча і залишається значно меншим за такий у статевозрілих щурів віком 7 міс.

3. Через 2 міс. після алотрансплантації ЕППК у малих дозах ( $8 \cdot 10^5$ /мл) на тлі програмованої імундепресії або у великих дозах ( $8 \cdot 10^7$ /мл) без застосування імундепресантів інтенсивність протеолітичного розпаду низько- та високомолекулярних білків і колагену в тканинах грудного відділу аорти старих щурів відповідає такий у статевозрілих тварин віком 7 міс.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Веремеєнко К.Н. Белковые ингибиторы плазмы крови – регуляторы активности протеолитических ферментов // Системная энзимотерапия. Теоретические основы, опыт клинического применения. – К.: МОРИОН, 2000. – С. 21-53.
2. Веремеєнко К.Н. Протеолитические ферменты и их ингибиторы. Новые области применения в клинике // Врач. дело. – 1994. – № 1. – С. 8-13.
3. Веремеєнко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.А. Протеолиз в норме и при патологии. – К.: Здоров'я, 1988. – 200 с.
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
5. Даниличев В.Ф., Максимов И.Б. Травмы и заболевания глаз. Применение ферментов и пептидных биорегуляторов. – Минск: Наука і тэхніка, 1994. – 223 с.
6. Кухарчук О.Л., Радченко В.В., Сірман В.М. Экспериментальне обґрунтування способу переінсталяції системи контролю антигенного гомеостазу організму ссавців (ефект Кухарчука-Радченка-Сірмана) // Трансплантологія. – 2002. – **3**, № 2. – С. 5-19.
7. Кухарчук О.Л., Радченко В.В., Сірман В.М., Сагач В.Ф. Вплив алотрансплантації ембріональних плюрипотентних прогеніторних клітин на динаміку системного артеріального тиску у щурів зі спонтанною гіпертензією // Фізіол. журн. – 2003. – **49**, № 4. – С. 67-70.
8. Малайцев В.В., Богданова И.М., Сухих Г.Т. Современные представления о биологии стволовой клетки // Арх. патол. – 2002. – **64**, № 4. – С. 7-11.
9. Репин В.С., Сухих Г.Т. Медицинская клеточная биология. – М., РАМН: БЭБиМ, 1998. – 200 с.
10. Руденко В.Г., Руденко Ю.В. Протеиназы, ингибиторы протеиназ и противоревматическая терапия // Ревматология. – 1990. – № 3. – С. 32-38.
11. Сухих Г.Т., Малайцев В.В., Богданова И.М., Дубровина И.В. Мезенхимальные стволовые клетки // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2002. – **132**, № 2. – С. 124-131.
12. Фролькис В.В. Биология старения – 40 лет спустя // Пробл. старения и долголетия. – 1998. – **7**, № 3. – С. 207-214.
13. Фролькис В.В., Безруков В.В., Кульчицкий О.К. Старение и экспериментальная возрастная патология сердечно-сосудистой системы. – К.: Наукова думка, 1994. – 248 с.
14. Фролькис В.В., Мурадян Х.К. Старение, эволюция и продление жизни. – К.: Наукова думка, 1992 – 336 с.
15. Хейфлик Л. Смертность и бессмертие на клеточном уровне // Биохимия. – 1997. – **62**, № 11. – С. 1380-1393.
16. Civin C.I. Human pluripotent stem cells: science fiction poses no immediate dangers // Stem Cells. – 2000. – **18**. – P. 4-5.
17. Schuldiner M., Yanuka O., Itskovitz-Elder J. Effects of 8 growth factors on the differentiation of human embryonic stem cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2000. – **97**. – P. 11307-11312.

# ВЛИЯНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК НА ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОТЕОЛИЗА В ТКАНЯХ АОРТЫ СТАРЫХ КРЫС

**В.В. Радченко, А.Л. Кухарчук**

КООРДИНАЦИОННЫЙ ЦЕНТР ТРАНСПЛАНТАЦИИ ОРГАНОВ, ТКАНЕЙ И КЛЕТОК МЗ УКРАИНЫ  
ЦЕНТР РЕГЕНЕРАЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ "КРС МТ", КИЕВ

## Резюме

Исследованы изменения альбумино-, казеино- и коллагенолитической активности в тканях грудного отдела аорты у старых и половозрелых белых крыс-самцов. Установлено, что у старых животных в возрасте 24 мес. в грудном отделе аорты существенно снижается тканевая протеолитическая активность, определенная по лизису азоальбумина, азоказеина и азоколлагена. Через 2 мес. после назначения старым крысам короткого курса программируемой иммунодепрессивной терапии (бусульфана, неорала, преднизолона) альбумино- и коллагенолитическая активность в тканях аорты не изменяется, тогда как лизис азоказеина возрастает, хотя и остается значительно меньшим такового у половозрелых животных в возрасте 7 мес. Через 2 мес. после аллотрансплантации эмбриональных плюрипотентных прогени- торных клеток в малых дозах ( $8 \cdot 10^5$ /мл) на фоне программируемой иммунодепрессии или в больших дозах ( $8 \cdot 10^7$ /мл) без использования иммунодепрессантов интенсивность протеолитического распада низко- и высокомолекулярных белков и коллагена в тканях грудного отдела аорты старых крыс соответствует показателям у половозрелых животных в возрасте 7 мес.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: старение, протеолиз, аорта, клетки, трансплантация.

# INFLUENCE OF EMBRYONIC PLURIPOTENT PROGENITOR CELLS ON THE INTENSIVITY OF PROTEOLYSIS IN AORTA TISSUES OF OLD RATS

**V.V. Radchenko, O.L. Kukharchuk**

COORDINATIVE CENTRE OF TRANSPLANTATION OF ORGANS,  
TISSUES AND CELLS OF MPH OF UKRAINE  
CENTER OF REGENERATIVE MEDICINE "KRS MT", KYIV

## Summary

There were studied the changes of albumin-, casein- and collagenolytic activity in tissues of thoracic part of aorta in old and sexually mature white rats-males. It was established that in old rats at the age of 24 months in thoracic part of aorta tissue proteolysis activity is significantly reduced, that is determined by azoalbumin, azocasein and azocollagen lysis. In 2 months after prescription for old rats a short course programmed therapy of immune suppression (busulfan, neoral, prednisolone) albumin- and collagenolytic activity in aorta tissues do not change although azocasein lysis is enhanced and retains to be significantly less than it is in sexually mature rats at the age of 7 months. In 2 months after embryonic pluripotent progenitor allotransplantation in the small doses ( $8 \cdot 10^5$ /ml) against the background of programmed immune suppression or in high doses ( $8 \cdot 10^7$ /ml) without immunosuppressive agents the intensiveness of proteolytic decomposition of low-molecular, high-molecular proteins and collagen in tissues of thoracic part of aorta in old rats corresponds to the indices in sexually mature rats at the age of 7 months.

KEY WORDS: aging, proteolysis, aorta, cells, transplantation.

Отримано 02.09.2003 р.

Адреса для листування: О.Л. Кухарчук, ЦЕТ "ЕмСелл", вул. Урицького, 45, оф. 503, а/с 1, Київ-35, 03035, Україна.

## ЗАСТОСУВАННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ПРИ ТОКСИЧНОМУ УРАЖЕННІ ПЕЧІНКИ ЛЕТКИМИ КОМПОНЕНТАМИ ЕПОКСИДНОЇ СМОЛИ ЕД-20

І.Ю. Висоцький, І.О. Комаревцева<sup>1</sup>, А.А. Качанова,  
В.І. Висоцький<sup>2</sup>; К.Г. Калікін<sup>1</sup>, Т.П. Гречишкіна<sup>1</sup>  
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ЛУГАНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ<sup>1</sup>  
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ<sup>2</sup>

У досліджах на білих щурах-самцях лінії Вістар показано, що гостре динамічне 4-годинне інгаляційне затруєння леткими компонентами епоксидної смоли (ЕС) ЕД-20 (120-140 мг/м<sup>3</sup> за епіхлоргідринном) супроводжується різким зростанням у сироватці крові тварин активності амінотрансфераз (АлАТ, АсАТ), кислоти фосфатази (КФ), лужної фосфатази (ЛФ) і холегліцину (ХГ). Активність АлАТ, АсАТ була максимальною через 12 год після інтоксикації, КФ і ЛФ – 72-120 год, а ХГ – 72 год, що свідчить про переважання в ранні строки явищ цитолізу, а в більш пізні – холестазу. Порівняльне вивчення при отруєнні ЕС ефективності індукторів епоксидгідролази омепразолу (50 мг/кг, 7 днів) і клофібрату (200 мг/кг, 2 дні) показало наявність високих детоксуючих властивостей у першого і низьких – у другого препарату. При застосуванні препаратів за лікувально-профілактичною схемою, до і після інтоксикації найвищу ефективність виявлено у кверцетину (350 мг/кг). Нижча і приблизно однакова фармакологічна активність спостерігалась у флавінату (4 мг/кг) і ліпіну (0,8 ммоль/кг). Ацетилцистеїн (450 мг/кг) при отруєнні ЕС проявляв порівняно слабку ефективність, особливо в пізні строки після інтоксикації.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** токсичне ураження печінки, епоксидні смоли, амінотрансферази, кисла фосфатаза, лужна фосфатаза, холегліцин, кверцетин, ацетилцистеїн, флавінат, ліпін, клофібрат, омепразол.

ВСТУП. Епоксидним смолам (ЕС), виробництво та використання яких у світовій промисловості невпинно зростають, притаманні виражені гепатотоксичні властивості [9, 12, 14]. У значній кількості працівників, які безпосередньо контактують з ЕС, при обстеженні виявляють токсичні гепатопатії [1, 15, 16]. Особливо небезпечними в цьому відношенні є епіхлоргідрин (ЕХГ), толуол та інші леткі компоненти ЕС, які можуть накопичуватися в повітрі робочої зони у високих концентраціях [4, 19, 21].

Ці факти роблять надзвичайно актуальною проблему фармакологічної корекції патологічних змін при токсичних ураженнях печінки ЕС. З метою подальшої розробки нових та вдосконалення існуючих методів лікування токсичних гепатопатій, спричинених леткими компонентами ЕС, ми дослідили ефективність ряду лікарських засобів з різними механізмами дії

© І.Ю. Висоцький – к.мед.н., І.О. Комаревцева – д.мед.н., проф., А.А. Качанова, В.І. Висоцький; К.Г. Калікін – к.м.н., Т.П. Гречишкіна, 2003.

на деякі біохімічні показники сироватки крові щурів, які характеризують вираження та особливості пошкодження гепатоцитів токсичними речовинами.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди проводили на 86 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 150-190 г. Гостре токсичне ураження печінки спричиняли шляхом однократного 4-годинного інгаляційного динамічного впливу леткими компонентами ЕС ЕД-20 в концентрації, яка складає 1/3 LC<sub>50</sub> (120-140 мг/м<sup>3</sup>) за ЕХГ. Інгаляційне затруєння здійснювали в установці, змонтованій за методом А.П. Яворівського [21] в нашій модифікації [9].

Частині тварин за лікувально-профілактичною схемою вводили 350 мг/кг кверцетину внутрішньошлунково (ЕД<sub>50</sub>), 4 мг/кг флавінату внутрішньом'язово (ЕД<sub>50</sub>), 0,8 ммоль/кг ліпіну внутрішньочеревно (ЕД<sub>30</sub>), 450 мг/кг ацетилцистеїну внутрішньочеревно (ЕД<sub>50</sub>) за 3, 1, 0,5 і 0,5 год відповідно до початку затруєння і через



5 хв після його закінчення. Забій щурів здійснювали через 12, 24, 72 і 120 год після останнього введення препаратів.  $ED_{50}$  і  $ED_{30}$  застосованих лікарських препаратів визначали в умовах їх профілактичного введення, на основі відсотка виживання тварин, на моделі гострого інгаляційного статичного 30-хвилинного затруєння білих щурів найбільш токсичним і небезпечним летким компонентом ЕС – ЕХГ ( $LC_{50}$ - $LC_{100}$ ) за методикою Б.М. Штабського і співавт. [20].

Омепразол і клофібрат використовували за схемою з метою індукції епоксидгідролази [11]. Омепразол вводили внутрішньочеревно 1 раз на день по 50 мг/кг маси протягом 7 діб, а клофібрат – внутрішньошлунково 1 раз на день по 200 мг/кг маси впродовж 2 діб. Інтоксикацію леткими компонентами ЕС ЕД-20 проводили через 24 год після останнього введення препаратів. Проби крові забирали через 12, 24, 72 і 120 год після впливу летких компонентів ЕС ЕД-20.

Ступінь і характер ураження печінки леткими компонентами ЕС ЕД-20 оцінювали за активністю в сироватці крові аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ) [26], лужної фосфатази (ЛФ) [22], кислої фосфатази (КФ) [17] і рівнем холегліцину (ХГ). Радіоімунний аналіз вмісту ХГ у сироватці крові проводили за допомогою комерційного набору фірми "ABBOTT LABORATORIES" (США).

Отримані експериментальні дані обробляли статистично загальновідомим методом за допомогою t-критерію Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Проведені дослідження показали, що інтоксикація леткими компонентами ЕС ЕД-20 характеризується різким зростанням активності амінотрансфераз у сироватці крові щурів контрольних груп (рис. 1). Так, активність АлАТ через 12 год після закінчення затруєння була в 1,9-3,2 ( $p_1 < 0,001$ ), а АсАТ – в 2,5-2,7 ( $p_1 < 0,001$ ) раза більшою, ніж у групах інтактних тварин. Через 24 год після інтоксикації показники активності АлАТ і АсАТ в сироватці крові дещо знизились, але перевищували такі в інтактних щурів у 1,5-2,5 ( $p_1 < 0,05$ - $0,01$ ) і 2,1-2,4 ( $p_1 < 0,001$ ) раза відповідно. Ці факти вказують на значне збільшення проникності цитоплазматичних і, деякою мірою, мітохондріальних мембран гепатоцитів в результаті токсичного впливу летких компонентів ЕС ЕД-20, що, очевидно, є наслідком ранньої активації процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), зумовлених, по-перше, алкілуванням низькомолекулярних тіоловмісних сполук і зниженням активності системи анти-

оксидного захисту [6, 8], а по-друге, високою окиснювальною здатністю епоксисполук, яка спричинена наявністю групи -С-О-С- [5].

При оцінці активності АлАТ і АсАТ в сироватці крові слід враховувати деякі біологічні і хімічні особливості самих амінотрансфераз. У зв'язку з тим, що АлАТ розташований в основному в цитоплазмі, а АсАТ – в цитоплазмі й, у зв'язаній формі, ядрах і мітохондріях, швидкість проникнення їх через мембрану гепатоцитів різна [18]. Отруєння леткими компонентами ЕС, в тому числі ЕХГ, які є сильними мембранотропними отрутами і лабілізаторами клітинних мембран, спричиняє, за аналогією з  $CCl_4$ , зміни трансмембранного потенціалу плазмолем, і в кров першими надходять не зв'язані із структурами ензими [3]. Цим пояснюється більш виражене зростання в крові активності АлАТ, порівняно з АсАТ, у перші 12 год після динамічного інгаляційного затруєння. Високий рівень активності АсАТ в обидва строки експерименту, очевидно, пов'язаний з деструктивними явищами як в цитоплазматичних мембранах, так і в ядрі й мітохондріях гепатоцитів [6].

Результати дослідження активності локалізованої в лізосомах КФ в сироватці крові щурів, отруєних леткими компонентами ЕС, показали наявність значної і статистично достовірної гіперферментемії, яка приблизно в 1,7-2,1 ( $p_1 < 0,01$ - $0,001$ ) раза перевищувала аналогічний показник у здорових тварин в обидва строки експерименту (рис. 2). Очевидно, це свідчить про лабілізацію лізосомальних мембран – з одного боку [6], а з іншого – виступає одним із факторів, що вказують на розвиток дегенеративно-дистрофічних і некротичних змін у паренхімі печінки, які спостерігались під світловим мікроскопом і в ході електронно-мікроскопічних досліджень [6, 9]. На можливості використання КФ як лізосомального індикатора наголошує у своїй роботі [18].

Про розвиток явищ внутрішньопечінкового холестазу у щурів контрольних груп свідчить зростання в сироватці крові в усі строки експерименту активності ЛФ (рис. 2) і концентрації ХГ (табл. 1). Так, через 72 год після вилучення тварин із камери активність ЛФ у отруєних щурів перевищувала аналогічний показник у інтактних тварин в 1,5-1,9 ( $p_1 < 0,001$ ) раза. На 5-ту добу дослідження спостерігалася тенденція до зниження активності ЛФ в крові, хоча величина цього показника залишалася достовірно вищою, ніж у інтактних тварин. Динаміка зміни рівня ХГ в крові щурів після гострої динамічної інтоксикації леткими компонентами ЕС ЕД-20 свідчить про статистично значуще зростання концентрації солі холієвої кислоти у

всі строки дослідження в 3,1-4,8 ( $p_1 < 0,02$ ) разів з максимумом на 72 години.

Таким чином, наведені дані показують, що при гострому токсичному ураженні печінки леткими компонентами ЕС у досліджуваних тварин спостерігаються суттєві зміни функції мембран гепатоцитів, які пов'язані з порушенням їх проникності. У ранні строки після інтоксикації переважають явища цитолізу, а в більш пізні – явища холестази [8].

З метою фармакологічної корекції метаболічних змін у печінці, що відбуваються при гострій інтоксикації леткими компонентами ЕС, нами застосовані препарати, дія яких спрямована на основні ланки розвитку патологічного процесу і виправлення уже пошкодженої ЕС фосфоліпідної матриці мембран.

Представлені на рисунку 1 результати дослідів з кверцетином показують, що введення цього препарату за 3 год до і через 5 хв після гострої інтоксикації ЕС спричинило зниження активності АлАТ на 42 ( $p_2 < 0,002$ ) і 25 % ( $p_2 > 0,1$ ), а АсАТ – на 37 ( $p_2 < 0,002$ ) і 38 % ( $p_2 < 0,01$ ) відповідно через 12 і 24 год після закінчення затруєння. Дія флавінату в аналогічні строки експерименту характеризувалася подібною динамікою з більш вираженим ефектом. Лише активність АсАТ під впливом кверцетину на 24-годинній позначці була дещо нижчою. Застосування ліпіну за лікувально-профілактичною схемою супроводжувалося, порівняно з кверцетином і, особливо, флавінатов, менш вираженими позитивними зрушеннями досліджуваних амінотрансфераз. Активність АлАТ в сироватці крові була нижчою, ніж у контрольній групі, на 32 % ( $p_2 < 0,02$ ) в 1-й строк після затруєння і на 30 % ( $p_2 > 0,1$ ) – в 2-й строк, АсАТ – на 27 ( $p_2 < 0,02$ ) і 19 % ( $p_2 > 0,05$ ) відповідно. Протекторна дія відносно амінотрансфераз сироватки крові доведена і при введенні тваринам ацетилцистеїну. Ефективність цього препарату через 12 год після контакту з леткими компонентами ЕС була приблизно такою ж, як і в ліпіну, але через 24 год вона зменшувалася і складала не більше, ніж 8-13 % ( $p_2 > 0,25-0,5$ ).

Аналізуючи отримані результати, слід відмітити, що, незважаючи на достовірне зниження активності АлАТ і АсАТ на 12-годинній позначці під впливом всіх застосованих препаратів, відмінності з інтактною групою тварин, за винятком флавінату, теж мають достовірний характер ( $p_1 < 0,050-0,001$ ) (рис. 1). Останнє свідчить про недостатню ефективність кверцетину, ліпіну і ацетилцистеїну в ранній строк після гострої інтоксикації леткими компонентами ЕС ЕД-20. Характерно, що через 24 год

після інтоксикації зниження активності АлАТ під впливом лікарських засобів, крім ліпіну, було помітно менше вираженим, ніж через 12 год, і в усіх випадках статистично не достовірним ( $p_2 > 0,05-0,25$ ), але статистично значущим порівняно з інтактними щурами ( $p_1 < 0,05-0,001$ ). Аналогічна картина в даний строк спостерігалася і відносно АсАТ. Достовірне зменшення цього показника відмічалася лише під впливом кверцетину і флавінату ( $p_2 < 0,01-0,02$ ).

Що стосується впливу застосованих нами лікарських засобів на активність КФ при гострому отруєнні ЕС, то найбільш виражений ефект спостерігався при використанні кверцетину. Як видно з рисунку 2, введення цього препарату білим щурам супроводжувалося зменшенням активності КФ через 72 год на 45 % ( $p_2 < 0,001$ ), а через 120 год – на 42 % ( $p_2 < 0,01$ ). Відмінність з інтактною групою тварин не має достовірного характеру ( $p_1 > 0,1-0,5$ ). Наведені дані свідчать про те, що даний біофлавоноїд, очевидно, здатний стабілізувати лізосомальні мембрани гепатоцитів в умовах деструктивної дії ЕС. Вивчення детоксикуючої активності флавінату і ліпіну показало, що відносно зменшення рівня КФ в крові ці препарати значно поступаються кверцетину, а ацетилцистеїн проявляє достатню ефективність ( $p_2 < 0,001$ ) лише на 72-годинній позначці.

Аналогічно, як і у випадку з КФ, закономірність зафіксовано при дослідженні впливу кверцетину і флавінату на активність ЛФ (рис. 2). Слід підкреслити, що при застосуванні в умовах модельованої патології ліпіну і ацетилцистеїну спостерігалася не тільки достовірне зниження рівня ЛФ в обидва строки після інтоксикації, але і наближення її активності до такої, що характерна для здорових тварин. Дещо підвищена активність ЛФ, що зберігалася після лікування, не була статистично значущою ( $p_1 > 0,05-0,25$ ).

Динаміку зміни вмісту ХГ в сироватці крові при введенні досліджуваних нами лікарських засобів в умовах гострої інтоксикації леткими компонентами ЕС ЕД-20 представлено у таблиці 1. Встановлено, що кверцетин знижував підвищений при отруєнні ЕС рівень ХГ в крові через 24, 72 і 120 год на 48, 64 і 79 %, флавінат – на 50, 68 і 63 %, а ацетилцистеїн дещо менше – на 35, 60 і 49 % відповідно. Результати, які характеризують ефективність кверцетину і флавінату порівняно з контролем, були достовірними лише на 72- і 120-годинній позначках, а ацетилцистеїну – недостовірними в усі строки дослідження. Однак досить високий відсоток зменшення концентрації ХГ в крові при дії ацетилцистеїну не виключає мож-

ливості подальших досліджень з цим препаратом, особливо стосовно комбінованої фармакотерапії інтоксикацій ЕС. Незважаючи на відсутність повної нормалізації рівня ХГ в крові під впливом кверцетину і флавінату, все ж таки розбіжності у всі строки дослідження порівняно з інтактними тваринами, за винятком 24-годинної позначки для флавінату, не мають достовірного характеру.

У зв'язку з тим, що основним шляхом розпаду і детоксикації епоксидів у клітині є гідроліз, який здійснюється за участю епоксидгідролази [13], наступну серію експериментів було присвячено вивченню ефективності індукторів цього ферменту – омепразолу і клофібрату [11] – при гострій інтоксикації леткими компонентами ЕС.

Введення протягом 7 днів омепразолу (рис. 1) спричиняло зменшення активності АлАТ в сироватці крові щурів через 12 і 24 год на 56 ( $p_2 < 0,001$ ) і 26 %, а АсАТ – на 56 ( $p_2 < 0,001$ ) і 33 % ( $p_2 < 0,02$ ) порівняно з контрольною групою тварин. Підвищена активність амінотрансфераз, яка зберігалася на фоні лікування, не мала достовірного характеру. Нормалізуючий вплив даного препарату проявлявся також і відносно КФ та ЛФ сироватки крові (рис. 2), активність яких наближалась до величин, фіксованих у інтактних тварин. Встановлено, що застосування омепразолу в дозах, що індукують епоксидгідролазу, за 24 год до дії пошкоджувальних факторів у 4-4,5 раза знижувало і практично повністю відновлювало рівень ХГ у всі строки дослідження (табл. 1).

Дані результати вказують на те, що омепразол здатен достатньою мірою активно попереджувати зростання активності амінотрансфераз, фосфатаз та збільшення концентрації

ХГ у сироватці крові тварин з модельованою формою інтоксикації ЕС.

Можливо, це пов'язано з тим, що трансдигідродіоли, які утворюються з епоксидів під впливом епоксидгідролази, являють собою сполуки менш токсичні, ніж вихідні речовини [10, 23].

Однак індукція епоксидгідролази не завжди супроводжується вираженим гепатозахисним та детоксикуючим ефектами. Використання з метою нормалізації порушених при інтоксикації ЕС біохімічних процесів у печінці похідної фіброевої кислоти клофібрату, індукувальна активність якого відносно епоксидгідролази, за результатами раніше проведених нами експериментів, вища, ніж у омепразолу [11], не виправдало наших оптимістичних прогнозів. Введення клофібрату протягом 2-х днів перед гострим інгаляційним затруєнням леткими компонентами ЕС не викликало суттєвих позитивних змін з боку досліджуваних показників. Недостовірною виявилася і більш суттєва позитивна динаміка з боку ХГ, рівень якого через 24, 72 і 120 год після інтоксикації був, відповідно, на 30, 46 і 26 % нижчим, ніж в контрольній групі тварин. Такі розбіжності в ефективності цих препаратів, можливо, зумовлені їхнім різнонаправленим впливом на вміст цитохрому Р450 в гепатоцитах, за допомогою якого здійснюється метаболізм більшості жиророзчинних ксенобіотиків з проміжним утворенням в організмі епоксидних сполук. Доведено, що клофібрат спричиняє індукцію і значне зростання рівня цитохрому Р450 [25], а омепразол, навпаки, пригнічує його активність [24]. Підтвердженням цьому є встановлений раніше І.Ю. Висоцьким (1999) факт підсилення токсичності ЕХГ під впливом доз фенобарбіталу, що індукують цитохром Р450 [7].

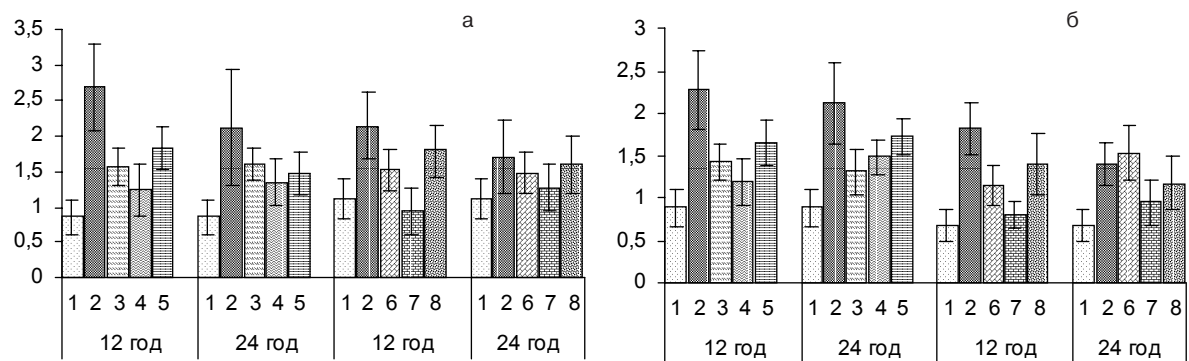


Рис. 1. Вплив лікарських засобів на активність АлАТ (а) і АсАТ (б) у сироватці крові щурів при гострому інгаляційному отруєнні леткими компонентами ЕС ЕД-20 на 12-ту і 24-ту год після закінчення затруєння (n=8-10). На осі ординат: активність АлАТ і АсАТ у ммоль/годЧл. На осі абсцис тут і на рисунку 2: 1 – інтактні тварини; 2 – контроль; 3 – ЕС ЕД-20+кверцетин (350 мг/кг); 4 – ЕС ЕД-20+флавінат (4 мг/кг); 5 – ЕС ЕД-20+ліпін (0,8 ммоль/кг); 6 – ЕС ЕД-20+ацетилцистеїн (450 мг/кг); 7 – ЕС ЕД-20+омепразол (50 мг/кг); 8 – ЕС ЕД-20+клофібрат (200 мг/кг). Довірчі інтервали при  $p < 0,05$ .

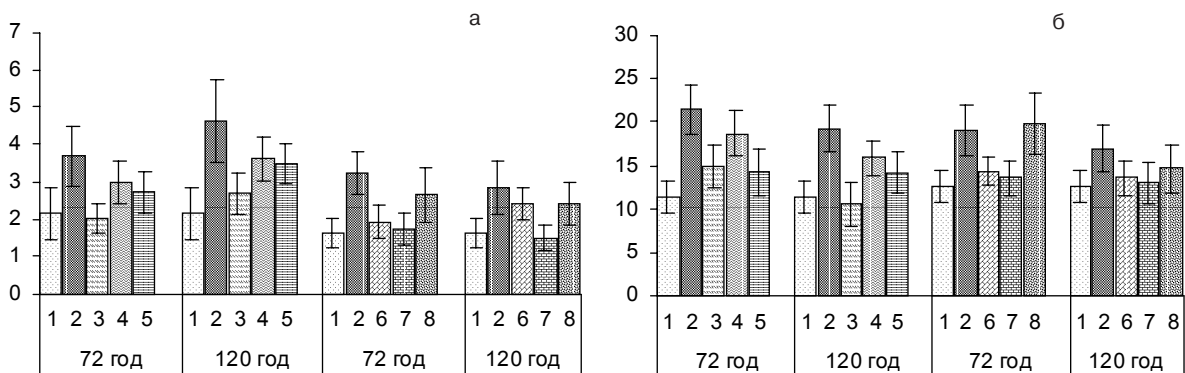


Рис. 2. Вплив лікарських засобів на активність КФ (а) і ЛФ (б) у сироватці крові щурів при гострому інгаляційно-му отруєнні леткими компонентами ЕС ЕД-20 на 72-гу і 120-ту годину після закінчення затруєння (n=8-10). На осі ординат: активність КФ у ВЕ і ЛФ у ммоль/год.л. Довірчі інтервали при  $p < 0,05$ .

**ВИСНОВКИ.** Таким чином, в результаті проведеної роботи було виявлено, що у щурів, отруєних леткими компонентами ЕС ЕД-20, в сироватці крові значно зростає активність амінотрансфераз, КФ, ЛФ, а також концентрація ХГ. Активність амінотрансфераз максимальна через 12 год після інтоксикації, КФ і ЛФ – 72-120 год, а ХГ – через 72 год. Отримані результати опосередковано свідчать про два основні типи пошкодження мембран гепатоцитів ЕС з порушенням їх проникності: цитолітичний, який може бути пов'язаний із ранньою активацією вільнорадикальних процесів [8], і холестатичний – із змінами метаболізму жовчних кислот і холестерину [2]. Слід сказати, що порушення нормальних співвідношень жовчних кислот, холестерину та інших компонентів жовчі робить неможливим утворення жовчної міцели яка тільки забезпечує

оптимальне виведення з гепатоцита усіх цих складових, більшість з яких погано розчиняється у воді, й запобігає, таким чином, розвитку холестатичних явищ [18].

Порівняльне вивчення при гострій інтоксикації ЕС ефективності індукторів епоксидгідролази омепразолу і клофібрату [11] показало, що омепразол має добре виражений детоксикуючий і гепатозахисний ефект. Дія клофібрату виражена недостатньо і статистично не достовірна.

Застосування препаратів за лікувально-профілактичною схемою до і після інтоксикації виявило високі детоксикуючі властивості у кверцетину. Деяко нижча і приблизно однакова активність спостерігалась у флавінату і ліпіну. Ацетилцистеїн при отруєнні ЕС проявляв слабовиражену ефективність, особливо в пізні строки після інтоксикації.

Таблиця 1 – Вплив досліджуваних лікарських засобів на вміст холегліцину (мкг/дл) у сироватці крові щурів при гострій динамічній інгаляційній інтоксикації леткими компонентами ЕС ЕД-20 ( $M \pm m$ , n=6-9)

Групи тварин	Строки дослідження (в годинах після впливу пошкоджувальних факторів)		
	24	72	120
Інтактні	60,83±11,12	81,86±18,09	63,67±16,76
Контроль	212,50±41,83	392,78±102,14	198,67±38,20
ЕС ЕД-20+кверцетин	111,50±22,19	142,00±38,84	42,29±6,27
$p_1$	<0,02	<0,02	<0,02
$p_2$	>0,05	>0,1	>0,25
ЕС ЕД-20+флавінат	106,71±17,28	124,37±29,14	73,00±16,16
$p_1$	<0,05	>0,1	>0,5
$p_2$	>0,05	<0,05	<0,02
ЕС ЕД-20+ацетилцистеїн	138,57±40,14	156,83±39,63	101,43±24,32
$p_1$	>0,1	>0,1	>0,1
$p_2$	>0,1	>0,05	>0,05
ЕС ЕД-20+клофібрат	148,43±51,02	213,13±21,40	146,33±41,01
$p_1$	>0,1	<0,001	>0,1
$p_2$	>0,25	>0,1	>0,25
ЕС ЕД-20+омепразол	42,80±10,07	79,29±20,56	44,17±4,87
$p_1$	>0,25	>0,5	>0,25
$p_2$	<0,01	<0,02	<0,02

Примітка.  $p_1$  – порівняно з інтактними тваринами;  $p_2$  – порівняно з контролем.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Аверьянова О.С. Состояние печени у рабочих, занятых в производстве и переработке пластических полимеров, и лечебно-профилактические мероприятия по снижению заболеваемости // Материалы пленума правления ВНОГ. – Рига, 1986. – С. 47-49.
2. Блюгер А.Ф., Майоре А.Я., Залцмане В.К. Роль нарушений функции мембран в патологии печени // Биомембраны. Структура. Функции. Медицинские аспекты. – Рига: Зинатне, 1981. – С. 185-195.
3. Блюгер А.Ф., Майоре А.Я. Молекулярно-биологический этап изучения патологии печени // Успехи гепатологии. – Рига, 1973. – Вып. 4. – С. 7-38.
4. Боканева С.А. Эпихлоргидрин, его токсиколого-гигиеническая характеристика и значение в гигиенической регламентации новых эпоксидных смол: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1980. – 22 с.
5. Вредные вещества в промышленности / Под ред. Н.В. Лазарева, Э.Н. Левиной. – Л.: Химия, 1976. – 1. – 590 с.
6. Высоцкий И.Ю. Изменения ультраструктуры клеток печени при острой интоксикации летучими компонентами эпоксидных смол и лекарственная коррекция возникших нарушений // Вісник СумДУ. – 1999. – № 3 (14). – С. 19-27.
7. Высоцкий И.Ю. Изыскание антидотно-лечебных средств при острой интоксикации эпоксидными соединениями // Вісник СумДУ. – 1999. – №1 (12). – С. 115-124.
8. Высоцкий И.Ю. Метаболические реакции и механизмы повреждения биомембран гепатоцитов в условиях острого токсического поражения печени летучими компонентами эпоксидных соединений // Вісник СумДУ. – 2000. – № 18. – С. 3-11.
9. Высоцкий И.Ю. Патоморфологические критерии эффективности ацетилцистеина и липина при токсическом поражении печени летучими компонентами эпоксидной смолы ЭД-20 // Вісник СумДУ. – 1999. – № 2 (13). – С. 142-149.
10. Высоцкий И.Ю. Токсичность и метаболизм эпоксидных соединений // Укр. мед. альманах. – 2000. – 3, № 2. – С. 43-46.
11. Высоцкий И.Ю. Фармакологическая регуляция активности ферментов, принимающих участие в метаболизме эпоксидных соединений // Вісник СумДУ. – 2002. – № 8 (41). – С. 39-48.
12. Высоцкий И.Ю., Павлова Т.В. Влияние кверцетина, омепразола и клофибрата на ультраструктуру печени крыс при токсическом поражении ее эпоксидными соединениями // Вісник проблем біол. і мед. – 2000. – Вип. 1. – С. 124-130.
13. Кобляков В.А. Цитохромы семейства P-450 и их роль в активации проканцерогенов // Итоги науки и техники. Серия: Биологическая химия. – М.: ВИНТИ, 1990. – 35. – 192 с.
14. Ли Я.Б. Токсикологическая оценка новой эпоксидной смолы и композиционных материалов на ее основе // Современ. пробл. токсикол. – 2001. – № 1. – С. 48-50.
15. Парпалей И.А. Токсикоаллергическое поражение гепатобиллиарной системы у рабочих, контактирующих с эпоксидными соединениями: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – К., 1975. – 26 с.
16. Пушкарь М.П. Основные вопросы гигиены труда при производстве и применении компаундов на основе эпоксидных смол: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – К., 1973. – 25 с.
17. Тодоров И. Клинические лабораторные исследования в педиатрии. – София, 1963. – 478 с.
18. Хазанов А.И. Функциональная диагностика болезней печени. – М.: Медицина, 1988. – 304 с.
19. Черных Л.В., Фролов А.К., Криштопа В.И. Цитогенетическое обследование рабочих производства эпоксидных смол // Гиг. труда и проф. забол. – 1990. – № 3. – С. 51-52.
20. Штабский Б.М., Гжегоцкий М.И., Гжегоцкий М.Р. и др. К методике определения средне- смертельных доз и концентраций химических веществ // Гиг. и сан. – 1980. – № 10. – С. 49-51.
21. Яворовский А.П. Гигиена труда при получении и переработке эпоксидных смол и пластических масс: Дис. ... д-ра мед. наук. – Киев, 1990. – 494 с.
22. Bessey O., Lowry O., Brock M. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum // J. Biol. Chem. – 1946. – 164, № 1. – P. 321-329.
23. Gingell R., Mitschke H.R., Dzidic I. et al. Disposition and metabolism of [2-14C] epichlorohydrin after oral administration to rats // Drug. Metab. and Disposit.: Biol. Fate Chem. – 1985. – 13, № 3. – P. 333-341.
24. Jensen J.C., Gugler R. Inhibition of human liver cytochrome P-450 by omeprazole // Brit. J. Clin. Pharmacol. – 1986. – 21, № 3. – P. 328-330.
25. Lundgren B., De Pierre J.W. Proliferation of peroxisomes and induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolases in different strains of mice and rats after dietary treatment with clofibrate // Xenobiotica. – 1989. – 19, № 8. – P. 867-881.
26. Reitman S., Francel S. A colorimetric assay of the transaminase activity // Amer. J. Clin. Pathol. – 1977. – 28, № 1. – P. 56-60.

## ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ ЛЕТУЧИМИ КОМПОНЕНТАМИ ЭПОКСИДНОЙ СМОЛЫ ЭД-20

И.Ю. Высоцкий, И.А. Комаревцева<sup>1</sup>, А.А. Качанова,  
В.И. Высоцкий<sup>2</sup>, К.Г. Каликин<sup>1</sup>, Т.П. Гречишкина<sup>1</sup>

СУМСКОЙ ГОСУДАРСТВЕННОЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ЛУГАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ<sup>1</sup>  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. А.А.БОГОМОЛЬЦА<sup>2</sup>

### Резюме

В опытах на белых крысах-самцах линии Вистар показано, что острая динамическая 4-часовая ингаляционная заправка летучими компонентами эпоксидной смолы (ЭС) ЭД-20 (120-140 мг/м<sup>3</sup> по эпихлоргидрину) сопровождается резким возрастанием в сыворотке крови животных активности аминотрансфераз (АлАТ, АсАТ), кислой фосфатазы (КФ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и холеглицина (ХГ). Активность АлАТ, АсАТ была максимальной через 12 ч после интоксикации, КФ и ЩФ – 72-120 ч, а ХГ – 72 ч, что свидетельствует о преобладании в ранние сроки явлений цитолиза, а в более поздние – холестаза. Сравнительное изучение при отравлении ЭС эффективности индукторов эпоксидгидролазы омепразола (50 мг/кг, 7 дней) и клофибрата (200 мг/кг, 2 дня) показало наличие высоких детоксицирующих свойств у первого и низких – у второго препарата. При применении препаратов по лечебно-профилактической схеме до и после интоксикации наиболее высокая эффективность обнаружена у кверцетина (350 мг/кг). Более низкая и приблизительно одинаковая фармакологическая активность наблюдалась у флавиноата (4 мг/кг) и липина (0,8 ммоль/кг). Ацетилцистеин (450 мг/кг) при отравлении ЭС проявлял сравнительно слабую эффективность, особенно в поздние сроки после интоксикации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: токсическое поражение печени, эпоксидные смолы, аминотрансферазы, кислая фосфатаза, щелочная фосфатаза, холеглицин, кверцетин, ацетилцистеин, флавиноат, липин, клофибрат, омепразол.

## USING OF MEDICINES AT THE TOXIC DAMAGE OF LIVER BY THE FLYING COMPOUNDS OF THE EPOXYDE RESINE ED-20

I.Yu. Vysotsky, I.O. Komarevtseva<sup>1</sup>, A.A. Kachanova,  
V.I. Vysotsky<sup>2</sup>, K.G. Kalikin<sup>1</sup>, T.P. Grechyshkina<sup>1</sup>

SUMY STATE UNIVERSITY  
LUHANSK STATE MEDICAL UNIVERSITY<sup>1</sup>  
NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY O.O. BOHOMOLET'S<sup>2</sup>

### Summary

In the experiments on the white rat-males of line "Wistar" showed that acute dynamic 4-hour inhalation poisoning by the flying compounds of the epoxyde resine (ER) ED-20 (120-140 mg/m<sup>3</sup> by epichlorhydrine) is followed by sharp increasing of aminotransferases (AlAT, AsAT), acidic phosphatase (AcP), alkaline phosphatase (AlP) and choleglicine (Chg) activity in the animal blood serum. Activity of AlAT, AsAT was maximum in 12 hours after the intoxication, AcP, AlP – in 72-120 hours and Chg – in 72 hours; it proved the predomination in the early terms of the cytolysis phenomena in later ones – cholestasis. Comparative learning during the poisoning by ER of the initiators' efficacy of epoxihydrolyase omeprazole (50 mg/kg, 7 days) and clofibrate (200 mg/kg, 2 days), showed the presence of the high detoxication qualities for the first and low ones for the second medicine. At using of these medicines according to the treating-preventing scheme before and after the intoxication the highest efficacy was discovered for quercetine (350 mg/kg). Lower and approximately equal level of pharmacological activity was for flavinate (4 mg/kg) and lipine (0,8 mmol/kg). Acetylcysteine (450 mg/kg) during poisoning by ER showed comparatively low expressed efficacy, especially in later terms after the intoxication.

KEY WORDS: toxic damage of liver, epoxyde resines, aminotransferase, acidic phosphatase, alkaline phosphatase, choleglicine, quercetine, acetylcysteine, flavinate, lipine, clofibrate, omeprazole.

Отримано 09.06.2003 р.

Адреса для листування: І.Ю. Висоцький, вул. Римського-Корсакова, 2, Суми, 40007, Україна.

## ДИНАМІКА ЗМІН ОКСИГЕМОГЛОБІНУ В ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ ХЛОРИДУ КАДМІЮ

Г.М. Ерстенюк

ІВАНО-ФРАНКІВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

Досліджували вплив хлориду кадмію на рівень оксигемоглобіну та співвідношення між лігандними формами гемоглобіну і загальним гемоглобіном в еритроцитах білих безпородних щурів на 1, 7, 14, 21, 28-му доби експерименту.

Результати дослідження показали, що при введенні хлориду кадмію спостерігається зниження рівня оксигемоглобіну на фоні збільшення вмісту неактивних дериватів гемоглобіну.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** кадмієва інтоксикація, оксигемоглобін, метгемоглобін, сульфгемоглобін, лігандні форми.

**ВСТУП.** Аналіз літературних джерел [1, 2, 3, 8, 10, 11] показує, що при дії солей кадмію на живі організми спостерігаються зміни як на клітинному, так і на молекулярному рівні: активація процесів вільнорадикального окиснення, порушення антиоксидної системи, розвиток оксидативного стресу тощо. Однак механізм дії кадмію не можна вважати остаточно встановленим. У зв'язку з цим, нами зроблена спроба вивчити один із метаболічних аспектів, який зумовлює регуляцію гомеостазу як на клітинному рівні, так і на рівні всього організму. Добре відомо, що інтенсивність метаболізму в клітинах залежить від надходження кисню, що, в свою чергу, визначається кисневотранспортною функцією гемоглобіну та кисневим запитом клітин. В основі дихальної функції крові лежить насичення гемоглобіну (Hb) киснем з утворенням основної лігандної форми – оксигемоглобіну (оксиHb). Метою даного дослідження було вивчити рівень оксиHb, а також співвідношення між різними лігандними формами Hb в динаміці кадмієвої інтоксикації.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди проводили на нелінійних щурах-самцях масою 140-180 г. Кадмієву інтоксикацію спричиняли внутрішньом'язовим введенням хлориду кадмію з розрахунку 1200 мкг/кг маси тіла тварини протягом 10 днів. Інтактним щурам вводили відповідну кількість 0,9 % розчину хлориду натрію. Збір матеріалу здійснювали під легким ефірним наркозом на 1, 7, 14, 21, 28-му доби після завершення введення хлориду кадмію. Концентрацію загального Hb визначали ціанметгемо-

глобіновим методом, рівень оксиHb, метHb і сульфHb – за методиками, наведеними в літературі [7]. Статистичну обробку одержаних даних проводили на персональному комп'ютері "IBM compatible" з використанням критерію Стьюдента і показника вірогідності.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Результати досліджень системи Hb інтактних тварин показали, що рівень оксиHb у них становив 120,61 г/л. Після 10-денного введення хлориду кадмію (CdCl<sub>2</sub>) вміст цієї форми Hb зменшився до 107,40 г/л і мав чітко виражену тенденцію до зниження протягом наступних періодів експерименту. Найнижчих значень даний показник набув на 14-ту добу кадмієвої інтоксикації – 80,51 г/л (рис. 1).

Щоб оцінити, наскільки тканини забезпечені киснем, необхідно вивчити динаміку змін відносного вмісту оксиHb стосовно рівня загального Hb. У попередніх дослідженнях нами показано [4, 6], що в процесі кадмієвого токсикозу має місце вірогідне зменшення вмісту загального Hb, однак в пізній період експерименту спостерігалась тенденція до нормалізації цього показника, хоча він достовірно був нижчим, ніж в інтактних тварин. Відносний рівень оксиHb в інтактних щурів становив 91,14 від загального Hb. Після введення хлориду кадмію спостерігалось вірогідне зменшення вмісту цього деривату Hb протягом всіх досліджуваних періодів. Зокрема, на 28-му добу кадмієвої інтоксикації вміст оксиHb становив тільки 67,59 %, незважаючи на зростання рівня загального Hb. Одержані дані дають підстави вважати, що кадмії спричиняє істотні

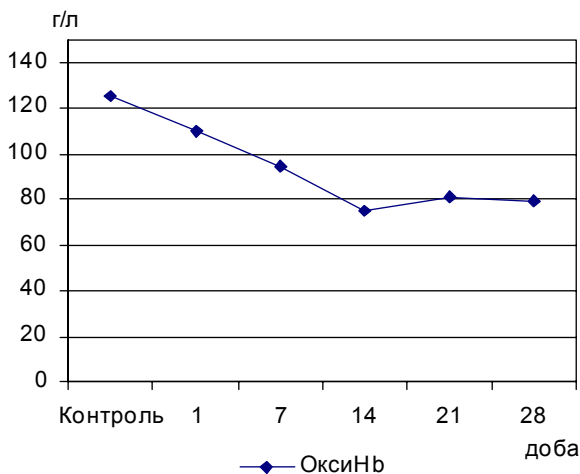


Рис. 1. Динаміка змін оксиНб в процесі кадмієвої інтоксикації.

порушення в системі Нб. Підтвердженням цього є накопичення таких лігандів Нб, як метНб і сульфНб, які досліджено раніше [8]. Крім того, слід зауважити високий рівень інших неактивних дериватів Нб у тварин в процесі кадміозу, за винятком 7-ї доби (рис. 2). Їх сумарний вміст в інтактних щурів становив 7,56 %, на 1-шу добу експерименту він зріс до 9,99 %, а на 28-му досягнув 28,05 % від загального Нб [5].

Наведені дані вказують на порушення мо-

лекулярних основ дихальної функції крові й певною мірою пояснюють розвиток тканинної гіпоксії при кадмієвому токсикозі. Одна із можливих причин такого порушення може бути зумовлена дією кадмію на глобіновий компонент Нб. Згідно з літературними даними [9], на поверхні глобіну є певна кількість SH-груп, а кадмій відомий як тіолова отрута, що здатна зв'язуватись з білками за допомогою сульфгідрильних груп і таким чином інактивувати їх.

З іншого боку, високий рівень мет- і сульфНб, недостатня активність лактатдегідрогенази еритроцитів [3], яку ми спостерігали при кадмієвій інтоксикації, також можуть впливати на кисневотранспортну функцію Нб.

Визначення окремих форм Нб дозволяє деталізувати стан оксигенації тканин. Одержані дані спонукають до подальшого дослідження функціональної здатності Нб за дії біоцидних ксенобіотиків, зокрема важких металів.

**ВИСНОВОК.** Хлорид кадмію спричиняє зміни в системі Нб щурів, які полягають у зниженні рівня оксиНб та збільшенні вмісту неактивних лігандів, що зумовлює порушення кисневотранспортної функції Нб і є однією з причин розвитку тканинної гіпоксії.

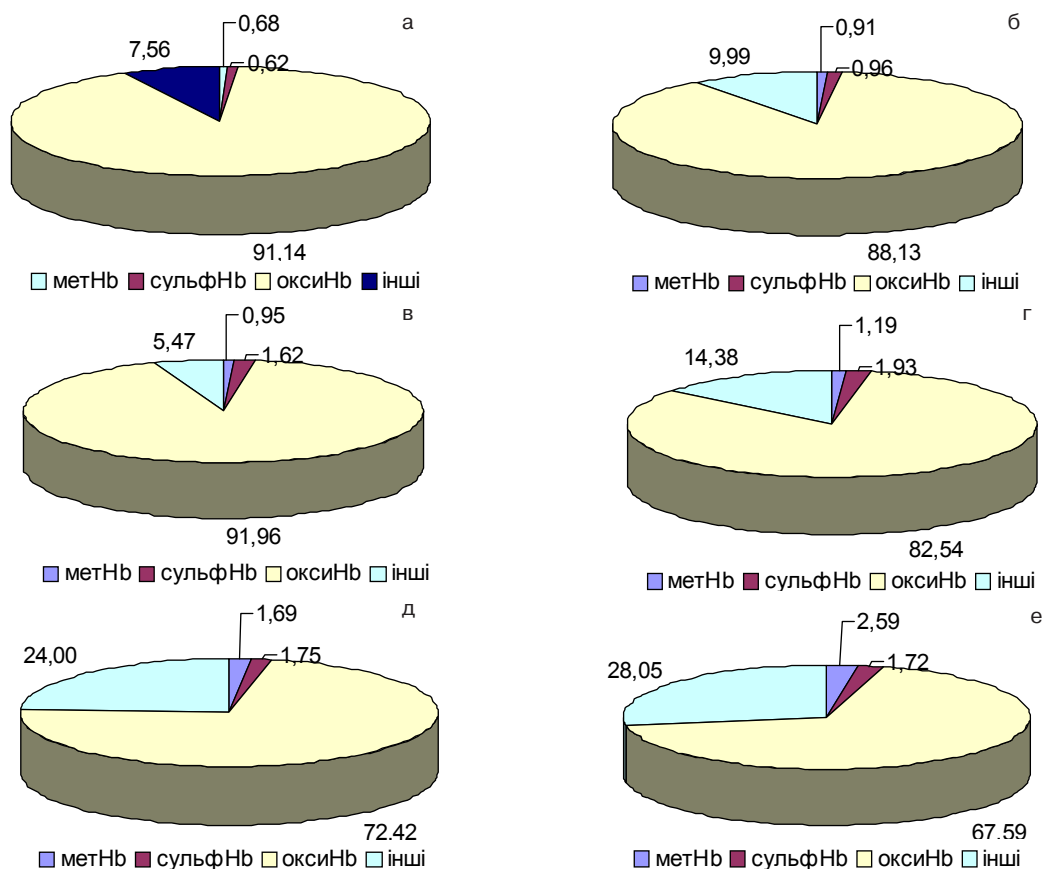


Рис. 2. Вміст лігандних форм гемоглобіну за умов кадмієвої інтоксикації (%):

а – інтактна група; б – 1-ша доба; в – 7-ма доба; г – 14-та доба; д – 21-ша доба; е – 28-ма доба.



## ЛІТЕРАТУРА

1. Гонський Я.І., Ястремська С.О., Бойчук Б.Р. Вікові особливості порушення перекисного окиснення ліпідів і активності енергозабезпечувальних ферментів при кадмієвій інтоксикації // Мед. хімія. – 2001. – **3**, № 1. – С. 16-19.
2. Губський Ю.І. Вільнорадикальні реакції у ядерному хроматині // Укр. біохім. журн. – 1995. – **1**, № 2. – С. 216-292.
3. Губський Ю.І., Ерстенюк Г.М. Система "лактатдегідрогеназа-метгемоглобін" та окиснювальні модифікації білків еритроцитів за умов кадмієвої інтоксикації // Мед. хімія. – 2003. – **5**, № 1. – С. 9-12.
4. Ерстенюк Г.М. Вплив хлориду кадмію на систему еритроциту // Експерим. фізіол. та біохім. – 2002. – № 2. – С. 25-29.
5. Калиман П.А., Баранник Т.В. Метаболізм гема і оксидативний стресс // Укр. біохім. журн. – 2001. – **1**, №1. – С. 5-13.
6. Каркоцкая Т.П., Бачило С.М., Лепешкевич С.В. и др. Влияние сочетанного действия  $\gamma$ -излучения и нитрита натрия на окислительную чувствительность гемоглобина крыс // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 3. – С. 5-13.
7. Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина. – Л.: Медицина, 1968. – 324 с.
8. Нейко Є.М., Губський Ю.І., Ерстенюк Г.М. Інтоксикація кадмієм: токсико-кінетика і механізм біоцидних ефектів // Журн. АМН України. – 2003. – **9**, № 2. – С. 250-261.
9. Стародуб Н.Ф., Назаренко В.И. Гетерогенная система гемоглобина. – К.: На-ук. думка, 1987. – 198 с.
10. Штабський Б.М., Гжегоцький М.Р. Ксенобіотики, гомеостаз і хімічна безпека людини. – Львів: Наутилус, 1998. – 308 с.
11. Oberdorster G. Airborne cadmium and carcinogenesis of the respiratory tract // Scand. J. Work. Environ. Health. – 1986. – **12**. – P. 523-537.

## ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ ОКСИГЕМОГЛОБИНА У КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ХЛОРИДА КАДМИЯ

**А.М. Эрстенюк**

ИВАНО-ФРАНКОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

### Резюме

Исследовали влияние хлорида кадмия на уровень оксигемоглобина и соотношение между лигандными формами гемоглобина и общим гемоглобином в эритроцитах белых беспородных крыс на 1, 7, 14, 21, 28-е сутки эксперимента.

Результаты исследования показали, что при введении хлорида кадмия наблюдается снижение уровня оксигемоглобина на фоне увеличения содержания неактивных дериватов гемоглобина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **кадмиевая интоксикация, оксигемоглобин, метгемоглобин, сульфгемоглобин, лигандные формы.**

## THE DYNAMICS OF OXYHEMOGLOBIN CHANGES IN RATS AFTER CADMIUM CHLORIDE INJECTION

**H.M. Ersteniuk**

IVANO-FRANKIVSK STATE MEDICAL ACADEMY

### Summary

Cadmium chloride effect on the oxyhemoglobin level and correlation between ligand forms of hemoglobin and total hemoglobin in the erythrocytes of white inbred rats were investigated on the 1-st, 7-th, 14-th, 21-st and 28-th day of the experiment.

The results of the study showed the decrease of oxyhemoglobin level after cadmium chloride injection against a background of the increase of hemoglobin non-active derivatives content.

KEY WORDS: **cadmium intoxication, oxyhemoglobin, methemoglobin, sulfhemoglobin, ligand forms.**

Отримано 09.10.2003 р.

Адреса для листування: Г.М. Ерстенюк, вул. Галицька, 120, кв. 22, Івано-Франківськ, 74008, Україна.

## ВПЛИВ МІЛДРОНАТУ ТА ТІОТРИАЗОЛІНУ НА ВМІСТ ОКИСНЮВАЛЬНОМОДИФІКОВАНИХ БІЛКІВ ТА МАЛОНОВОГО ДІАЛЬДЕГІДУ В КОМПЛЕКСНОМУ ЛІКУВАННІ ДІАБЕТИЧНОЇ ПОЛІНЕЙРОПАТІЇ

**І.І. Білоус, І.Ф. Мецишен**

*БУКОВИНСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ*

*Вивчено вплив мілдронату та тіотриазоліну на процеси окиснювальної модифікації білків і вміст малонового діальдегіду в комплексному лікуванні діабетичної полінейропатії. Найбільший позитивний вплив виявлено при одночасному застосуванні даних препаратів порівняно з базисним лікуванням.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** діабетична полінейропатія, цукровий діабет, окиснювальна модифікація білків, малоновий діальдегід.

ВСТУП. Одним з найчастіших неврологічних ускладнень цукрового діабету є діабетична полінейропатія (ДПН). Велику роль в її розвитку відіграє оксидний стрес, який супроводжується збільшенням в організмі кількості активних форм кисню (АФК). Вони беруть участь в обміні білків, ліпідів, вуглеводів, нуклеїнових кислот, синтезі простагландинів, лейкотриєнів, тромбоксанів, регуляції проникності клітинної мембрани, процесах фагоцитозу. Нині нагромаджено багато даних, що стосуються вивчення механізму перекисного окиснення ліпідів клітинних мембран, його ролі в діяльності клітини за умов фізіологічної норми і в патогенезі різноманітних захворювань. Разом з тим, з кожним роком зростає кількість публікацій про те, що АФК можуть викликати окиснювальне руйнування та модифікацію не тільки ліпідів, але й білків і нуклеїнових кислот. Що стосується механізму окиснювальної модифікації білків (ОМБ), яка має місце в органах і тканинах при оксидному стресі, то нині він дуже мало вивчений [1, 5, 10]. Привертає увагу необхідність подальшого вивчення проблеми лікування ДПН. З огляду на це, перспективним є вивчення механізму дії мілдронату (МД) та тіотриазоліну (ТТЗ). МД, 3-(2,2,2-триметилгідразиній) пропіонат, структурний аналог природного метаболіту  $\gamma$ -бутиробетайну, який забезпечує захист серця за умов гіпоксії та ішемії. Під впливом МД

© І.І. Білоус, І.Ф. Мецишен – д.біол.н., проф., 2003.

окиснення жирних кислот переходить на більш ефективний шлях, який призводить до зниження вмісту продуктів переокиснення і зменшення пошкодження клітинних мембран [4, 7]. Встановлено, що основний фармакологічний ефект ТТЗ зумовлений протишемічною, антиоксидною та мембраностабілізуювальними властивостями [3].

Мета роботи – обґрунтувати використання МД та ТТЗ у комплексному лікуванні хворих на ДПН на основі вивчення вмісту в крові ОМБ та малонового діальдегіду (МДА).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Обстежено 94 хворих на цукровий діабет (ЦД) II типу, які перебували на стаціонарному лікуванні в Чернівецькому обласному клінічному ендокринологічному диспансері та неврологічному відділенні Чернівецької психіатричної лікарні, зокрема 36 жінок та 58 чоловіків віком від 35 до 65 років. ЦД середнього ступеня тяжкості спостерігався у 90 осіб, тяжкий – у 4, у т. ч. компенсований – у 14, субкомпенсований – у 80. Пацієнтів було поділено на 3 групи: 1-ша – хворі на ЦД терміном до 1 року (29 осіб); 2-га – терміном до 10 років (35 осіб); 3-тя – терміном понад 10 років (30 осіб).

Додатково хворих було поділено на 4 підгрупи: I – 23 пацієнти, які отримували базисну терапію (дієта № 9, манініл – по 5 мг двічі на добу або інсулінотерапія – 2/3 добової дози

вранці та 1/3 добової дози ввечері з розрахунку 0,7-1,0 Од на 1 кг маси, пентоксифілін – по 5 мл внутрішньовенно краплинно на 250 мл ізотонічного розчину хлориду натрію, вітаміни В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>); II – 22 хворих, які на фоні базисного лікування отримували МД (5 мл 10 % розчину внутрішньовенно 1 раз на добу впродовж двох тижнів); III – 22 хворих, які на фоні базисного лікування приймали ТТЗ (2 мл 2,5 % розчину внутрішньом'язово 1 раз на добу впродовж двох тижнів); IV – 27 пацієнтів, які на фоні базисного лікування одержували МД (5 мл 10 % розчину внутрішньовенно 1 раз на добу) та ТТЗ (2 мл 2,5 % розчину внутрішньом'язово 1 раз на добу впродовж двох тижнів).

Контрольну групу склали 20 практично здорових осіб.

Біохімічним дослідженням піддавали еритроцити та плазму крові хворих і донорів, забір якої здійснювали вранці натщесерце. Біохімічні показники у хворих визначали до лікування (на 1-2 добу госпіталізації) і після нього (на 14 добу).

Вміст МДА в еритроцитах крові визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК). В основі методу лежить реакція між МДА і ТБК, яка при високій температурі і кислому значенні рН перебігає з утворенням забарвленого триметинового комплексу, що містить одну молекулу малонового діальдегіду і дві молекули тіобарбітурової кислоти. Максимум поглинання комплексу – при 532 нм. На основі молярного коефіцієнту екстинкції ( $1,56 \cdot 10^5$  моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>) розраховували вміст МДА [3].

ОМБ плазми (сироватки) крові визначали за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразиним [9]. Принцип методу базується на тому, що в процесі ОМБ плазми (сироватки) крові в радикалах залишків аліфатичних амінокислот утворюються альдегідні й кетонні групи. Останні взаємодіють з 2,4-динітрофенілгідразиним з

утворенням 2,4-динітрофенілгідразонів, що мають характерний спектр поглинання. Альдегідо- і кетонпохідні нейтрального характеру реєструються при 370 нм, а основного характеру – при 430 нм. На основі молярного коефіцієнта екстинкції ( $2,1 \cdot 10^4$  моль<sup>-1</sup>·см<sup>-1</sup>) визначали вміст фенілгідразонів при 370 нм.

Кількість білка в плазмі крові визначали біуретовим методом.

Одержані дані опрацьовано методами математичної статистики з визначенням середньої арифметичної величини (M), середньої похибки середньої арифметичної величини (m), а також критерію Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** У плазмі крові хворих на ДПН відмічалось зростання рівня ОМБ за рахунок активації утворення АФК, що підтверджується високим вмістом кінцевого продукту ПОЛ – МДА. Показники його вмісту в еритроцитах крові хворих на ДПН наведено в таблиці 1. Так, виявлено достовірне збільшення вмісту МДА на 39,2 % в 1-й групі, на 62,3 % – в 2-й групі та на 94,1 % – в 3-й групі порівняно з контрольною групою, яке залежало від тривалості ЦД з ДПН, що узгоджується з даними [8]. Після базисного лікування відмічались вірогідне зниження рівня МДА у хворих з тривалістю ДПН до 1 року ( $p < 0,05$ ) та тенденція до зменшення його вмісту в еритроцитах крові в 2-й та 3-й групах ( $p > 0,05$ ). У пацієнтів, яким на фоні базисного лікування призначали МД, вміст МДА достовірно знизився на 16,9 % в 1-й групі, на 19,3 % – в 2-й групі та на 8,3 % – в 3-й групі. У хворих, які, крім базисного лікування, приймали ТТЗ, рівень МДА в еритроцитах зменшився на 19,7 % в 1-й групі, на 22,1 % – в 2-й групі та на 13,1 % – в 3-й групі ( $p < 0,01$ ). У пацієнтів 1-ї групи, які на фоні базисного лікування отримували одночасно МД

Таблиця 1 – Вміст малонового діальдегіду в еритроцитах крові хворих на діабетичну полінейропатію, (мкмоль/л)

Групи хворих	До лікування	Базисне лікування	Базисне лікування+МД	Базисне лікування+ТТЗ	Базисне лікування+МД та ТТЗ
Контрольна	20,40±0,43				
1-ша (до 1 року)	28,40±0,87 ( $p < 0,01$ )	26,40±0,56 ( $p_1 < 0,05$ )	23,60±0,52 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )	22,80±0,78 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )	21,9±1,1 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )
2-га (до 10 років)	33,10±0,51 ( $p < 0,01$ )	32,7±1,2 ( $p_1 > 0,05$ )	26,70±0,89 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )	25,80±0,74 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )	23,2±1,5 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )
3-тя (понад 10 років)	39,60±0,59 ( $p < 0,01$ )	37,70±0,78 ( $p_1 > 0,05$ )	36,30±0,74 ( $p_1 < 0,05$ ) ( $p_2 > 0,05$ )	34,40±0,86 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,05$ )	32,30±0,98 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )

Примітка.  $p$  – достовірність порівняно з контрольною групою;

$p_1$  – достовірність порівняно з хворими до лікування;

$p_2$  – достовірність порівняно з хворими після базисного лікування.

та ТТЗ, вміст МДА знизився на 22,9 % і практично досяг нормального рівня, в 2-й групі – на 29,9 %, в 3-й групі – на 18,4 % ( $p < 0,01$ ).

У нервовій тканині при патологічних станах особливе місце займає окиснювальна модифікація білків. Вважається, що окиснювальна деструкція білків, а не ПОЛ, є маркером патологічних змін у нервовій тканині [5]. З окиснювальною деструкцією білків пов'язані порушення рецепторного апарату нейронів, іонних каналів і насосів. Показано, що окиснювальне пошкодження білків призводить до зниження активності  $\text{Na}^+$ -,  $\text{K}^+$ -АТФ-ази, глутамінсинтетази, ферментів, що забезпечують підтримку іонного градієнта і зменшення концентрації збудливих медіаторів [6]. Зменшення вмісту імунореактивних основних мієлінових білків, гліальних фібрилярно-кислих і у ділянці ураження мієліну також зумовлене окиснювальною деструкцією останніх.

Показники вмісту альдегідо- і кетонпохідних нейтрального характеру у хворих на ДПН до та після проведеного лікування наведено в таблиці 2. У пацієнтів з ДПН відмічалось зростання цих похідних: у 1-й групі – на 86,8 %, в 2-й та в 3-й – більше ніж в 2 рази порівняно з контрольною групою ( $p < 0,01$ ). Після базисного лікування відзначалась тенденція до зменшення вмісту альдегідо- і кетонпохідних нейтрального характеру в усіх трьох групах ( $p > 0,05$ ). У пацієнтів, яким додатково призначали МД, рівень цих похідних знизився на 37,9 % в 1-й групі, на 36,8 % – в 2-й та на 25,7 % – в 3-й ( $p < 0,01$ ). У хворих, які на фоні базисного лікування приймали ТТЗ, вміст альдегідо- і кетонпохідних нейтрального характеру знизився на 35,1 % в 1-й групі, на 34,4 % – в 2-й та на 28,9 % – в 3-й ( $p < 0,01$ ). У пацієнтів, які, крім базисного лікування, отримували ТТЗ та МД, вміст цих похідних зменшився на 45,0 % в 1-й

групі та практично досяг нормального рівня, на 42,6 % – в 2-й та на 47,9 % – в 3-й ( $p < 0,01$ ).

АФК – супероксидний аніон-радикал, пероксид водню та гідроксильні радикали – здатні здійснювати окиснювальну модифікацію як ізольованих білків, так і білків інтактних клітин та внутрішньоклітинних органел. Специфіка окиснювальної модифікації зумовлюється особливістю амінокислотного складу білків і супроводжується, як правило, фрагментацією та розпадом на низькомолекулярні компоненти, що робить їх більш чутливими до протеолізу. Зміни активності ферментів під дією АФК пояснюються локальними порушеннями в ділянці активного центру або будь-якій функціональній ділянці білкової молекули, які можуть бути пов'язані з окиснювальною модифікацією амінокислотних залишків (сірковмісних амінокислот, гістидину, триптофану, тирозину тощо), зміною валентності та конформаційної геометрії іонів металів з перехідною валентністю у ферментах. До білків, окиснювальна модифікація яких супроводжується зміною активності, належать і ферменти антиоксидного захисту (супероксиддисмутаза, каталаза та Se-глутатіонпероксидаза), оскільки всі три є металоферментами [2].

Показники вмісту альдегідо- і кетонпохідних основного характеру у хворих на ДПН до та після проведеного лікування наведено в таблиці 3. У пацієнтів з ДПН відмічалось зростання рівня цих похідних: у 1-й в I групі – у 2 рази, в 2-й та в 3-й – більше ніж у 2 рази порівняно з контрольною групою ( $p < 0,01$ ). Після базисного лікування відзначалась тенденція до зменшення вмісту альдегідо- і кетонпохідних основного характеру в усіх трьох групах ( $p > 0,05$ ). У пацієнтів, яким додатково призначали МД, рівень цих похідних зменшився на 37,6 % в 1-й групі, на 31,3 % – в 2-й групі та на 29,7 % – в 3-й групі ( $p < 0,01$ ). У хворих, які

Таблиця 2 – Вміст альдегідо- і кетонпохідних нейтрального характеру ( $\lambda$  370), ммоль/г білка

Групи хворих	До лікування	Базисне лікування	Базисне лікування+МД	Базисне лікування+ТТЗ	Базисне лікування+МД та ТТЗ
Контрольна	1,51±0,12				
1-ша (до 1 року)	2,82±0,09 ( $p < 0,01$ )	2,52±0,08 ( $p_1 < 0,05$ )	1,75±0,14 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )	1,83±0,13 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )	1,55±0,18 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )
2-га (до 10 років)	3,26±0,12 ( $p < 0,01$ )	2,89±0,13 ( $p_1 > 0,05$ )	1,96±0,15 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )	1,94±0,14 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )	1,77±0,16 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )
3-тя (понад 10 років)	3,69±0,15 ( $p < 0,01$ )	3,53±0,14 ( $p_1 > 0,05$ )	2,74±0,19 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,05$ )	2,62±0,18 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )	1,92±0,14 ( $p_1 < 0,01$ ) ( $p_2 < 0,01$ )

Примітка.  $p$  – достовірність порівняно з контрольною групою;  
 $p_1$  – достовірність порівняно з хворими до лікування;  
 $p_2$  – достовірність порівняно з хворими після базисного лікування.

Таблиця 3 – Вміст альдегідо- і кетонпохідних основного характеру ( $\lambda$  430),

Групи хворих	До лікування	Базисне лікування	Базисне лікування+МД	Базисне лікування+ТТЗ	Базисне лікування+МД та ТТЗ
Контрольна	19,48±2,60				
1-ша (до 1 року)	38,96±2,90 ( $p_2 < 0,01$ )	34,22±1,80 ( $p > 0,05$ )	24,31±2,30 ( $p < 0,01$ ) ( $p_1 < 0,01$ )	23,02±2,70 ( $p < 0,01$ ) ( $p_1 < 0,01$ )	20,34±2,50 ( $p < 0,01$ ) ( $p_1 < 0,01$ )
2-га (до 10 років)	41,88±2,80 ( $p_2 < 0,01$ )	38,43±2,10 ( $p > 0,05$ )	28,77±2,30 ( $p < 0,01$ ) ( $p_1 < 0,01$ )	27,05±2,20 ( $p < 0,01$ ) ( $p_1 < 0,01$ )	23,54±2,80 ( $p < 0,01$ ) ( $p_1 < 0,01$ )
3-тя (понад 10 років)	44,22±2,10 ( $p_2 < 0,01$ )	39,54±2,20 ( $p > 0,05$ )	30,12±2,50 ( $p < 0,01$ ) ( $p_1 < 0,01$ )	31,09±2,40 ( $p < 0,01$ ) ( $p_1 < 0,01$ )	25,78±2,80 ( $p < 0,01$ ) ( $p_1 < 0,01$ )

Примітка.  $p$  – достовірність порівняно з контрольною групою;  
 $p_1$  – достовірність порівняно з хворими до лікування;  
 $p_2$  – достовірність порівняно з хворими після базисного лікування.

на фоні базисного лікування приймали ТТЗ, вміст альдегідо- і кетонпохідних основного характеру знизився на 40,9 % в 1-й групі, на 35,4 % – в 2-й групі та на 28,8 % – в 3-й групі ( $p < 0,01$ ). У пацієнтів, які, крім базисного лікування, отримували ТТЗ та МД, рівень цих похідних зменшився на 47,8 % в 1-й групі та практично досяг нормального рівня, на 43,8 % – в 2-й групі та на 41,7 % – в 3-й групі ( $p < 0,01$ ).

У патогенезі uszkodження тканин та органів при ЦД можна виділити три взаємопов'язаних та взаємозумовлюючих ланки: метаболічну (пов'язану зі змінами метаболізму глюкози), вільнорадикальну (спричинену розвитком оксидного стресу) та судинну (розвиток мікро- макроангіопатій, реологічні зсуви та зміни в системі гемостазу). Кожна з них тією чи іншою мірою стосується метаболізму жирних кислот, який має особливе значення для нервової тканини. Важливу роль в забезпеченні нормального метаболізму жирних кислот відіграють карнітин та його похідні. Механізм дії МД, на наш погляд, можна пояснити таким чином. МД є аналогом гамма-бутиробетайну та конкурує з ним за рецептори гамма-бутиро-бетайн-гідроксилази – кінцевого ферменту у ланцюзі біосинтезу карнітину [7]. При зниженні концентрації карнітину у цитозолі зменшується і швидкість транспорту жирних кислот у мітохондрії. Тобто під впливом МД окиснення жирних кислот переходить на шлях, який призво-

дить до зниження вмісту продуктів перекисного окиснення і зменшення пошкодження клітинних мембран. З іншого боку, антиоксидна активність ТТЗ реалізується шляхом взаємодії електронної хмари п'ятичленного циклу з вільними радикалами та утворення неактивних продуктів або продуктів, швидкість рекомбінації яких набагато менша від швидкості перебігу ланцюгових вільнорадикальних реакцій [3].

Таким чином, найкращий ефект при поєднаному застосуванні МД та ТТЗ можна пояснити різним механізмом дії на патогенетичні ланцюги розвитку ДГПН.

**ВИСНОВКИ.** 1. У крові хворих на діабетичну полінейропатію відмічається достовірне збільшення вмісту малонового діальдегіду, альдегідо- і кетонпохідних нейтрального та основного характеру, що свідчить про підвищення окиснювальної модифікації білків.

2. Під впливом базисного лікування рівень малонового діальдегіду, альдегідо- і кетонпохідних нейтрального та основного характеру істотно не змінюється. Після додаткового призначення мілдронату або тіотриазоліну відзначається вірогідне зменшення вмісту малонового діальдегіду, альдегідо- і кетонпохідних нейтрального та основного характеру. Найкращий результат спостерігається при одночасному призначенні мілдронату та тіотриазоліну.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Балаболкин М.И., Креминская В.М. Диабетическая невропатия // Журн. неврол. и психиатрии. – 2000. – 10, № 3. – С. 57-64.
2. Болдырев А.А., Булыгина Е.Р., Волынская Е.А.

и др. Влияние пероксида водорода и гипохлорида на активность  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азы мозга // Биохимия. – 1995. – 60, № 10. – С. 1688-1695.

3. Васильева Н.В., Мещишен І.Ф., Мудрик З.А.

Мембраностабілізуюча та антиоксидантна дія тиотриазоліну // Укр. наук.-мед. молодіж. журн. – 1998. – № 2-3. – С. 38-41.

4. Волков В.И., Запровальная О.Е., Ченчик Т.А. Применение милдроната при ишемической болезни сердца // Вісн. фармації. – 2001. – 27, № 3. – С. 129.

5. Дубинина Е.Е., Шугалей И.В. Окислительная модификация белков // Усп. совр. биол. – 1993. – 113, № 1. – С. 71-81.

6. Ерин А.Н., Гуляева Н.В., Никушкин Е.В. Свободнорадикальные механизмы в церебральных патологиях // Бюл. эксперим. биол. – 1994. – 118, № 10. – С. 343-344.

7. Карпов Р.С., Кошельская О.А., Врублевский А.В. и др. Клиническая эффективность и без-

опасность милдроната при лечении хронической сердечной недостаточности у больных ишемической болезнью сердца // Кардиология. – 2000. – № 6. – С. 69-74.

8. Лебедева Е.А. Антиокислительные системы плазмы крови в патогенезе диабетических микроангиопатий // Пробл. эндокринологии. – 1996. – № 5. – С. 10-12.

9. Мещишен І.Ф. Метод визначення окислювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // Буковин. мед. вісник. – 1998. – 2, №1. – С. 156-158.

10. Мещишен І.Ф., Польовий В.П. Механізм окиснювальної модифікації білків // Буковин. мед. вісник. – 1999. – 3, № 1. – С. 196-205.

## ВЛИЯНИЕ МИЛДРОНАТА И ТИОТРИАЗОЛИНА НА СОДЕРЖАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОМОДИФИЦИРОВАННЫХ БЕЛКОВ И МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ ПОЛИНЕЙРОПАТИИ

**И.И. Билоус, И.Ф. Мещишен**

БУКОВИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

### Резюме

*Изучено влияние милдроната и тиотриазолина на процессы окислительной модификации белков и содержание малонового диальдегида в комплексном лечении диабетической полинейропатии. Наиболее положительное влияние выявлено при одновременном использовании данных препаратов по сравнению с базисным лечением.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** диабетическая полинейропатия, сахарный диабет, окислительная модификация белков, малоновый диальдегид.

## THE INFLUENCE OF MILDRONAT AND TIOTRIAZOLIN ON THE CONTENTS OF OXIDATIVE-MODIFIED PROTEINS AND MALON DIALDEHYDE IN COMPLEX TREATMENT OF DIABETIC POLYNEUROPATHY

**I.I. Bilous, I.F. Meshchishen**

BUCOVYNIAN STATE MEDICAL ACADEMY

### Summary

*The influence of mildronat and tiotriazolin on the processes of oxidative modification of proteins and contents of malon dialdehyde has been studied in a course of complex treatment of diabetic polyneuropathy. The most positive influence has been revealed in case of simultaneous use of these medicines in comparison with the basic treatment.*

**KEY WORDS:** diabetic polyneuropathy, diabetes mellitus, oxidative modification of proteins, malon dialdehyde.

Отримано 02.09.2003 р.

Адреса для листування: І.І. Білоус, вул. Полетаєва, 23, кв. 50, Чернівці, 58018, Україна.

## СТИМУЛЮВАННЯ МЕТАБОЛІЗМУ ГЛІКОЗАМІНОГЛІКАНІВ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ В УМОВАХ ДИСТРОФІЇ КОМПОЗИЦІЄЮ ГЛЮКОЗАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ З ПАРАЦЕТАМОЛОМ

І.А. Зупанець, В.О. Туляков

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ, ХАРКІВ

У статті наведено інформацію про результати порівняльного дослідження впливу субстанцій та композицій глюкозаміну з парацетамолом на обмін глікозаміногліканів гіалінового хряща великих суглобів в умовах кортикостероїдної дистрофії. Показано, що модифікація парацетамолу аміноцукром глюкозаміном покращує їх вплив на суглобовий хрящ із підвищенням біосинтезу, накопиченням глікозаміногліканів у суглобовому хрящі та зниженням рівня їх метаболітів у крові.

Композиція глюкозаміну із парацетамолом у співвідношенні 2:1 у дозі 50 мг/кг продемонструвала слабкий хондропротекторний ефект на моделі кортикостероїдної дистрофії сполучної тканини і мало-придатна для використання як препарат, що модифікує перебіг остеоартрозу.

Результати кількісного аналізу макромолекул сполучної тканини свідчать про істотну активацію білково-синтетичних процесів в експериментальних тварин унаслідок лікування глюкозамінам з парацетамолом у співвідношеннях 8:1 та 4:1 у дозі 50 мг/кг.

У ході експериментів найбільш сприятливий вплив на хрящову тканину, що перебуває в стані кортикостероїдної дистрофії, було зафіксовано при співвідношенні зазначених компонентів 4:1, що склало для глюкозаміну гідрохлориду 40 мг/кг, а для парацетамолу – 10 мг/кг.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** глюкозамін, парацетамол, глікозаміноглікан, дистрофія, біохімія, експеримент.

ВСТУП. Значне розповсюдження впродовж останніх десятиріч дистрофічно-деструктивних захворювань опорно-рухового апарату потребує вжиття негайних заходів з протидії процесам інвалідизації працездатного населення та покращання умов життя [4]. Головним методом боротьби з остеоартрозами, які складають переважну більшість таких захворювань, є медикаментозна корекція [6]. Для лікування захворювань сполучної тканини найчастіше використовують нестероїдні протизапальні засоби, що здатні на якийсь час зменшити біль та прояви запального процесу, але водночас прискорюють розвиток дистрофії та деструкції хрящової тканини великих суглобів [5, 7, 10]. Останнім часом арсенал ліків поповнили так звані хондропротекторні препарати, які стимулюють анаболічні та пригнічені катаболічні процеси у сполучній тканині [4]. На жаль, як показує практика, ці засоби теж мають деякі недоліки, зокрема в них практично відсутні протибольові властивості. Протизапальна активність таких лікарських препаратів буває вельми обмеженою за силою, що є слабким місцем при боротьбі із остеоартрозами, які звичайно супроводжуються розвинутими запальними усклад-

© І.А. Зупанець – д.мед.н., проф., В.О. Туляков – к.фарм.н., 2003.

неннями та сильним больовим синдромом [6]. Запальні процеси також самі по собі прискорюють руйнацію хрящової тканини, зокрема вільними радикалами, які формуються при патологічній активації обміну речовин у сполучній тканині запаленого суглоба [4]. Враховуючи вищезазначене, стає зрозумілою доцільність створення комбінованих протиартрозних засобів, котрі поєднували б в собі корисний вплив на сполучну тканину та створювали б умови для покращання якості життя пацієнта, зменшуючи біль та інші суб'єктивні прояви запального процесу. Найбільш активною хондропротекторною речовиною багато авторів вважає аміноцукор глюкозамін, який давно використовують як хондропротекторний засіб у вигляді сульфату [9]. Метою нашої роботи було дослідити доцільність поєднання у одній лікарській формі протиартрозного препарату глюкозаміну гідрохлориду і парацетамолу – відомого нестероїдного протизапального засобу, у якого переважають протибольові властивості. Як свідчать дані науково-медичної літератури, інформативними є біохімічні дослідження матриксу сполучної тканини, які дають можливість отримати велику кількість знань про її стан [10], а також про переважний напрямок процесів обміну речовин в ній [8, 9].

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Кортикостероїдну дистрофію у експериментальних 3-місячних білих щурів-самців лінії Wistar масою 180-200 М моделювали за методом R.G. Gray і N.L. Gottlieb [8] з нашими модифікаціями, що полягали в зменшенні добової дози гідрокортизону ацетату до 200 мг/кг і збільшенні тривалості введення до 14 діб. Досліджувані субстанції та композиції вводили перорально один раз на день у водяному розчині чи суспензії без стабілізатора протягом 21 доби. Після закінчення експерименту піддослідних тварин декапітували під ефірним наркозом. При цьому проводили забір крові та хрящового покриття тазостегнових, плечових і колінних суглобів.

У ході досліджень нами було вивчено три композиції глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом з масовими співвідношеннями 2:1, 4:1 і 8:1 у сумарній дозі 50 мг/кг. При цьому в співвідношенні 2:1 доза глюкозаміну складала 35 мг/кг, парацетамолу – 15 мг/кг, у співвідношенні 4:1 – 40 і 10 мг/кг відповідно, у співвідношенні 8:1 – 45 і 5 мг/кг відповідно.

Ефективність досліджуваних композицій вивчали з використанням комплексу біохімічних методів оцінки стану сполучної тканини, у тому числі показників, що характеризують метаболізм глікозаміногліканів (ГАГ), а саме: фракційний склад ГАГ у суглобовому хрящі досліджували за методом Л.І. Слущького [3], у сироватці крові – за способом [1].

Результати біохімічних досліджень статистично обробляли за методом Фішера-Стьюдента з визначенням для кожної групи за всіма вивченими показниками середніх арифметичних, стандартного відхилення і вірогідності ряду [2]. Після цього результати рядів експериментальних груп порівнювали з даними контрольної групи, а також між собою. Статистично достовірним вважали розходження при  $p < 0,05$  і менше.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Лікування експериментальних тварин з кортикостероїдною дистрофією композицією глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом у співвідношенні 2:1 призводило до значної нормалізації фракційного складу і сумарного вмісту ГАГ у суглобовому хрящі. Так, вміст фракцій гіалуронатів, хондроїтинсульфатів і високосульфатованих ГАГ, а також суми ГАГ, у суглобовому хрящі після прийняття зазначених препаратів підвищився, відповідно, на 54,55; 15,33; 22,22 і 25,95 % (табл. 1). У той же час, ці показники так і не досягнули рівня здорових тварин і ліковані зазначеною композицією щури поступалися їм на 20,56; 27,64; 17,12 і 33,86 % відповідно.

Одночасно з цим, спостерігалось зменшення вмісту всіх досліджуваних фракцій і суми ГАГ у сироватці крові. Для фракцій гіалуронової кислоти і високосульфатованих ГАГ, а також суми ГАГ, дане зниження було статистично вірогідним і складало, відповідно, 16,90; 15,69 і 13,53 %. Відносно фракції хондроїтинсульфатів відзначено тенденцію до зниження. Фракційний склад ГАГ у сироватці крові, як і суглобовому хрящі, не нормалізувався після лікування композицією глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом у співвідношенні 2:1 і характеризувався збільшенням кількості фракцій гіалуронатів, хондроїтинсульфатів і високосульфатованих ГАГ, а також суми ГАГ, відповідно, на 18,28; 29,01; 26,92 і 22,45 % порівняно із здоровими тваринами (табл. 1).

Значно виражену хондропротекторну активність продемонструвала композиція глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом у співвідношенні 4:1, що ще більше впливала на біосинтез і нагромадження макромолекул матриксу в суглобовому хрящі. Так, після лікування нею щурів з експериментальною кортикостероїдною дистрофією у тварин спостерігалось майже повне відновлення фракційного складу і сумарного вмісту ГАГ. У гіаліновому хрящі піддослідних щурів зазначеної групи, порівняно з нелікованими тваринами фракцій гіалуронатів містилося на 73,64 % більше хондроїтинсульфатів – на 60,92 % і ГАГ у сумі – на 50,85 %. Відновлення вмісту високосульфатованих ГАГ відбувалося трохи повільніше, ніж інших фракцій, що може пояснюватися великим розміром і специфічністю функції зазначених макромолекул. Так, до складу даної фракції ГАГ входять сполуки, котрі забезпечують зв'язування та утримання води, що додає хрящовій тканині пружності й еластичності, і речовин, які не належать до структурних елементів сполучної тканини, наприклад гепарину та інших високосульфатованих глікозаміногліканів. Вміст речовин, які відносять до даної фракції, залишався в суглобовому хрящі меншим, ніж у здорових тварин.

Найбільш вираженим був вплив розглянутої композиції на вміст фракцій гіалуронатів і високосульфатованих ГАГ, а також суми ГАГ. Після лікування експериментальних тварин з кортикостероїдною дистрофією аналізованою композицією спостерігалось рівноважне зниження вмісту в сироватці крові зазначених фракцій і суми ГАГ, відповідно, на 24,94; 21,35; 24,82 і 23,82 % (табл. 1).

Композиція глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом у співвідношенні 8:1 за своїм впливом на стан системи макромолекул матриксу сполучної тканини мало відрізнялася від



Таблиця 1 – Фракційний склад глікозаміногліканів у суглобовому хрящі та сироватці крові експериментальних тварин з кортикостероїдною дистрофією, лікованих композиціями глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом

Субстанція (композиція)	У суглобовому хрящі, г/100 г				У сироватці крові, од.			
	Гіалуро- нати	Хондро- їтинсуль- фати	Високо- сульфа- товані	Сума	Гіалуро- нати	Хондро- їтинсуль- фати	Високо- сульфа- товані	Сума
Інтактні тварини	0,214±0,012	0,416±0,029	0,146±0,010	0,786±0,026	16,96±0,62	9,41±0,32	1,82±0,10	28,92±1,14
Контрольна група	0,110±0,008 -48,60 %*	0,261±0,014 -38,73 %*	0,099±0,010 -22,84 %*	0,470±0,025 -40,20 %*	24,14±1,12 +42,33 %*	13,04±0,61 +38,58 %*	2,74±0,13 +50,55 %*	39,92±1,36 +41,61 %*
Глюкозаміну гідрохлорид	0,181±0,011 -15,42* +64,55**	0,416±0,017 +0,00 %* +59,39**	0,144±0,009 -1,37 %* +45,45**	0,741±0,029 -5,73 %* +57,66**	18,32±0,52 +8,02 %* -24,86**	11,56±0,41 +22,85 %* -11,35**	2,02±0,12 +9,34 %* -26,28**	31,90±1,52 +13,16 %* -20,09**
Глюкозаміну гідрохлорид+ парацетамол 2:1	0,170±0,015 -20,56 %* +51,55**	0,301±0,024 -27,64 %* +15,33**	0,121±0,012 -17,12 %* +22,22**	0,592±0,030 -33,84 %* +2,60**	19,17±1,10 +13,03 %* -20,58**	12,06±0,65 +28,16 %* -7,51**	2,34±0,17 +28,57 %* -14,60**	33,57±1,32 +16,08 %* -15,91**
Глюкозаміну гідрохлорид+ парацетамол 4:1	0,191±0,012 -10,75 %* +73,64**	0,412±0,019 +0,96 %* +60,92**	0,106±0,012 -27,40 %* +7,04**	0,709±0,036 -9,80 %* +50,85**	18,12±1,14 +6,84 %* -24,94**	10,23±0,70 +8,71 %* +21,55**	2,06±0,14 +13,19 %* -24,82**	30,41±1,44 +7,88 %* -23,82**
Глюкозаміну гідрохлорид+ парацетамол 8:1	0,180±0,015 -15,89 %* +63,64**	0,408±0,020 -1,92 %* +56,32**	0,109±0,014 -25,34 %* +10,10**	0,697±0,032 -11,32 %* +56,75**	21,25±1,72 +25,29 %* -11,97**	12,41±0,82 31,88 %* -4,83**	2,52±0,21 +38,46 %* -8,03588	36,18±1,46 +28,34 %* -9,37**

Примітка. \* – порівняно з результатами інтактної групи тварин; \*\* – порівняно з результатами контрольної групи тварин.

попередньої і настільки ж активно стимулювала біосинтез та нагромадження ГАГ у суглобовому хрящі. При цьому, порівняно з показниками контрольних щурів, спостерігалось підвищення вмісту фракцій гіалуронатів на 63,64 %, а хондроїтинсульфатів і суми ГАГ – на 56,32 і 56,75 % відповідно (табл. 1).

Паралельно з нагромадженням ГАГ у хрящовій тканині, спостерігалось зниження інтенсивності руйнування її матриксу, що супроводжувалося тенденцією до зменшення вмісту ГАГ у сироватці крові стосовно нелікованих тварин (табл. 1), однак статистично достовірних розходжень за даними показниками не було зафіксовано.

**ВИСНОВКИ.** 1. Комплексний аналіз біохімічних показників, що характеризують хондропротекторні властивості композицій глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом у масових співвідношеннях 2:1; 4:1 і 8:1, показав, що парацетамол у малих дозах проявляє помірну хондропротекторну дію і стимулює репаративну регенерацію суглобного хряща в умовах кортикостероїдної дистрофії сполучної тканини, чого не спостерігається при лікуванні експериментальних тварин парацетамолом у загальноприйнятих дозах.

2. Найбільш сприятливий вплив на хрящову тканину, що перебуває в стані кортикостероїдної дистрофії, було зафіксовано при співвідношенні глюкозаміну з парацетамолом 4:1. Зазначена композиція характеризується збалансованим поєднанням хондропротекторної і протизапальної властивостей, що є оптимальним для створення протиартрозного препарату на основі глюкозаміну і парацетамолу.

3. Лапса Ю.Ю., Слуцкий Л.И. Опыт контроля за результатами пункционной папаинотерапии межпозвоночного остеохондроза // Тр. III Всесоюз. съезда ортопедов и травматологов. – М., 1975. – Ч. I. – С. 158-159.

4. Остеоартроз. Консервативна терапія // За ред. М.О. Коржа, Н.В. Дєдх, І.А. Зупанця. – Х.: Прапор, 1999. – 336 с.

5. Brady S.J., Brooks P., Conaghan P., Kenyon L.M.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. А.с. № 960626 СССР, МКИЗ G 09N 23/28. Способ определения гексозаминогликансульфатов в сыворотке крови / М.Р. Штерн, О.П. Тимошенко, Ф.С. Леонтьева, Г.Ф. Ключева. – Заявка № 2998857/28-13; Заявл. 23.10.80; Опубл. 23.09.82, Бюл. № 35.

2. Лапач С.Н., Губенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2000. – 320 с.

Pharmacotherapy and osteoarthritis // Baillieres Clin. Rheumatol. – 1997. – **11**, № 4. – P. 749-768.

6. Brandt K.D. The role of analgesics in the management of osteoarthritis pain // Am. J. Ther. – 2000. – **7**, № 2. – P. 75-90.

7. Gray R.G., Gottlieb N.L. Intraarticular corticosteroids. An Updated Assessment // Clin. Orthop. and Rel. Res. – **1983**, № 177. – P. 235-263.

8. Harvey S., Weisman M., O'Dell J. et al.

Chondrex: new marker of joint disease // Clin. Chem. – 1998. – **44**, № 3. – P. 509-516.

9. Hoffer L.J., Kaplan L.N., Hamadeh M.J. Sulfate could mediate the therapeutic effect of glucosamine sulfate // Metabolism. – 2001. – **50**, № 7. – P. 767-770.

10. Petersson J.F., Borgard T., Svensson B., Saxne T., Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early arthritis of the knee joints // Br. J. Rheumatol. – 1998. – **37**. – P. 46-50.

## СТИМУЛІРОВАНИЕ МЕТАБОЛІЗМА ГЛІКОЗАМИНОГЛІКАНОВ СОЄДИНІТЕЛЬНОЇ ТКАНИ В УМОВАХ ДИСТРОФІЇ КОМПОЗИЦІЇ ГЛЮКОЗАМИНА ГІДРОХЛОРИДА С ПАРАЦЕТАМОЛОМ

**И.А. Зупанец, В.А. Туляков**

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

### Резюме

В статье приведена информация о результатах сравнительного исследования влияния субстанций и композиций глюкозамина с парацетамолом на обмен гликозаминогликанов гиалинового хряща крупных суставов в условиях кортикостероидной дистрофии. Показано, что модификация парацетамола аminosахаром глюкозамином улучшает их воздействие на суставной хрящ с повышением биосинтеза, накоплением гликозаминогликанов в суставном хряще и снижением уровня их метаболитов в крови.

Композиция глюкозамина с парацетамолом в соотношении 2:1 в дозе 50 мг/кг продемонстрировала слабый хондропротекторный эффект на модели кортикостероидной дистрофии соединительной ткани и мало пригодна для использования в качестве препарата, модифицирующего протекание остеоартроза.

Результаты количественного анализа макромолекул соединительной ткани свидетельствуют о существенной активации белково-синтетических процессов у экспериментальных животных вследствие лечения глюкозамином с парацетамолом в соотношениях 8:1 и 4:1 в дозе 50 мг/кг.

В течении экспериментов наиболее благоприятное влияние на хрящевую ткань в состоянии кортикостероидной дистрофии было зафиксировано при соотношении указанных компонентов 4:1, что составило для глюкозамина гидрохлорида 40 мг/кг, а для парацетамола – 10 мг/кг.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** глюкозамин, парацетамол, гликозаминогликан, дистрофия, биохимия, эксперимент.

## COMBINATION OF GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE WITH PARACETAMOL STIMULATES THE CONNECTIVE TISSUE GLYCOSAMINOGLYCANS METABOLISM IN DYSTROPHY CONDITION

**I.A. Zupanets, V.O. Tuliakov**

NATIONAL PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, KHARKIV

### Summary

In the article there is the information about results of correlative research of composition of glucosamine with paracetamol on the large joints hyaline cartilage metabolism in steroidal dystrophy condition.

It was shown that modification of the paracetamol by the aminosugar glucosamine improves their influence on the articular cartilage with increasing of biosynthesis and enhancing of glycosaminoglycans in articular cartilage and the decreasing of their metabolites in the blood.

The composition of glucosamine with paracetamol in correlation of 2:1 demonstrates the low chondroprotective effect on the model of connective tissue corticosteroidal dystrophy and is not enough suitable for use as a preparation which modifies the processing of osteoarthrosis.

The results of quantitative analysis of connective tissue molecules testify about the great protein-synthesis processes activation in experimental animals after treatment with combination of glucosamine hydrochloride with paracetamol in correlation of 8:1 and 4:1 in dose 50 mg/kg.

In the experiments the most influence on the cartilage tissue in the corticosteroidal dystrophy condition was fixed for correlation of these components of 4:1, which was 40 mg/kg for glucosamine hydrochloride and 10 mg/kg for paracetamol.

**KEY WORDS:** glucosamine, paracetamol, glycosaminoglycan, dystrophy, biochemistry, experiment.

Отримано 24.10.2003 р.

Адреса для листування: І.А. Зупанець, кафедра клінічної фармації, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 27, Харків, 61057, Україна.

## ВПЛИВ КОМПЛЕКСНОГО ЛІКУВАННЯ З ВИКОРИСТАННЯМ ІНГАЛЯЦІЙ ЛІПІНУ НА ПРОТЕОЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ КОНДЕНСАТУ ВИДИХУВАНОВОГО ПОВІТРЯ І ФУНКЦІЮ ЗОВНІШНЬОГО ДИХАННЯ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ОБСТРУКТИВНИЙ БРОНХІТ

Г.Я. Ступницька

БУКОВИНСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

Вивчено зміни протеолітичної активності конденсату видихуваного повітря (КВП) та параметрів комп'ютерної спірографії під впливом комплексного лікування з використанням вітчизняного препарату "ЛІПІН" у 26 хворих на хронічний обструктивний бронхіт. Встановлено, що у період загострення захворювання відбувається підвищення інтенсивності лізису низькомолекулярних білків і казеїнолітичної активності із зниженням КВП-індукованого лізису колагену. Показано, що застосування ультразвукових інгаляцій ліпіну призводить до нормалізації казеїнолітичної активності, суттєво зменшує азоальбумінолітичну та підвищує колагенолітичну активність КВП, що супроводжується істотним покращанням прохідності повітропровідних шляхів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: обструктивний бронхіт, ліпін, протеоліз, колагеноліз.

ВСТУП. В останні роки велика увага приділяється питанню про роль протеолітичних ферментів і факторів їх регуляції у виникненні багатьох захворювань, зокрема органів дихання [2, 3]. При хронічних захворюваннях бронхолегеневого апарату відбувається не тільки активація ферментів протеолізу внаслідок підсиленої інфільтрації тканин нейтрофільними гранулоцитами в процесі запалення [6], але й зниження антипротеолітичного потенціалу (зменшення активності  $\alpha_1$ -інгібітора протеїнази,  $\alpha_2$ -макроглобуліну, а також місцевих білків-інгібіторів) [3, 12]. Вважають, що кисневі радикали і ліпопероксиди інактивують  $\alpha_1$ -антипротеазний інгібітор шляхом окиснення його молекули, внаслідок чого останній втрачає здатність пригнічувати активність еластази [8, 11], що поглиблює локальний дефіцит антипротеаз [6, 10]. Порушення дисбалансу в системі "протеїнази – інгібітори протеїнази" сприяє підсиленню запальної реакції і призводить до морфологічних змін бронхіального дерева, що потребує відповідної корекції [3, 6]. Доведено, що конденсат видихуваного повітря (КВП) може використовуватися для визначення ступеня бронхолегеневої запальної реакції, в тому числі через визначення активності ферментів, та

дозволяє отримати найбільш точну інформацію про стан локального протеолізу [1].

Метою роботи було обґрунтувати комплексне лікування хворих на хронічний обструктивний бронхіт (ХОБ) з використанням інгаляцій ліпіну шляхом вивчення впливу останнього на протеолітичну активність КВП і функцію зовнішнього дихання.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Обстежено 26 осіб з ХОБ віком від 23 до 63 років (чоловіків – 12, жінок – 14) у період загострення захворювання. Ступінь тяжкості хвороби відповідав 1-2 стадіями ХОБ з першим або другим ступенем дихальної недостатності. Усіх пацієнтів було поділено на репрезентативні за віком і статтю контрольну і основну групи. Хворі контрольної групи отримували стандартне лікування (бронхолітики, мукорегуляторні препарати, за показаннями – антибіотики, глюкокортикоїди, фізіотерапевтичні процедури). Пацієнтам основної групи, окрім зазначеної терапії, призначали ультразвукові інгаляції ліпіну в дозі 10-15 мг/кг маси тіла в 10 мл ізотонічного розчину натрію хлориду 1 раз на день упродовж 10-14 днів. Групу контролю склали п'ятнадцять практично здорових осіб.

Збір КВП проводили [1] на апараті власної конструкції, яка дозволяє стерилізувати робочі

частини приладу. Протеолітичну активність КВП визначали за лізисом азоальбуміну, азоказеїну та азоколу (реактиви фірми "Simko Ltd.", Україна) з реєстрацією екстинкції на фотоколориметрі КФК-2 (Росія) [2]. Функцію зовнішнього дихання (ФЗД) визначали за допомогою комп'ютерного спірографічного апарата "Кардіо плюс" ("Метекол", Україна). Аналізували об'єм форсованого видиху за першу секунду (ОФВ<sub>1</sub>), відношення об'єму форсованого видиху за першу секунду до форсованої життєвої ємності легень (ОФВ<sub>1</sub>/ФЖЕЛ), миттєву швидкість видиху на рівні великих (МОШ<sub>25</sub>), середніх (МОШ<sub>50</sub>) і дрібних бронхів (МОШ<sub>75</sub>), середню об'ємну швидкість руху повітря від великих до дрібних бронхів (СОШ<sub>25/75</sub>).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з визначенням t-критерію Стьюдента за програмою "БіоСтат" [4].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Клінічно відмічено, що у хворих основної групи ефективність використання інгаляцій ліпіну характеризувалась прискоренням регресу клінічних проявів загострення захворювання: полегшенням відходження харкотиння, зменшенням гнійного вмісту в ньому, зниженням інтенсивності та тривалості кашлю й задишки при фізичному навантаженні, зникненням інтоксикаційного синдрому. Під час об'єктивного обстеження відзначалось зменшення частоти дихання та сухих хрипів при аускультатії легень. Зміни ФЗД після тижневого курсу інгаляцій ліпіну характеризувались збільшенням ОФВ<sub>1</sub> (на 10,3 %), МОШ<sub>25</sub> (6,0 %), МОШ<sub>50</sub> (на 9,3 %), МОШ<sub>75</sub> (10,6 %) і СОШ<sub>25/75</sub> (на 10,3 %), що свідчить про покращання прохідності бронхіального дерева. У пацієнтів контрольної групи довше на 2-4 дні зберігались утруднене відходження мокротиння, значний кашель та задишка при фізичному навантаженні, а показники ОФВ<sub>1</sub>, МОШ<sub>25</sub>, МОШ<sub>50</sub> і СОШ<sub>25/75</sub> склали лише 5,0, 8,2, 17,7, 9,6, 8,3 % відповідно. У хворих контрольної і основної груп до початку лікування інтенсивність КВП-індукованого розпаду низькомолекулярних білків зростала відносно такої у здорових осіб у 2,1 раза. Лізис високомолекулярних білків збільшувався у контрольній групі на 46,0 %, в основній – на 53,3 % (табл. 1). Водночас колагенолітична активність у пацієнтів контрольної групи виявилась на 52,2 % нижчою, ніж у практично здорових осіб. В основній групі також спостерігалось зменшення колагенолітичної активності – на 47,8 %. Достовірної різниці між зазначеними показниками у хворих контрольної і основної груп до початку лікування не виявлялось.

У пацієнтів контрольної групи наприкінці лікування КВП-індукований лізис низькомолекулярних білків зменшувався на 17,1 %, однак залишався на 77,4 % більшим за контроль. Такі зміни спостерігались і з боку розпаду високомолекулярних білків: відповідне зниження їх лізису становило 11,9 %, проте відносно показників у здорових осіб лізис азоказеїну залишався більшим на 28,7 %. Колагенолітична активність КВП зростала на 45,5 % і перевищувала таку у здорових осіб на 30,4 %. У хворих на ХОБ, у лікувальному комплексі яких застосовували ультразвукові інгаляції ліпіну, КВП-індукований лізис низькомолекулярних білків зменшувався на 27,1 %, але був більшим за контроль на 54,8 %. Інтенсивність лізису високомолекулярних білків знижувалась на 28,3 % і не відрізнялась від такої у практично здорових осіб. Колагенолітична активність КВП зростала на 50 % і перевищувала контроль на 21,7 %. Порівнюючи зміни показників протеолітичної активності КВП у пацієнтів контрольної і основної груп після лікування, варто звернути увагу на більш суттєве зниження інтенсивності розпаду низькомолекулярних білків (на 12,8 %) і лізису азоказеїну (на 14,5 %) у хворих, в комплексному лікуванні яких використовували ультразвукові інгаляції ліпіну.

Отримані результати підтверджують відомості літератури про активацію ферментів протеолізу у хворих на хронічні обструктивні захворювання легень [3, 8]. Підвищений КВП-індукований лізис низько- і високомолекулярних білків свідчить про надлишкове вивільнення у бронхіальний секрет протеолітичних ферментів зі зруйнованих клітин – як фагоцитів, так і бактерій. Зазначене призводить до ушкодження слизової оболонки дихальних шляхів, проліферації сполучнотканинних елементів та пригнічення регенеративної здатності циліарного епітелію з розвитком мукоциліарної дисфункції як основних механізмів бронхообструкції у хворих на ХОБ [6]. Використання стандартної терапії мало впливає на місцеві зміни балансу протеази – інгібітори протеїнази, що вказує на доцільність застосування у комплексній терапії інгаляцій з протизапальними і антипротеолітичними засобами. Згідно з описаними в літературі експериментальними [5] та клінічними дослідженнями [7, 9], ліпосоми з фосфатидилхоліну сприяють відновленню легеневої паренхіми та мають протизапальні, антирадикальні та антибактеріальні властивості. Так само включення у лікувальний комплекс ультразвукових інгаляцій ліпіну у хворих на ХОБ дозволяє суттєво впливати на локальні процеси протеолізу: після лікування

Таблиця 1 – Вплив інгаляцій ліпіну на інтенсивність протеолізу в конденсаті видихуваного повітря у хворих на хронічний обструктивний бронхіт ( $\bar{x} \pm S_x$ )

Показники, що вивчалися	Контроль (практично здорові люди) n=15	Контрольна група, n=15		Основна група, n=11	
		до лікування	після лікування	до лікування	після лікування
Лізис низькомолекулярних білків, мкмоль азоальбуміну/1 мл за 1 год	1,15±0,06	2,46±0,05 p<0,001	2,04±0,04 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001	2,44±0,05 p<0,001 p <sub>2</sub> >0,5	1,78±0,05 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>3</sub> <0,001
Лізис високомолекулярних білків, мкмоль азоказеїну/1 мл за 1 год	1,50±0,06	2,19±0,07 p<0,001	1,93±0,06 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,05	2,30±0,06 p<0,001 p <sub>2</sub> >0,05	1,65±0,08 p>0,05 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>3</sub> <0,05
Лізис азоколу, мкмоль азоколу/1 мл за 1 год	0,23±0,01	0,11±0,01 p<0,001	0,16±0,01 p<0,001 p <sub>1</sub> <0,05	0,12±0,01 p<0,001 p <sub>2</sub> >0,05	0,18±0,02 p<0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>3</sub> >0,05

Примітка. p – ступінь достовірності різниць показників відносно контролю; p<sub>1</sub> – ступінь достовірності різниць показників до та після лікування всередині кожної групи; p<sub>2</sub> – ступінь достовірності різниць показників в контрольній і основній групах до початку лікування; p<sub>3</sub> – ступінь достовірності різниць показників в контрольній і основній групах після лікування; n – кількість спостережень.

казеїнолітична активність КВП наближалась до контрольних величин, лізис азоальбуміну був значно меншим, ніж у хворих, які отримували стандартну терапію.

Таким чином, застосування ультразвукових інгаляцій ліпіну суттєво впливає на локальні зміни протеолітичної активності, що зумовлено стабілізацією клітинних мембран за рахунок пригнічення процесів ліпопероксидації, зниження виділення протеолітичних ферментів і заміщення дефектів клітинних мембран. Внаслідок цих явищ зменшується запальна реакція бронхів та відновлюється функція циліарного епітелію, що призводить до зниження проявів бронхообструкції у хворих на ХОБ. Перспективним є подальше вивчення змін досліджуваних параметрів залежно від віку хворих, давності хвороби та її стадії.

**ВИСНОВКИ.** 1. У хворих на ХОБ у період загострення недуги в КВП відбувається підвищення альбуміно- і казеїнолітичної активності на тлі пригнічення колагенолізу.

2. Використання стандартного терапевтичного комплексу у цього контингенту пацієнтів зменшує інтенсивність лізису високомолекулярних білків і лізис азоальбуміну, індукований КВП, та дещо збільшує його колагенолітичну активність, однак зазначені параметри протеолізу залишаються суттєво вищими за контроль.

3. Застосування в комплексному лікуванні хворих на ХОБ ультразвукових інгаляцій ліпіну призводить до нормалізації казеїнолітичної активності, підвищує колагенолітичну та суттєво зменшує альбумінолітичну активність КВП і дає підстави вважати їх одним із шляхів оптимізації лікувального процесу цієї недуги.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Анаев Э.Х., Чучалин А.Г. Исследование конденсата выдыхаемого воздуха в пульмонологии (обзор зарубежной литературы) // Пульмонолог. – 2002. – № 2. – С. 57-66.
2. Веремеенко К.Н. Протеолиз в норме и при патологии. – К.: Здоров'я, 1993. – 277 с.
3. Веремеенко Н.К. Биохимические основы системной энзимотерапии // Труды симпозиума "Системная энзимотерапия. Биохимические основы. Применение в кардиологии". – К., 1998. – С. 10-29.
4. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

5. Корнилова З.Х., Селищева А.А., Перельман М.И. Влияние липосом из фосфатидилхолина на регенерацию операционной раны легкого морской свинки // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2001. – **31**, № 2. – С. 228-231.
6. Мотавкин П.А., Гельцер Б.И. Клиническая и экспериментальная патофизиология легких. – М.: Наука, 1998. – 366 с.
7. Феценко Ю.И., Рекалова Е.М., Бегоулева Ж.Б. и др. Использование ингаляций смеси липина с аскорбиновой кислотой при лечении больных хроническим обструктивным бронхитом // Укр.

пульмонол. журн. – 1999. – № 3. – С. 7-9.

8. Чучалин А.Г. Хронические обструктивные болезни легких. – М.: ЗАО "Издательство БИНОМ", 1999. – 512 с.

9. Юхимець В.О. Перспективи засосування препарату ліпіну в пульмонології // Ліки. – 1995. – № 4. – С. 19-28.

10. Behr J. Oxidanzien-Antioxidanzien-Balance bei interstitiellen Lunge-nerkrankungen // Atemwegs und

Lungenkrankh. – 1999. – 25, № 1. – P. 37-49.

11. Carden D., Xiao F., Moak C. et al. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins // Amer. J. Physiol. – 1998. – 275, № 2, Pt 2. – P.385-392.

12. Stocldley R.A. New perspectives on the protease/antiprotease // Eur. Resp. Rev. – 1997. – 43, № 7. – P. 128-130.

## **ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНГАЛЯЦИЙ ЛИПИНА НА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КОНДЕНСАТА ВЫДЫХАЕМОГО ВОЗДУХА И ФУНКЦИЮ ВНЕШНЕГО ДЫХАНИЯ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ОБСТРУКТИВНЫМ БРОНХИТОМ**

**А.Я. Ступницкая**

БУКОВИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

### **Резюме**

*Изучено изменения протеолитической активности конденсата выдыхаемого воздуха (КВВ) и параметров компьютерной спирографии под влиянием комплексного лечения с использованием отечественного препарата "ЛИПИН" у 26 больных хроническим обструктивным бронхитом. Установлено, что в период обострения заболевания происходит повышение интенсивности лизиса низкомолекулярных белков и казеинолитической активности со снижением КВВ-индуцированного лизиса колагена. Показано, что применение ультразвуковых ингаляций липина приводит к нормализации казеинолитической активности, существенно уменьшает азоальбуминолитическую и повышает колагенолитическую активность КВВ, что сопровождается существенным улучшением проходимости воздухопроводящих путей.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** обструктивный бронхит, обструкция, липин, протеолиз, колагенолиз.

## **THE INFLUENCE OF COMPLEX TREATMENT WITH THE USE OF LIPIN INHALATION UPON PROTEOLYTIC ACTIVITY OF EXHALED AIR CONDENSATE AND FUNCTION OF EXTERNAL BREATHING IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE BRONCHITIS**

**G.Y. Stupnytska**

BUCOVYNIAN STATE MEDICL ACADEMY

### **Summary**

*The changes of proteolytic activity of the exhaled air condensate (EAC) and computer spirometry parameters under the influence of complex treatment with the use of native preparation "Lipin" have been examined in 26 patients with chronic obstructive bronchitis. During acute period of the disease the increase of intensity of the low-molecular protein lysis and casein activity with the decrease of EAC-induced collagen lysis have been found. The use of ultrasonic lipin inhalations has been indicated to normalize caseinolytic activity, to reduce azoalbuminolytic EAC activity and to increase collagenolytic EAC activity which results in substantial improvement of the air passages permeability.*

**KEY WORDS:** obstructive bronchitis, obstruction, lipin, proteolysis, collagenolysis.

Отримано 08.09.2003 р.

Адреса для листування: Г.Я. Ступницка, Буковинська державна медична академія, вул. Ракетна, 29/2, Чернівці, 58021, Україна.

## АНАЛІЗ МЕТАЛОЗВ'ЯЗУВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ ЗА ЇХ УФ-СПЕКТРАМИ

Г.І. Фальфушинська, І.Я. Демків, О.Б. Столяр, П.П. Флекей<sup>1</sup>

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. ВОЛОДИМИРА ГНАТЮКА  
ТЕРНОПІЛЬСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ІМ. І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО<sup>1</sup>

*Досліджено взаємодію апотіонеїну (Т) з іонами важких металів за УФ-спектрами реконструйованих металотіонеїнів (МТ). Для реконструйованих Pb-МТ, Cd-МТ та Fe-МТ характерні смуги поглинання з максимумом, відповідно, при 240 нм, 250 нм та 225-235 нм. За дії сумішей іонів або природної води на Т домінують у зв'язуванні іони заліза та свинцю.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: металотіонеїн, апотіонеїн, залізо, кадмій, свинець, біомаркер.

**ВСТУП.** Забруднення водойм важкими металами (ВМ) набуває небезпечних масштабів [1]. Тому важливо дослідити механізми ефективного зв'язування металів у нетоксичні комплекси в організмі гідробіонтів та можливості їх використання для біоіндикації забруднення. Металотіонеїни (МТ) хребетних тварин – це стресорні білки, які беруть участь в регуляції вмісту різних форм цинку в клітинах та зв'язують надлишок кадмію [4]. Спектральні властивості МТ визначаються наявністю металотіолатних кластерів [4], тому цікаво було виявити селективність зв'язування металів цими білками за їх УФ-спектрами [3]. Для дослідження взяли іони кадмію, які входять до складу МТ гідробіонтів в умовах забруднення, та іони свинцю і заліза, яким утворення таких сполук в організмі не властиве. Дослідження проводили на МТ печінки коропа.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Розчин термо-стабільних білків (ТБ) печінки одержували з 10 % гомогенату тканини в 0,01 М трис-НСІ буфері, рН-8,0. Гель-фільтрацію розчину ТБ здійснювали на сефадексі G-75 тим же буфером. МТ ідентифікували як фракцію ТБ з максимальним співвідношенням  $D_{254}/D_{280}$  [2]. Для одержання апотіонеїну (Т) МТ інкубували із 100 мМ розчином EDTA протягом 48 год при температурі 4 °С. З метою реконструкції МТ в умовах *in vitro* 0,023 μМ розчин білка інкубували протягом 2 год при температурі 18 °С з

© Г.І. Фальфушинська, І.Я. Демків, О.Б. Столяр – к.біол.н., П.П. Флекей – к.мед.н., 2003.

0,719 μМ розчином іонів Cd<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> та їх сумішами. Окрім того, Т печінки коропа інкубували з десятикратно випареною водою з водогону та Тернопільського ставу протягом 2-х (короткотривала дія) та 24-х год (довготривала дія). Після інкубації надлишок металу відокремлювали на колонці розміром 1,5×25 см, запакованій сефадексом G-25 та врівноваженій 0,01 М трис-НСІ, рН=8,0. Вміст білків визначали за методом Лоурі. Концентрацію МТ обчислювали, виходячи з того, що молярна маса білка становить 6,8·10<sup>3</sup> г/моль [3]. Вміст металів у воді визначали методом атомно-абсорбційної спектроскопії.

Для проведення кореляційного аналізу використовували диференційні спектри ( $\frac{D_d - D_k}{D_k}$ , де  $D_d$  – оптичне поглинання дослідного зразка, а  $D_k$  – оптичне поглинання контрольного зразка при однаковій довжині хвилі). Інтервал між вимірами становив 5 нм.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Оскільки МТ не містять ароматичних амінокислотних залишків [4], в їх спектрах відсутня смуга поглинання при 280 нм. Спектр МТ печінки коропа в нормі містить плече при 220 нм, характерне для Zn-Т [4], та широку смугу поглинання при 250-260 нм (рис. 1), властиву металотіолатним комплексам [2]. Після інкубації МТ з розчином EDTA ці обидві смуги зникають (рис. 1), що свідчить про видалення металу з МТ [4].

Реконструйовані МТ мають спектральні особливості залежно від природи металу (рис. 2). У спектрі Cd-МТ виражене плече приблизно 250 нм [6], у спектрі Pb-МТ спостерігаються зсув смуги поглинання від 260-255 нм до 240 нм порівняно з нативним МТ та значне підвищення її інтенсивності. Для спектра Fe-МТ характерне збільшення інтенсивності спектра R-МТ у межах 210-240 нм та 280-320 нм порівняно з МТ. При одночасній дії іонів кадмію та свинцю на Т одержаний спектр уподібнюється до спектра Pb-МТ (табл. 1). При визначенні спектральних властивостей МТ, реконструйованих із сумішами іонів, що містять залізо, незважаючи на наявність в суміші кадмію або свинцю, одержуємо МТ, УФ-спектри яких подібні до гомометалічного Fe-МТ (рис. 2).

Для встановлення можливості застосування МТ як біомаркерів забруднення водойм іонами ВМ вивчали спектри R-МТ після інкубації Т і води з водогону та Тернопільського ставу. Як видно з таблиці 2, у воді наявна значна кількість заліза та цинку. УФ-спектри R-МТ при короткотривалій інкубації містили смуги поглинання при 235-255 нм та 220 нм (характерні для нативних Zn-МТ) (рис. 3) [4]. Спостерігається та-

кож високий ступінь кореляції R-МТ при короткотривалій інкубації з R(Fe)-МТ. При довготривалій інкубації інтенсивність смуг поглинання в спектрі R-МТ та здатність до специфічного зв'язування Т і води з водогону зменшуються.

З метою визначення оптимального співвідношення між концентраціями металів і Т, при якому проявляються характерні ознаки спектрів, проводили інкубацію розчину білка з різними концентраціями (від 0,18  $\mu\text{M}$  до 2,16  $\mu\text{M}$ ) іонів металів та їх суміші. Оптичну густину реєстрували при 240, 250 та 260 нм (рис. 4). При співвідношенні метал/тіонеїн 31:1 спостерігається максимум зв'язування металу з білком в тіолатні кластери.

Узагальнення одержаних результатів та відомостей про стан МТ в організмі коропа при забрудненні [2] показує, що МТ в умовах *in vitro* не можуть бути використані як моделі відповіді організму на забруднення, оскільки відповідь, наприклад відносно дії свинцю, в цих умовах різна [2]. Разом з цим, висока чутливість і специфічність взаємодії МТ з металами дозволяють розглядати їх як перспективні біомаркери забруднення водойм ВМ, а також як сорбенти заліза у воді.

Таблиця 1 – Коефіцієнти кореляції  $r$  між диференційними спектрами реконструйованих металотіонеїнів

Склад металів	Pb/Cd-МТ	Fe/Pb-МТ	Fe/Cd-МТ	Тернопільський став		Водогін	
				короткотривала інкубація	довготривала інкубація	короткотривала інкубація	довготривала інкубація
Pb	0,89*	0,23	–	-0,15	-0,33	0,07	-0,11
Cd	0,05	–	-0,74	-0,87	-0,93	-0,74	-0,6
Fe	–	0,97*	0,98*	0,86*	0,91*	0,71*	0,43
Fe/Pb	–	–	–	0,91*	0,92*	0,78*	0,48
Fe/Cd	–	–	–	0,7*	0,78*	0,5*	0,31

Таблиця 2 – Вміст металів у природній воді,  $\mu\text{M}/\text{л}$  ( $M \pm m$ ,  $n=4$ )

Проба	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Mn}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$	$\text{Pb}^{2+}$	$\text{Fe}^{2+}$
Водогін	$0,52 \pm 0,02$	$0,270 \pm 0,005$	$1,38 \pm 0,01$	$<0,02$	$1,27 \pm 0,01$
Тернопільський став	$0,72 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,01$	$0,38 \pm 0,01$	$<0,02$	$1,10 \pm 0,01$

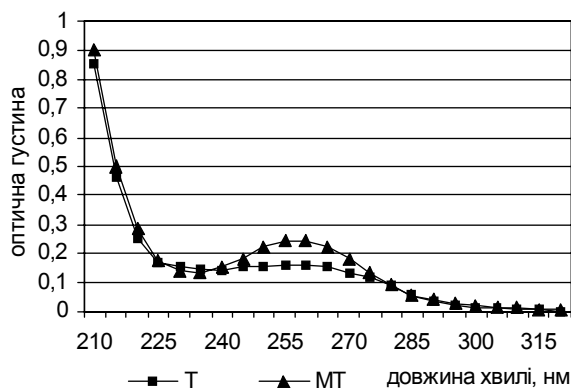


Рис. 1. УФ-спектри нативного МТ та Т.

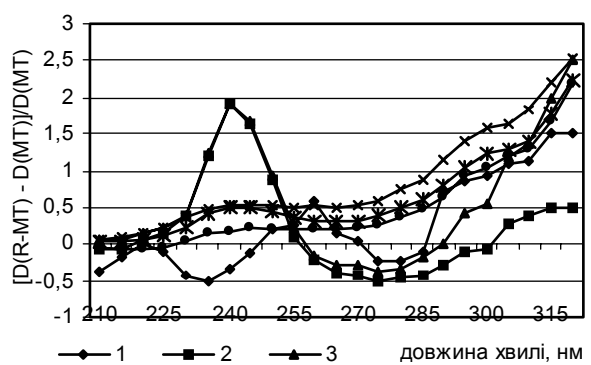


Рис. 2. Диференційні спектри реконструйованих МТ: 1 – Cd-МТ; 2 – Pb-МТ; 3 – Cd/Pb-МТ; 4 – Fe-МТ; 5 – Cd/Fe-МТ; 6 – Fe/Pb-МТ. Для кривої 1 дійсний масштаб 3:1, для 4 – 1:4; для 5 – 1:3, для 6 – 1:2.



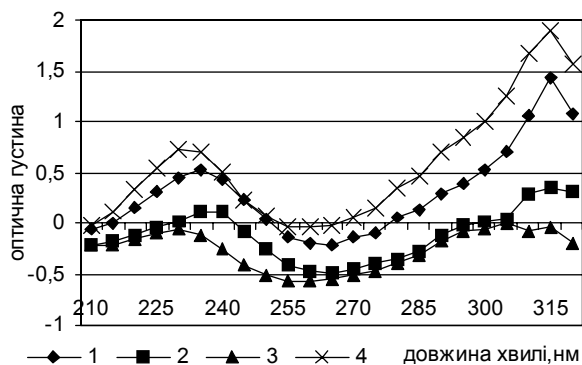


Рис. 3. Диференційні спектри реконструйованих МТ із водою з водогону та Тернопільського ставу за умов короткочасної (А) та довготривалої (В) інкубації: 1 – став (А); 2 – водогін (А); 3 – водогін (В); 4 – став (В).

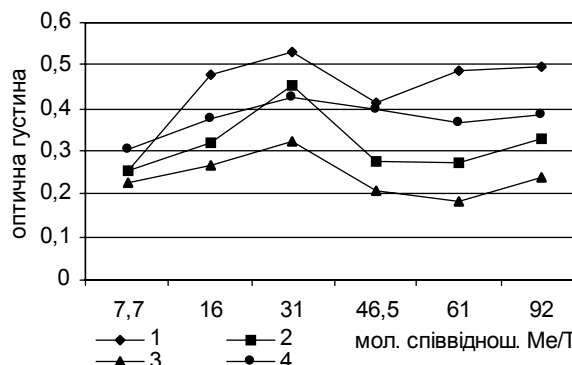


Рис. 4. Залежність оптичних властивостей реконструйованих МТ від вмісту металів: Pb-МТ – 1-240 нм; Pb/Cd-МТ – 2-240нм, 3-250 нм; Cd-МТ – 4-250 нм. Для кривої 4 дійсний масштаб 2:1.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Линник П.Н. Тяжелые металлы в поверхностных водах Украины: содержание и формы миграции // Гидробиол. журн. – 1999. – **35**, № 1. – С. 22-41.
2. Столяр О.Б., Арсан В.О., Хоменчук В.О. Акумуляція свинцю низькомолекулярними термостабільними білками гепатопанкреасу коропа та їх властивості за інтоксикації свинцем (II) // Доп. НАН

України. – 2002. – № 4. – С. 192-196.

3. Dallinger R., Wang Yu., Berger B. et al. Spectroscopic characterization of metallothionein from the terrestrial snail *Helix pomatia* // Eur. J. Biochem. – 2001. – **268**, № 15. – P. 4126-4133.

4. Toyama M., Yamashita M., Hirayama N., Murooka Y. Interactions of Arsenic with Human Metallothionein-2 // J. Biochem. – 2002. – **132**, № 2. – P. 217-221.

## АНАЛИЗ МЕТАЛЛОСВЯЗЫВАЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ ЗА ИХ УФ-СПЕКТРАМИ

Г.И. Фальфушинская, И.Я. Демкив, О.Б. Столяр, П.П. Флекей<sup>1</sup>

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. ВЛАДИМИРА ГНАТЮКА,  
ТЕРНОПОЛЬСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМ. И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО<sup>1</sup>

#### Резюме

Исследовано взаимодействие апотионеина (Т) с ионами тяжелых металлов за УФ-спектрами реконструированных металлотионеинов (МТ). Для реконструированных Pb-МТ, Cd-МТ и Fe-МТ характерны полосы поглощения с максимумом, соответственно, при 240 нм, 250 нм и 225-235 нм. При действии смеси ионов или природной воды на Т доминируют в связывании ионы железа и свинца.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: металлотионеин, апотионеин, железо, кадмий, свинец, биомаркер.

## ANALYSIS OF METAL-BINDING CAPACITY OF METALLOTHIONEINS BY THEIR UV-SPECTRA

H.I. Falfushynska, I.Ya. Demkiv, O.B. Stolyar, P.P. Phlekey<sup>1</sup>  
TERNOPIL STATE PEDAGOGICAL UNIVERSITY BY VOLODYMYR HNATYUK,  
TERNOPIL STATE MEDICAL ACADEMY BY I.YA. HORBACHEVSKY<sup>1</sup>

#### Summary

Interaction between apothionein (T) and heavy metal ions by UV – spectra of reconstructed metallothioneins (MT) were investigated. Shoulders at 240 nm for Pb-MT, at 250 nm for Cd-MT and at 225-235 nm for Fe-MT were characteristic. At action of ion mixtures or natural water on T, iron and lead ions dominated in binding.

KEY WORDS: metallothionein, apothionein, cadmium, lead, iron, biomarker.

Отримано 02.09.2003 р.

Адреса для листування: О.Б. Столяр, вул. За Рудкою, 14, кв. 77, Тернопіль, 46000, Україна.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕСІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У ХВОРИХ З РІЗНИМ ВМІСТОМ ТБК-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ У КРОВІ

О.В. Носач

НАУКОВИЙ ЦЕНТР РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ АМН УКРАЇНИ

*Описано зміни вмісту дієнових, оксодієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів і основ Шифа в крові хворих з хронічним холециститом, які брали участь в ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС. Проаналізовано кореляційні зв'язки між продуктами ліпопероксидації. Встановлено збільшення прооксидної дії іонів заліза (II) при зниженні рівня ТБК-активних продуктів.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** перекисне окиснення ліпідів, ТБК-активні продукти, іонізуюче випромінювання.

**ВСТУП.** Значне розповсюдження серед населення України захворювань, патогенетичним фактором яких є активація процесів вільнорадикального окиснення (ВРО), зокрема хронічного холециститу, зумовлює необхідність підвищення ефективності традиційних схем лікування. Одним із шляхів вирішення цього питання є використання засобів з антиоксидними властивостями, що потребує вдосконалення підходів до вибору антиоксидантів з урахуванням індивідуальних особливостей порушень окисного гомеостазу. Це має особливе значення в осіб, які зазнали дії негативних факторів аварії на ЧАЕС, оскільки у цієї категорії хворих спостерігається виснаження антиоксидних резервів організму [9].

Метою роботи було визначення особливостей змін вмісту сполук з ізольованими подвійними зв'язками (СІПЗ), дієнових (ДК) та оксодієнових (ОДК) кон'югатів і основ Шифа (ОШ) у хворих з незмінним, підвищеним і зниженим вмістом ТБК-активних продуктів (ТБК-АП).

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Проведено обстеження 92 хворих з хронічним холециститом (K81.1), які в 1986-1987 рр. брали участь в ліквідації наслідків аварії на ЧАЕС. Середній їх вік становив (46,7±2,1) року. Документована доза зовнішнього опромінення у більшості пацієнтів не перевищувала 0,35 Гр. У контрольну групу було включено 22 практично здорові особи (віком 32-46 років) без додат-

© О.В. Носач, 2003.

кового впливу іонізуючого випромінювання в анамнезі.

Кров для визначення вмісту СІПЗ, ДК, ОДК [2] і ОШ [8] відбирали натщесерце в присутності ЕДТА в концентрації 1 ммоль/1 мл цільної крові.

Відомо, що вміст хромогенних продуктів, які утворюються при реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою, є адекватним віддзеркаленням концентрації в біологічному матеріалі вторинного продукту перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) – малонового діальдегіду (МДА). У плазмі крові (без ЕДТА) визначали базальний (ТБК-АПб) та, при додаванні в реакційне середовище іонів заліза ( $Fe^{2+}$ ), ферумстимульований (ТБК-АП+ $Fe^{2+}$ ) вміст ТБК-АП за модифікацією методу М. Uchiyama, М. Michara (1978) [1] з урахуванням рекомендацій щодо більш повної реєстрації триметилового комплексу [3]. Співвідношення між ТБК-АП+ $Fe^{2+}$  і ТБК-АПб використовували як показник резерву ліпідів для перекисного окиснення (РЛПО) згідно з методичним підходом, запропонованим у роботі [7]. Швидкість утворення ТБК-АП визначали як різницю між показниками ТБК-АП+ $Fe^{2+}$  і ТБК-АПб за умови, що аналіз вмісту ТБК-АП+ $Fe^{2+}$  проводили після інкубації пробі протягом 15 хв при температурі 37 °С.

Статистичну обробку результатів дослідження здійснювали за допомогою статистичного пакета SPSS (v. 10.0.5 for Windows; "Навігатор", 2001). При дескриптивному аналізі кожної вибірки розраховували середнє значення (M) та стандартну похибку (SEM). Показники вибірок порівнювали за U-тестом Манна-Уїтні.

Характер зв'язку між змінними визначали шляхом розрахунку рангового коефіцієнта кореляції Спірмена. Нормою вважали значення в межах ( $M \pm 1,5$ )  $\sigma$  контрольної групи.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Аналіз результатів дослідження показав, що під час нестійкої клінічної ремісії у хворих на фоні збільшення вмісту СІПЗ ( $(2,495 \pm 0,074)$  і  $(1,843 \pm 0,113)$   $E_{220}$ /мл для основної та контрольної груп відповідно;  $p < 0,01$ ), що характеризують наявний субстрат для ПОЛ, мала місце активація процесів ВРО з накопиченням ДК ( $(1,207 \pm 0,046)$  і  $(0,883 \pm 0,092)$   $E_{232}$ /мл відповідно;  $p < 0,05$ ) і ОДК ( $(0,739 \pm 0,032)$  і  $(0,536 \pm 0,044)$   $E_{278}$ /мл відповідно;  $p < 0,05$ ). Вміст ТБК-АПБ ( $(4,535 \pm 0,136)$  і  $(4,248 \pm 0,180)$  нмоль/мл відповідно;  $p > 0,3$ ) та ОШ ( $(0,219 \pm 0,010)$  і  $(0,219 \pm 0,002)$   $E_{400}$ /мл відповідно;  $p > 0,9$ ) не відрізнявся від показників контрольної групи. Відмінні від норми індивідуальні значення показників вмісту ТБК-АПБ зареєстровано у 29 % хворих.

Для визначення особливостей перебігу процесів ПОЛ, що супроводжуються змінами вмісту ТБК-АП, хворих було поділено на 3 підгрупи. У I підгрупу включено 65 осіб з незмінним вмістом ТБК-АПБ ( $(4,403 \pm 0,090)$  нмоль/мл,  $p > 0,5$ ); в II ( $n=17$ ) – з підвищеним вмістом ТБК-АПБ ( $(6,370 \pm 0,194)$  нмоль/мл,  $p < 0,001$ ); в III ( $n=10$ ) – зі знизеним вмістом ТБК-АПБ ( $(2,278 \pm 0,174)$  нмоль/мл,  $p = 0,001$ ).

Як видно з таблиці 1, в підгрупах з незмінним і збільшеним вмістом ТБК-АПБ був підвищений рівень СІПЗ ( $p < 0,01$  і  $p < 0,05$  відповідно), ДК та ОДК ( $p < 0,05$  для всіх показників) порівняно з контрольною групою, тоді як при знизенні вмісту ТБК-АПБ вірогідно підвищеним був лише вміст СІПЗ ( $p < 0,01$ ). Підгрупи зі змінним вмістом ТБК-АПБ не відрізнялися від I підгрупи та між собою за рівнем СІПЗ, ДК, ОДК та ОШ.

Відомо, що рівень вмісту ТБК-АП залежить як від інтенсивності утворення цих сполук, так і від спроможності систем організму щодо їх метаболічних перетворень. Утилізація надлиш-

ку токсичних продуктів ПОЛ може відбуватися за рахунок утворення сполук типу ОШ. Отже, при активації процесів ВРО з підвищенням рівня ДК і ОДК збільшення вмісту ТБК-АП не пов'язане з порушенням залучення ТБК-АП в метаболічні процеси, бо в такому випадку надлишок цих продуктів призводив би до зростання рівня ОШ.

Кореляційний аналіз показників ПОЛ у хворих I підгрупи свідчить про наявність достовірної позитивної кореляції високого ступеня зв'язку між показниками вмісту СІПЗ і ДК, СІПЗ і ОДК, ДК і ОДК, середнього – між СІПЗ і ОШ, ДК і ОШ, ОДК і ОШ (табл. 2).

У підгрупі з підвищеним вмістом ТБК-АПБ порушуються наявні в I підгрупі кореляційні зв'язки між вмістом ОШ і СІПЗ, ДК, ОДК, тоді як при знизенні вмісту ТБК-АПБ мав місце лише достовірний кореляційний зв'язок високого ступеня між вмістом СІПЗ і ДК ( $q < 0,01$ ), але виникав кореляційний зв'язок високого ступеня між ТБК-АПБ та ОШ ( $q < 0,01$ ). Описані зміни можуть бути проявом дезорганізації метаболічних перетворень продуктів ПОЛ у хворих зі змінним вмістом ТБК-АПБ.

Попередні дослідження перебігу процесів ВРО свідчать, що рівень утворення продуктів ПОЛ залежить від взаємодії кількох факторів, зокрема наявності субстрату для окиснення, дії прооксидантів та активності антиоксидної системи. При аналізі даних встановлено, що у хворих з підвищеним вмістом ТБК-АПБ рівень ТБК-АП+ $Fe^{2+}$  в плазмі крові був вищим ( $p < 0,001$ ) порівняно з контрольною групою і I підгрупою (табл. 3).

Підгрупи зі змінним вмістом ТБК-АПБ відрізнялися від I підгрупи за рівнем РЛПО: так, порівняно з I підгрупою при підвищеному вмісті ТБК-АПБ спостерігалось знизення значень показника ( $p < 0,05$ ). Найбільша стимуляція утворення ТБК-АП при дії  $Fe^{2+}$  відбувалася в підгрупі зі зменшеним базальним вмістом цих сполук – РЛПО підвищувався відносно контрольної групи ( $p < 0,01$ ), I і II підгруп ( $p = 0,001$ ). Зміни швидкості утворення ТБК-АП не набували достовірних значень.

Таблиця 1 – Вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів в крові хворих з різним базальним рівнем ТБК-активних продуктів ( $M \pm SEM$ )

Група (підгрупа) обстеження	Сполуки з ізольованими подвійними зв'язками, $E_{220}$ /мл	Дієнові кон'югати, $E_{232}$ /мл	Оксодієнові кон'югати, $E_{278}$ /мл	Основи Шифа, $E_{400}$ /мл
Контрольна група ( $n=22$ )	$1,843 \pm 0,113$	$0,883 \pm 0,092$	$0,536 \pm 0,044$	$0,219 \pm 0,002$
I підгрупа ( $n=65$ )	$2,536 \pm 0,088^{**}$	$1,228 \pm 0,051^*$	$0,750 \pm 0,042^*$	$0,224 \pm 0,011$
II підгрупа ( $n=17$ )	$2,533 \pm 0,209^*$	$1,290 \pm 0,118^*$	$0,755 \pm 0,068^*$	$0,226 \pm 0,014$
III підгрупа ( $n=10$ )	$2,910 \pm 0,270^{**}$	$1,261 \pm 0,209$	$0,688 \pm 0,077$	$0,207 \pm 0,053$

Примітка: \*, \*\* – різниця між зазначеною підгрупою і контрольною групою достовірна ( $p < 0,05$  і  $p < 0,01$  відповідно); тут і далі I, II, III – підгрупи з незмінним, підвищеним, знизеним вмістом ТБК-АПБ відповідно.

Таблиця 2 – Значення коефіцієнтів рангової кореляції Спірмена ( $r_s$ ) між вмістом продуктів перекисного окиснення ліпідів в крові хворих з різним базальним рівнем ТБК-активних продуктів

Показники	I підгрупа (n=65)		II підгрупа (n=17)		III підгрупа (n=10)	
	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$	$r_s$	$p$
СІПЗ і ДК	0,721**	0,000	0,670**	0,003	0,922**	0,001
СІПЗ і ОДК	0,729**	0,000	0,678**	0,003	0,530	0,177
СІПЗ і ТБК-АП <sub>6</sub>	0,171	0,180	-0,293	0,253	-0,310	0,456
СІПЗ і ОШ	0,640**	0,000	0,072	0,783	-0,071	0,879
ДК і ОДК	0,813**	0,000	0,907**	0,000	0,558	0,151
ДК і ТБК-АП <sub>6</sub>	0,282*	0,025	-0,239	0,356	-0,299	0,471
ДК і ОШ	0,615**	0,000	0,183	0,481	0,072	0,878
ОДК і ТБК-АП <sub>6</sub>	0,227	0,074	-0,334	0,190	-0,048	0,910
ОДК і ОШ	0,627**	0,000	0,175	0,501	0,218	0,638
ТБК-АП <sub>6</sub> і ОШ	0,120	0,367	-0,009	0,972	0,964**	0,000

Примітка. \*,\*\* – двостороння кореляція достовірна на рівні  $q < 0,05$  і  $q < 0,01$  відповідно.

Таблиця 3 – Резерв ліпідів для перекисного окиснення (РЛПО), ферумстимульований вміст (ТБК-АП+Fe<sup>2+</sup>) та швидкість утворення ТБК-активних продуктів в плазмі крові хворих з різним базальним рівнем ТБК-активних продуктів (M±SEM)

Група (підгрупа) обстеження	РЛПО, від. од.	ТБК-АП+Fe <sup>2+</sup> нмоль /мл	Швидкість утворення ТБК-АП нмоль/мл·год
Контрольна група (n=22)	1,514±0,097	6,231±0,270	46,667±3,813
I підгрупа (n=65)	1,543±0,037	6,701±0,179	49,392±3,454 <sup>a</sup>
II підгрупа (n=17)	1,403±0,047 <sup>#</sup>	8,949±0,420 <sup>***,##</sup>	40,031±4,175
III підгрупа (n=10)	3,022±0,672 <sup>***,##,###</sup>	5,913±0,609 <sup>###</sup>	–

Примітка: \*\*,\*\*\* – різниця між зазначеною підгрупою і контрольною групою достовірна ( $p < 0,01$  і  $p < 0,001$  відповідно); #,## – різниця між зазначеною і I підгрупами достовірна ( $p < 0,05$  і  $p < 0,001$  відповідно); ### – різниця між II і III підгрупами достовірна ( $p = 0,001$ ); <sup>a</sup> – n=21.

Взагалі підгрупа зі зниженим вмістом ТБК-АП<sub>6</sub> потребує окремого розгляду. Хворі з таким характером змін становлять 11 % від загальної кількості обстежених. У цій підгрупі на фоні зростання рівня СІПЗ ( $p < 0,01$ ) не спостерігалось достовірних змін вмісту ДК, ОДК та ОШ, а порушення кореляційних зв'язків між вмістом продуктів ПОЛ було найбільш вираженим.

За даними літератури, зниження вмісту МДА може відбуватися як за рахунок вимивання у кров значної кількості антиоксидантів неферментної природи при деструкції клітинних структур, так і внаслідок виснаження пулу оксигеназних реакцій [4, 10]. Крім того, враховуючи, що вміст ТБК-АП залежить від ліпідного складу клітинних мембран [13], зменшення вмісту в сироватці крові та еритроцитах продуктів ПОЛ (ДК, МДА) у експериментальних тварин [6] і осіб [5, 12], які зазнали дії іонізуючого випромінювання, пов'язують також зі зниженням рівня ненасичених жирних кислот у мембранах клітин [11].

Існує думка, що зниження вмісту продуктів ПОЛ є несприятливою прогностичною ознакою, оскільки відображає тенденцію до розвитку декомпенсованих процесів, а також тому, що продукти ПОЛ при різких змінах їхньої концентрації в біологічних рідинах і тканинах можуть ініціювати низку адаптаційних метаболіч-

них перетворень [4, 6]. Враховуючи, що РЛПО найбільший саме в цій підгрупі, чого не відбувалося б при зменшенні вмісту субстрату для окиснення (це підтверджується також підвищеним вмістом СІПЗ), зниження рівня ТБК-АП може бути проявом виснаження пулу оксигеназних реакцій. Збільшення ж прооксидної дії Fe<sup>2+</sup> in vitro пояснюється недостатністю систем антиоксидного захисту за цих умов, що може бути пов'язано як із виснаженням резервів неферментної ланки, так і з порушенням мембранозалежних функцій клітинних і субклітинних структур.

**ВИСНОВКИ.** 1. Дезорганізація метаболічних перетворень продуктів ПОЛ при змінах вмісту ТБК-АП проявляється у порушенні кореляційних зв'язків між вмістом первинних, проміжних і кінцевих продуктів ліпопероксидації.

2. Вплив Fe<sup>2+</sup> на утворення ТБК-АП в крові найбільш виражений у хворих зі зниженим вмістом цих сполук. При призначенні таким пацієнтам препаратів, що містять залізо, необхідно проводити визначення показників окисного гомеостазу в динаміці.

3. Подальші дослідження механізмів розвитку описаних змін дозволять розробити критерії вибору засобів антиоксидної терапії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41-43.
2. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Я., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопр. мед. химии. – 1989. – **35**, вып. 1. – С. 127-131.
3. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Мажуль Л.М. Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с тиобарбитуровой кислотой // Вопр. мед. химии. – 1987. – **33**, № 1. – С. 118-122.
4. Гжегоцький М.Р., Мельник О.І., Мисаконець О.Г. та ін. Реакція процесів ліпопероксидації на сумісну дію низьких доз опромінення та гіпотиреозу в щурів // Укр. біохім. журн. – 2002. – **74**, № 46. – С. 215.
5. Грицай Н.Н., Мищенко О.И., Цебржинский О.И. и др. Антиоксидантный статус у лиц, участвовавших в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС // Всесоюзная конференция "Радиобиологические последствия аварии на Чернобыльской АЭС": Тез. докл. – Минск, 1991. – С. 33.
6. Конык У.В., Козак Л.П., Гжегоцький М.Р. и др. Изменение про- и антиоксидантных параметров при бинарном воздействии ионизирующего излучения и фтористой интоксикации // Междунар. журн. радиац. медицины. – 2001. – **3**, № 1-2. – С. 213.
7. Кузьменко Д.И., Лаптев Б.И. Оценка резерва липидов сыворотки крови для перекисного окисления в динамике окислительного стресса у крыс // Вопр. мед. химии. – 1999. – **45**, вып. 1. – С. 47-52.
8. Львовская Е.И., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е., Лифшиц Р.И. Спектрофотометрическое определение конечных продуктов перекисного окисления липидов // Вопр. мед. химии. – 1991. – **37**, вып. 4. – С. 92-93.
9. Овсянникова Л.М., Алёхина С.М., Дробинская О.В. и др. Нарушения окислительного гомеостаза у лиц, подвергшихся воздействию факторов Чернобыльской аварии (отдалённый период) // Междунар. журн. радиац. медицины. – 2001. – **3**, № 3-4. – С. 85-96.
10. Тимочко М.Ф., Єлісєєва О.П., Кобилінська Л.І., Тимочко І.Ф. Метаболічні аспекти формування кисневого гомеостазу в екстремальних станах. – Львів: Місіонер, 1998. – 142 с.
11. Чаяло П.П., Чоботько Г.М. Метаболічні наслідки аварії на Чернобыльській АЕС. – К.: Чернобыльінтерінформ, 2001. – 152 с.
12. Чаяло П.П., Чоботько Г.М., Паламар Л.А. та ін. Характеристика ліпідного обміну та стан вільнорадикальних процесів у працівників 30-кілометрової зони відчуження Чернобыльської АЕС // Укр. радіол. журн. – 1997. – № 4. – С. 387-389.
13. Visioli F., Colombo C., Galli C. Oxidation of individual fatty acids yields different profiles of oxidation markers // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1998. – **245**, № 2. – P. 487-489.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЦЕССОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ТБК-АКТИВНЫХ ПРОДУКТОВ В КРОВИ

Е.В. Носач

НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РАДИАЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ АМН УКРАИНЫ

### Резюме

Описаны изменения содержания диеновых, оксодиеновых конъюгатов, ТБК-активных продуктов и оснований Шиффа в крови больных с хроническим холециститом, которые участвовали в ликвидации последствий аварии на ЧАЭС. Проведен анализ корреляционных связей между продуктами липопероксидации. Установлено увеличение прооксидного действия ионов железа (II) при снижении уровня ТБК-активных продуктов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: перекисное окисление липидов, ТБК-активные продукты, ионизирующее излучение.

## THE CHARACTERISTIC OF LIPID PEROXIDATION PROCESSES IN PATIENTS WITH DIFFERENT CONTENTS OF TBA-ACTIVE SUBSTANCES IN BLOOD

O.V. Nosach

RESEARCH CENTRE FOR RADIATION MEDICINE OF ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES OF UKRAINE

### Summary

The changes of the levels of diene, oxodiene conjugates, TBA-active substances and Schiff bases in blood of patients (liquidators of the Chernobyl accident) with chronic cholecystitis are described. The correlation analysis between products of lipoperoxidation is conducted. It has been established that at low level of TBA-active substances the prooxidant effect of ferric (II) iron is enhanced.

KEYWORDS: lipid peroxidation, TBA-active substances, ionizing radiation.

Отримано 02.09.2003 р.

Адреса для листування: О.В. Носач, вул. Макиївська, 7, кв. 97, Київ, 04114, Україна.

## ВПЛИВ АЦЕТОНУ, ФЕНОБАРБІТАЛУ ТА ПРЕПАРАТУ "INOD'AIL" НА ТОКСИЧНІСТЬ БРОМБЕНЗОЛУ І ТЕТРАХЛОРМЕТАНУ ТА БІОТРАНСФОРМАЦІЮ БРОМБЕНЗОЛУ В ЩУРІВ

С.О. Качула

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА, ВІННИЦЯ

Під час дослідів на 146 щурах було показано, що введення ацетону (1 г/кг) та фенобарбіталу (70 мг/кг) посилює, а препарату "INOD'AIL" (400 мг/кг) послаблює токсичність бромбензолу та  $CCl_4$  щодо ізольованих гепатоцитів. Ацетон та, меншою мірою, фенобарбітал посилюють гепато-, нефро- та пульмотоксичний потенціали бромбензолу, а INOD'AIL – послаблює. Ацетон, індукуючи активність CYP2E1, посилює утворення токсичних метаболітів бромбензолу й одночасно пригнічує активність процесів кон'югації бромфенолів. Фенобарбітал активує і CYP2E1, і ферменти кон'югації. INOD'AIL гальмує CYP2E1 та активує ферменти кон'югації.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ацетон, фенобарбітал, препарат часнику, токсичність, бромбензол, тетрахлорметан.

ВСТУП. Біотрансформація відіграє ключову роль в реалізації несприятливої дії ксенобіотиків. Тому індукція чи блокування метаболізуючих ферментів може істотно посилити або послабити токсичний вплив ксенобіотиків. Серед індукторів найбільш відомим є фенобарбітал (ФБ), який посилює експресію понад 50 генів [10]. Ацетон переважно індукує CYP2E1 і мало змінює активність інших ферментів [6, 10]. Особливу дію проявляють сірковмісні сполуки часнику, такі, як діалісульфід, які здебільшого індукують ферменти кон'югації [12].

До речовин з чіткою залежністю токсичної дії від біотрансформації належать бромбензол (ББ) та тетрахлорметан ( $CCl_4$ ). ББ у реакції, каталізованій CYP2E1, утворює токсичні епоксиди [1, 9], які за участю глутатіон-S-трансферази (ГТФ) перетворюються в меркаптурові кислоти. Розщеплення епоксидів також призводить до утворення бромкатехолів чи бромфенолів, які можуть детоксикуватись завдяки кон'югації з глюкуроною кислотою та сульфатом або бути джерелом радикалів кисню та семііонних радикалів [8, 9]. У процесі каталізованого CYP2E1 метаболізму  $CCl_4$  виникає трихлорметильний радикал, який ковалентно зв'язується з білками та ініціює процеси

перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [11]. Як впливають індуктори на процеси токсифікації бромбензолу і  $CCl_4$  – не досліджено.

Метою роботи було оцінити вплив ФБ, ацетону та препарату часнику "INOD'AIL" на активність метаболізуючих ферментів, метаболізм та токсичність ББ і  $CCl_4$  у щурів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 146 щурах-самцях. Тваринам перорально тричі вводили по 1 г/кг ацетону або 5 разів по 400 мг/кг INOD'AIL, або 5 разів по 70 мг/кг ФБ. У дослід щурів брали через добу після останнього введення ацетону та INOD'AIL та через 2 доби після введення ФБ. У печінці, нирках і легенях визначали активність анілінгідроксилази (АГ), паранітрофенолгідроксилази (п-НФГ), УДФ-глюкуронілтрансферази (УДФ-ГТ, КФ 2.4.1.17), фенолсульфотрансферази (ФСТ, КФ 2.8.2.1) та глутатіон-S-трансферази (ГТФ, КФ 2.5.1.18), як описано раніше [1].  $CCl_4$ -залежне ПОЛ визначали за утворенням продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою [3]. Гепатоцити отримували колагеназним методом, а їх життєздатність оцінювали за поглинанням трипанового синього, виходом лактатдегідрогенази (ЛДГ) в позаклітинну рідину, зменшенням вмісту відновленого

глутатіону (GSH) при інкубації гепатоцитів з 0,6 мМ бромбензолом або 0,6 мМ  $CCl_4$  протягом 120 хв, як це описано раніше [1].

Гепато-, нефро- та пульмотоксичність ББ оцінювали після його перорального введення в дозі 1 г/кг. У добовій сечі визначали вміст білка, креатиніну, активність гамма-глутаміл-трансферази (ГГТФ), у сироватці крові – вміст креатиніну, активність аланінамінотрансферази (АлАТ, КФ 2.6.1.2), аспаратамінотрансферази (АсАТ, КФ 2.6.1.1) [4]. Лаваж легень проводили 0,9 % розчином натрію хлориду, в рідині змивів визначали вміст білка, активність ГГТФ та глутатіон-S-трансферази.

Метаболізм ББ вивчали після його введення в шлунок в дозі 200 мг/кг. У сечі, зібраній за 18 год, визначали вміст меркаптурових кислот (продукти деградації кон'югатів глутатіону з епоксидами) за кількістю утворених після лужного гідролізу тіоефірів [7]. Вміст вільних та кон'югованих бромфенолів визначали за реакцією з 4-аміноантипірином [2], бромкатехолів – за утворенням комплексів з  $CoCl_2$  [5].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Ацетон, ФБ та INOD'AIL по-різному впливали на маркерні активності CYP2E1. Ацетон та ФБ стимулювали активність АГ в мікосоммах печінки (до  $(2,16 \pm 0,17)$  та  $(1,71 \pm 0,12)$  нмоль/хв/мг білка при  $(0,85 \pm 0,06)$  в контролі,  $p < 0,05$ ), тоді як INOD'AIL її гальмував ( $(0,53 \pm 0,05)$  нмоль/хв/мг білка). Під впливом ацетону та ФБ активність п-НФГ зростала в 3,75 та 2,32 рази, а INOD'AIL гальмував її на 43 %. Ацетон і ФБ стимулювали  $CCl_4$ -залежне ПОЛ (до  $(9,88 \pm 0,64)$  та  $(9,09 \pm 0,54)$  нмоль/хв/мг білка при  $(3,74 \pm 0,45)$  в контролі), тоді як INOD'AIL зменшував його до  $(2,01 \pm 0,16)$  нмоль/хв/мг білка. Ацетон знижував активність УДФ-ГТ в мікосоммах печінки (до  $(2,59 \pm 0,21)$  при  $(3,17 \pm 0,21)$  нмоль/хв/мг білка в контролі,  $p < 0,1$ ), а ФБ та INOD'AIL достовірно її підвищували (до  $(5,02 \pm 0,30)$  та  $(5,45 \pm 0,27)$  нмоль/хв/мг білка). Ацетон вірогідно зменшував активність ФСТ в печінці (до  $(0,26 \pm 0,02)$  при  $(0,36 \pm 0,02)$  нмоль/хв/мг білка в контролі), але ФБ та INOD'AIL стимулювали цей фермент (до  $(0,46 \pm 0,03)$  та  $(0,50 \pm 0,03)$  нмоль/хв/мг білка).

Зміни активності ферментів знайшли своє відображення в біотрансформації ББ (табл. 1). Під впливом ацетону екскреція меркаптурових кислот зростала на 83 %, загальних бромфенолів – на 30 %, вільних бромфенолів – на 84 %, частка кон'югованих бромфенолів зменшувалась на 21 %. Значно стимулювалось виведення бромкатехолів – на 63 %. ФБ також сти-

мулював метаболізм ББ, хоча і менше, ніж ацетон, але особливістю його дії було стимулювання процесів кон'югації і частка кон'югованих бромфенолів зростала. INOD'AIL гальмував біотрансформацію ББ. Екскреція меркаптурових кислот знижувалась на 29,4 %, бромкатехолів – на 39,6 %. Значно посилювались процеси кон'югації – кількість вільних бромфенолів в сечі зменшувалась на 75 %, а частка кон'югованих бромфенолів збільшувалась на 14 %.

Ми дослідили токсичну дію ББ та  $CCl_4$  на ізолювані гепатоцити, одержані від інтактних щурів або тварин, які отримували індуктори (табл. 2). У процесі інкубації з ББ та  $CCl_4$  відбувалося швидке зниження життєздатності гепатоцитів, кількість клітин, які поглинули трипановий синій, збільшилась у 4,3 та 4,9 рази, активність позаклітинної ЛДГ зросла в 2,0 та 2,1 рази, вміст GSH зменшився на 60 та 44 % відповідно.

Введення ацетону значно підсилювало токсичну дію ББ та  $CCl_4$ . Кількість гепатоцитів, які фарбувались трипановим синім, зросла на 69 та 62 %, активність ЛДГ – на 35 та 46 %, а вміст GSH зменшився на 40 та 37 % відповідно. Введення ФБ збільшувало частку пофарбованих гепатоцитів на 58 та 46 %, активність ЛДГ – на 20 та 32 %, зменшувало вміст GSH на 20 та 21 %. Однак INOD'AIL зменшував індукване ББ та  $CCl_4$  фарбування гепатоцитів на 42 та 48 %, активність ЛДГ – на 36 та 23 %, перешкоджав зниженню рівня GSH на 96 та 53 % відповідно.

У дослідях *in vivo* (табл. 3) показано, що ББ викликав важке ураження печінки, яке проявилось підвищенням у 4 рази активності трансаміназ у сироватці, зниженням на 67 % вмісту GSH у печінці, пошкодження легень, яке супроводжувалось зростанням вмісту білка (в 1,95 рази) та активності ГТФ і ГГТФ (у 3 рази) в рідині лаважу та нирок, вмісту білка та ГГТФ у сечі (в 2,2 та 3,2 рази), рівня креатиніну в сироватці крові (в 1,5 рази).

Токсичність ББ значно посилювалась після введення ацетону: активність трансаміназ зросла майже в 7 разів, рівень GSH знизився на 85 %. Вміст білка в рідині змивів збільшився у 2,7 рази, а активність ГТФ і ГГТФ – в 3,9 та 4,3 рази. Екскреція білка та ГГТФ із сечею зросла в 3,2 та 4,6 рази, рівень креатиніну – на 66 %. ФБ також посилював токсичність ББ, хоча і поступався ацетону. INOD'AIL зменшував токсичність ББ. Активність АлАТ та АсАТ збільшилась лише в 2,0 та 1,9 рази, вміст GSH знизився тільки на 38 %. Вміст білка в рідині змивів зростав в 1,6 рази, а ГТФ та ГГТФ – в 1,9 та

Таблиця 1 – Вплив ацетону, фенобарбіталу та INOD'AIL на екскрецію із сечею щурів метаболітів ББ після його введення в дозі 127 мкмоль на 100 г маси ( $M \pm m$ )

Метаболіти ББ у сечі за 12 год, мкмоль/100 г маси щурів	Контроль, n=10	Ацетон, n=10	ФБ, n=8	INOD'AIL, n=9
Усі метаболіти	57,90±3,42	85,00±3,36*	72,70±3,49*	40,20±2,17*
Меркаптурати	28,90±1,70	53,00±2,60*	43,80±2,41*	20,40±1,46*
Загальні бромфеноли	17,10±1,44	22,30±1,08*	21,30±1,16*	16,20±0,89
Вільні бромфеноли	4,12±0,34	7,59±0,48*	4,99±0,30*	2,36±0,15*
Кон'юговані бромфеноли	13,00±1,21	14,70±0,84	16,30±0,97*	13,80±0,81
Кон'юговані бромфеноли, % від загальних бромфенолів	74,90±2,00	65,80±1,52*	76,50±0,97	85,30±0,72*
Загальні катехоли	5,99±0,49	9,79±0,88*	7,63±0,37*	3,62±0,26*

Примітка. \* – достовірні відмінності порівняно з контролем.

Таблиця 2 – Вплив ацетону, фенобарбіталу та INOD'AIL на токсичність  $CCl_4$  і ББ щодо ізольованих гепатоцитів (n=5,  $M \pm m$ )

Умови досліджу	Контроль	Ацетон	ФБ	INOD'AIL
Кількість клітин, пофарбованих трипановим синім, %				
До інкубації	9,0±0,9	12,0±1,9	11,6±1,7	9,6±1,7
Через 120 хв від початку інкубації				
Інтактні клітини	19,6±1,5	29,8±1,7	29,8±1,7	16,2±1,5
ББ, 0,6 мМ	38,7±2,7	61,0±3,9*	61,0±3,9*	22,4±1,9*
$CCl_4$ , 0,6 мМ	43,9±3,2	64,2±4,1*	64,2±4,1*	23,0±1,9*
Вихід лактатдегідрогенази в інкубаційне середовище, %				
До інкубації	100	100	100	100
Через 120 хв від початку інкубації				
Інтактні клітини	138,0±3,2	150,0±7,9	147,0±5,2	139,0±6,6
ББ	202,0±9,4	272±15*	243±11*	140,0±6,9*
$CCl_4$	210±12	306±15*	278±17*	163,0±7,1*
Відновлений глутатон (GSH), нмоль на 1 млн клітин				
До інкубації	39,9±1,7	32,6±1,9	45,4±1,9	46,6±2,1
Через 120 хв від початку інкубації				
Інтактні клітини	30,3±1,4	28,2±1,7	33,8±1,9	38,4±2,1
ББ	15,9±1,2	9,60±0,64*	12,60±0,86*	31,2±1,2*
$CCl_4$	22,3±1,2	14,00±0,86	17,8±1,1	34,2±1,7*

Примітка. \* – достовірні відмінності порівняно з контролем.

Таблиця 3 – Вплив ацетону, фенобарбіталу та INOD'AIL на гепато-, пульмо- та нефротоксичність ББ (n= 8-9,  $M \pm m$ )

Показники	Контроль	ББ	Ацетон + ББ	ФБ + ББ	INOD'AIL + ББ
Показники гепатотоксичності					
АлАТ у сироватці крові, мкмоль/л/год	0,49±0,06	1,95±0,15	3,42±0,20*	2,63±0,22*	0,97±0,08*
АсАТ у сироватці крові, мкмоль/л/год	0,56±0,07	2,28±0,19	3,84±0,21*	2,96±0,23*	1,09±0,08*
GSH у печінці, мкмоль/г	6,65±0,40	2,20±0,20	0,99±0,15*	1,52±0,18*	4,15±0,22*
Показники пульмотоксичності (рідина бронхоальвеолярного лаважу)					
Білок, мг/л	6,79±0,45	13,30±0,61	18,50±0,68*	15,30±0,69*	10,60±0,34*
ГТФ, нмоль/хв	0,32±0,05	0,94±0,04	1,24±0,05*	1,08±0,04*	0,62±0,04*
ГГТФ, нмоль/хв/л	0,25±0,04	0,75±0,06	1,08±0,05*	0,89±0,03*	0,51±0,03*
Показники нефротоксичності					
Білок у сечі, мг/мл	5,89±0,86	11,70±0,84	18,90±1,03*	15,00±1,06*	8,80±0,60*
ГТТФ у сечі, нмоль/хв/мл	1,09±0,14	3,44±0,25	5,03±0,25*	4,22±0,22*	1,93±0,15*
Креатинін у сироватці крові, мкмоль/л	72,00±4,57	107,8±2,8	119,8±4,4*	112,0±4,0	93,9±3,2*

Примітка. \* – достовірні відмінності щодо групи "бромбензол".



2,0 рази. Рівень білка в сечі перевищував контроль лише на 49 %, активність ГГТФ у сечі – на 77 %, вміст креатиніну в сироватці крові – на 30 %.

Таким чином, кожен з індукторів викликає специфічні зміни в системі біотрансформації ББ. Ацетон, індукуючи CYP2E1, одночасно пригнічував ферменти кон'югації з глюкуроною кислотою та сульфатом, тому він значно посилював утворення реакційноздатних метаболітів ББ (які екскретувалися у вигляді меркаптурових кислот та бромкатехолів) і зменшував кон'югацію бромфенольних метаболітів. Наслідком цих змін було значне підсилення токсичності CCl<sub>4</sub> та ББ. ФБ стимулював утворення меркаптурових кислот, бромфенольних та катехольних метаболітів, однак не знижував здатності до кон'югації останніх і за здатністю посилювати токсичність ББ та CCl<sub>4</sub> поступався ацетону. Особливістю INOD'AIL була його здатність гальмувати CYP2E1 та активувати ферменти кон'югації. Його введення пригнічувало утворення токсичних метаболітів ББ і прискорювало кон'югацію бромфенольних метаболітів.

літів. Препарат ефективно протидіяв токсичним ефектам ББ та CCl<sub>4</sub>.

**ВИСНОВКИ.** 1. Введення ацетону викликає індукцію маркерних активностей CYP2E1 – анілін- та паранітрофенолгідроксилаз і пригнічення активності УДФ-глюкуроніл- та фенолсульфотрансфераз в печінці щурів. Фенобарбітал підвищує активність як CYP2E1, так і кон'югованих ферментів. INOD'AIL гальмує активність CYP2E1 і посилює активність УДФ-глюкуроніл- та фенолсульфотрансфераз.

2. Ацетон та фенобарбітал стимулюють утворення з бромбензолу меркаптурових кислот та бромкатехолів, але перший зменшує, а другий посилює кон'югацію бромфенольних метаболітів. INOD'AIL пригнічує утворення меркаптурових кислот і посилює кон'югацію бромфенольних метаболітів.

3. Ацетон і, меншою мірою, фенобарбітал посилюють токсичність бромбензолу щодо печінки, легень і нирок та токсичність CCl<sub>4</sub> стосовно печінки. INOD'AIL значно ослаблює токсичні ефекти бромбензолу та CCl<sub>4</sub>.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Качула С.А., Пентюк А.А., Тертышная Е.В. и др. Изучение взаимосвязи гепато-токсического действия бромбензола и маркерных активностей цитохрома P450 и ферментов конъюгации // Соврем. Пробл. токсикол. – 2002. – № 2. – С. 40-44.
2. Коренман И.М. Методы определения органических соединений. – М.: Химия, 1975. – 360 с.
3. Костюк В.А. Роль ковалентного связывания и перекисного окисления липидов в повреждении печени четыреххлористым углеродом // Биохимия. – 1991. – **56**, № 10. – С. 1878-1885.
4. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В.Меньшикова. -М.: Медицина, 1987. – 368 с.
5. Azouz W.M., Parke D.V., Williams R.T. Studies in detoxication the determination of catechols in urine and the formation of catechols in rabbits receiving halogenobenzenes and other compounds // Biochem. J. – 1953. – **55**, № 1. – P. 146-151.
6. Chen R.M., Ueng T.H. Induction of cytochromes P450 1A, 2B and 2E in hamster1 tissues by acetone // Arch. Toxicol. – 1997. – **71**, № 8. – P. 489-495.
7. Henderson P.T., van Doorn R., Leijdekkers C.M. et al. Excretion of thioethers in urine after exposure to

electrophilic chemicals // IARC Sci. Publ. – 1984. – **59**. – P. 173-187.

8. Lau S.S., Monks T.J. The contribution of bromobenzene to our current understanding of chemically-induced toxicities // Life Sci. – 1988. – **42**, № 13. – P. 1259-1269.

9. Rombach E.M., Hanzlik R.P. Detection of adducts of bromobenzene 3,4-oxide with rat liver microsomal protein sulfhydryl groups using specific antibodies // Chem. Res. Toxicol. – 1999. – **12**, № 2. – P. 159-163.

10. Rushmore T.H., Kong A.N. Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes // Curr. Drug Metab. – 2002. – **3**, № 5. – P.4 81-490.

11. Weber L.W., Boll M., Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model // Crit. Rev. Toxicol. – 2003. – **33**, № 2. – P. 105-136.

12. Yang C.S., Chhabra S.K., Hong J.Y. et al. Mechanisms of inhibition of chemical toxicity and carcinogenesis by diallyl sulfide (DAS) and related compounds from garlic // J. Nutr. – 2001. – **131**, № 3s. – P. 1041S-1045S.

# ВЛИЯНИЕ АЦЕТОНА, ФЕНОБАРБИТАЛА И ПРЕПАРАТА "INOD'AIL" НА ТОКСИЧНОСТЬ БРОМБЕНЗОЛА И ТЕТРАХЛОРМЕТАНА И БИОТРАНСФОРМАЦИЮ БРОМБЕНЗОЛА У КРЫС

С.А. Качула

НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ПИРОГОВА, ВИННИЦА

## Резюме

Во время опытов на 146 крысах было показано, что введение ацетона (1 г/кг) и фенобарбитала (70 мг/кг) усиливает, а препарата "INOD'AIL" (400 мг/кг) ослабляет токсичность бромбензола и  $CCl_4$  относительно изолированных гепатоцитов. Ацетон и, в меньшей мере, фенобарбитал усиливают гепато-, нефро- и пульмотоксичный потенциалы бромбензола, а INOD'AIL – ослабливает. Ацетон, индуцируя активность CYP2E1, усиливает образование токсичных метаболитов бромбензола и одновременно угнетает активность процессов конъюгации бромфенолов. Фенобарбитал активирует и CYP2E1, и ферменты конъюгации. INOD'AIL тормозит CYP2E1 и активирует ферменты конъюгации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ацетон, фенобарбитал, препарат чеснока, токсичность, бромбензол, тетрахлорметан.

# THE EFFECT OF ACETONE, PHENOBARBITAL AND DRUG INOD'AIL ON THE TOXICITY OF BROMBENZENE AND TETRACHLORMETHANE AND BIOTRANSFORMATION OF BROMBENZENE IN RATS

S.O. Kachula

NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY M.I. PYROHOV, VINNYTSIA

## Summary

In experiments on 146 rats it is shown that the administration of acetone (1 g/kg), and phenobarbital (70 mg/kg) increases but drug INOD'AIL (400 mg/kg) decreases the toxicity of bromobenzene and  $CCl_4$  relatively isolated hepatocytes. Acetone and, to a lesser degree phenobarbital, increase hepato-, nephro- and pulmotoxic potentialities of bromobenzene, but INOD'AIL decreases it. Acetone, which induces the activity of CYP2E1, increases the production of toxic metabolites of bromobenzene, and at the same time, suppresses the activity of conjugation of bromophenols. Phenobarbital activates CYP2E1 and enzymes of conjugation. INOD'AIL restrains CYP2E1 and activates enzymes of conjugation.

KEY WORDS: acetone, phenobarbital, drug of garlic, toxicity, bromobenzene, tetrachloromethane.

Отримано 10.09.2003 р.

Адреса для листування: С.О. Качула, кафедра біохімії, Національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна.

Для отримання оперативної інформації звертайтеся до нашої сторінки в Інтернеті:  
<http://tdma.edu.te.ua>

## ВПЛИВ ЛІНЕКСУ ТА БІОСПОРИНУ НА ПРО- ТА АНТИОКСИДНИЙ СТАН КРОВІ ТА ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ ЩУРІВ ЗА УМОВ ГІПОТИРЕОЗУ

А.А. Маковійчук, І.Ф. Мещишен  
БУКОВИНСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

*Досліджено вплив еубіотиків лінексу і біоспорину на про- та антиоксидний стан крові і тканин шлунково-кишкового тракту за умов мерказолілового гіпотиреозу. Показано, що експериментальний гіпотиреоз викликає підвищення рівня малонового діальдегіду в еритроцитах та зниження активності прооксидних систем тканин шлунково-кишкового тракту. На цьому фоні має місце зростання рівня показників антиоксидного захисту (відновленого глутатіону та активності каталази). Введення на тлі експериментального гіпотиреозу лінексу і біоспорину впродовж 14 днів призводило до нормалізації про- та антиоксидного захисту організму, який особливо був виражений у біоспорину.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** мерказоліловий гіпотиреоз, про- та антиоксидантний захист, шлунково-кишковий тракт, лінекс, біоспорин.

**ВСТУП.** Збільшення частоти патологій щитоподібної залози, зокрема її гіпофункції, обґрунтовує доцільність проведення експериментальних досліджень для деталізації механізмів відповідних захворювань, а також наукового аналізу їх із метою ранньої діагностики, визначення прогнозу захворювання та вибору адекватної терапії.

Серйозною проблемою сучасної гастроентерології є порушення кишкового біоценозу в осіб різного віку при будь-якій патології людини. Порушення з боку шлунково-кишкового тракту вважають характерними ознаками тиреоїдної дисфункції [9].

Одним із загальноприйнятих методів попередження і лікування порушень кишкового біоценозу є використання еубіотиків – лікарських препаратів, що містять бактерії, які входять до складу нормальної мікрофлори кишечника чи сприяють її нормалізації. До них відносять біфідумбактерин, лактобактерин, біфікол. Перші два мають по одному компоненту мікрофлори кишечника, а біфікол – два, але із одного відділу кишки [12]. Однак більш оптимальним є застосування багатоконпонентних препаратів, які містять природну мікрофлору з різних відділів кишечника [8]. До них належать лінекс ("Лек", Словенія) і біоспорин (Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного АН України) [1, 10].

© А.А. Маковійчук, І.Ф. Мещишен – д.біол. н., проф., 2003.

Метою нашого дослідження було вивчити оксидно-антиоксидний стан організму за умов експериментального гіпотиреозу для розробки показань та протипоказань до використання еубіотиків лінексу і біоспорину при патології щитоподібної залози.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Експерименти проведено на 35-ти статевозрілих щурах-самцях масою 180-200 г. Для моделювання гіпотиреозу тваринам впродовж 14 днів вводили перорально мерказоліл із розрахунку 10 мг/кг маси тіла. Щурів поділили на чотири групи: I – контроль, II – дослідна, якій не призначали лікування (вводили внутрішньошлунково фізіологічний розчин натрію хлориду), III – дослідна, що отримувала лінекс і IV – дослідна, що одержувала біоспорин. Лінекс і біоспорин вводили перорально по одній дозі на 200 г маси тварини впродовж двох тижнів. Під легким ефірним наркозом проводили евтаназію щурів. Кров стабілізували гепарином, центрифугували при 3000 об./хв протягом 15 хв і відокремлювали плазму від формених елементів. Еритроцити тричі відмивали холодним фізіологічним розчином натрію хлориду. У тварин забирали шлунок, тонку і товсту кишки, старанно промивали холодним фізіологічним розчином натрію хлориду, висушували фільтрувальним папером і готували гомогенати для аналізу.

В еритроцитах, плазмі крові, тканинах шлунково-кишкового тракту визначали вміст

малонового діальдегіду (МДА) [11], окиснювальнономодифікованих білків (ОМБ) [5], відновленого глутатіону [6] та активність каталази [3].

Обробку експериментальних даних здійснювали варіаційно-статистичним методом із використанням критерію Стьюдента ( $t$ ).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Як свідчать дані таблиці 1, експериментальний гіпотиреоз викликає різнонаправлену дію щодо стану прооксидних систем організму. Так, вміст одного з прикінцевих метаболітів перекисного окиснення ліпідів – МДА – був підвищеним на 25,5 % в еритроцитах піддослідних тварин, зниженим на 22,6 і 12,2 % відповідно у тканинах шлунка і товстої кишки і не зазнав змін в тканинах тонкої кишки порівняно з контролем. За цих же умов експерименту рівень окиснювальнономодифікованих білків у плазмі крові, тканинах шлунка і тонкої кишки був зменшеним на 30,0, 26,4 і 17,4 % порівняно з контролем. Не виявлено змін даного показника у тканинах товстої кишки.

Відновлений глутатіон – основний компонент глутатіонової антиоксидної системи [4]. За умов експериментального гіпотиреозу його рівень в еритроцитах і тканинах товстої кишки не змінюється. У шлунку і тонкій кишці вміст відновленого глутатіону вищий, порівняно з контролем, на 30,3 і 48,2 % відповідно.

Фермент каталаза перебуває в "першому ешелоні" захисту від активних форм кисню, зокрема пероксиду водню, з якого при одноелектронному відновленні може утворюватися найактивніший кисневий радикал – гідроксильний. За нашими даними, активність каталази в еритроцитах гіпотиреозних тварин підвищена, порівняно з контролем на 34,6 %. Змін активності ферменту в тканинах шлунково-кишкового тракту не виявлено.

Таким чином, мерказоліловий гіпотиреоз викликає зниження активності прооксидних систем і підвищення дії антиоксидного захисту. Отримані нами дані узгоджуються з результатами інших дослідників [2, 13]. Мерказоліл відносять до антитиреоїдних (тиреостатичних) лікарських засобів. Механізм його дії зумовлений гальмуванням синтезу тироксину в щитоподібній залозі, що призводить до нормалізації метаболічних процесів у ній при гіперфункції.

Препарат знижує основний обмін. Ефект мерказолілу проявляється прискоренням елімінації із щитоподібної залози йодидів, пригніченням активності ферментних систем, які окиснюють йодиди до йоду. В результаті спостерігаються гальмування йодування тиреоглобуліну і перетворення дийодтирозину

в тироксин. За умов же фізіологічної норми в наших експериментах мерказоліл знижує пошкодження тканин шлунково-кишкового тракту, можливо, за рахунок пригнічення прооксидних систем, що генерують активні форми кисню, оскільки рівень окиснювальнономодифікованих білків в них достовірно знижений [7]. Не виключається і можливість безпосереднього чи опосередкованого впливу мерказолілу на стан антиоксидного захисту організму.

Використання для корекції виявлених змін показників оксидного та антиоксидного стану організму бактеріальних препаратів лінексу і біоспорину показало, що останній має переваги над першим. Так, біоспорин на фоні експериментального гіпотиреозу викликає нормалізацію в еритроцитах, тканинах шлунково-кишкового тракту рівня МДА, окиснювальної модифікації білків, відновленого глутатіону та активності каталази. Менш виражений вплив на корекцію вивчених показників проявляє лінекс.

В Інституті мікробіології і вірусології НАН України розроблено і впроваджено в медичну практику новий пробіотик біоспорин, який складається із двох штамів бацил – *B. subtilis* 3 і *B. licheniformis* 31, які доповнюють один одного за спектром антагоністичної активності [1, 9].

Новий ефективний бактеріальний препарат призначений для профілактики і лікування хворих з гострими кишковими інфекціями. Встановлено, що механізм лікувально-профілактичної дії біоспорину відрізняється від дії відомих пробіотиків і має багатоплановий та багатобактеріальний характер [9]. Основні ланки цього механізму дії такі: після приймання препарату *per os* він розчиняється в секреті порожнини шлунка. Бактеріальні клітини біоспорину, що перебувають у різних фізіологічних стадіях, відразу після введення починають вибірково пригнічувати патогенні та умовно-патогенні мікроорганізми. Завдяки широкому пристосуванню до різних умов існування, антагоністична активність бактерій, що входять до складу препарату, проявляється на всьому протязі травного каналу. Водночас з антагоністичною дією відбувається процес збагачення шлункового та кишкового секретів різними ферментами. Культури, що входять до складу біоспорину, характеризуються пектолітичною, целюлозолітичною, протеолітичною, амілолітичною та ліполітичною активністю [9].

Лінекс містить досить складну комбінацію живих ліофілізованих кишкових аеробів і анаеробів. Його складові компоненти стійкі до дії антибіотиків та інших хіміотерапевтичних

Таблиця 1 – Вплив лінексу і біоспорину на про- й антиоксидний стан крові та тканин шлунково-кишкового тракту щурів за умов гіпотиреозу ( $M \pm m$ ;  $n=7$ )

Об'єкт дослідження	Контроль	Гіпотиреоз	Корекція лінексом	Корекція біоспорином
Малоновий діальдегід				
Еритроцити, мкмоль/л	13,20±0,41	15,90±0,27*	14,00±0,23	12,80±0,23
Шлунок, мкмоль/г тк.	26,20±0,43	22,90±0,48*	26,60±0,54	24,80±0,29
Тонка кишка, мкмоль/г тк.	20,90±0,53	21,10±0,33	28,40±0,26*	20,80±0,61
Товста кишка, мкмоль/г тк.	15,60±0,39	13,90±0,23*	20,90±0,36*	14,60±0,23
Окиснювальна модифікація білків				
Плазма крові, мкмоль/л	41,00±1,37	25,00±1,26*	33,20±1,64*	39,50±1,33
Шлунок, мкмоль/г тк.	155,00±3,71	114,00±3,85*	136,00±3,29*	156,00±2,74
Тонка кишка, мкмоль/г тк.	381,00±8,09	313,00±8,08*	358,00±9,61	365,00±6,01
Товста кишка, мкмоль/г тк.	278,00±5,80	272,00±7,84	271,00±7,01	273,00±6,67
Відновлений глутатіон				
Еритроцити, мкмоль/мл	2,07±0,06	2,10±0,06	2,30±0,07*	2,01±0,05
Шлунок, мкмоль/г тк.	6,08±0,06	7,92±0,12*	6,35±0,15	7,22±0,11*
Тонка кишка, мкмоль/г тк.	4,05±0,08	6,03±0,18*	7,07±0,09*	4,28±0,17
Товста кишка, мкмоль/г тк.	3,02±0,09	3,24±0,12	4,46±0,14*	2,81±0,08
Активність каталази				
Еритроцити, мкмоль/хв×л	11,80±0,17	15,80±0,31*	17,90±0,59*	19,10±0,58*
Шлунок, нмоль/хв×г тк.	0,48±0,04	0,36±0,06	0,42±0,03	0,48±0,04
Тонка кишка, нмоль/хв×г тк.	0,35±0,01	0,33±0,03	0,43±0,04*	0,37±0,03
Товста кишка, нмоль/хв×г тк.	0,27±0,03	0,29±0,02	0,21±0,01*	0,28±0,03

Примітка. \* – достовірні зміни порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ ).

препаратів і не передають цю стійкість патогенним штамам бактерій. Потрапляючи в кишечник, компоненти лінексу виконують усі функції власної нормальної кишкової мікрофлори: знижуючи рН кишкового вмісту, створюють несприятливі умови для розмноження і життєдіяльності патогенних мікроорганізмів; беруть участь в синтезі вітамінів В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, РР, К, Е, С, фолієвої кислоти. Вони також створюють сприятливі умови для адсорбції заліза, кальцію, вітаміну Д в кишечнику. Молочнокислі мікроорганізми, що входять до складу препарату, колонізують тонку кишку і здійснюють ферментативне розщеплення білків, жирів, складних вуглеводів. Білки і вуглеводи, що не всмокталися в тонкій кишці, піддаються більш глибокому розщепленню в товстій кишці

анаеробами. Компоненти лінексу беруть участь в обміні жовчних кислот [8].

Отже, використання на фоні гіпотиреозу еубіотиків лінексу і біоспорину виявило їх позитивний вплив на стан тканин шлунково-кишкового тракту, особливо біоспорину.

**ВИСНОВКИ.** 1. Мерказоліловий гіпотиреоз викликає в тканинах шлунково-кишкового тракту зниження активності прооксидних систем та підвищення ступеня антиоксидного захисту.

2. Введення на фоні експериментального гіпотиреозу еубіотиків лінексу і біоспорину впродовж 14 днів призводить до нормалізації про- та антиоксидного захисту організму, особливо це виражено у біоспорину.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. А.с. 1722502, А1А61К 39/02, 35/74. Препарат біоспорин для профілактики і лікування желудочно-кишкових захворювань людини / В.В. Смирнов, С.Р. Резник, І.Б. Сорокулова и др. – Опубл. 30.03.92. – Бюл. № 12.
2. Городничева І.Е., Волков А.И. Гемостаз і ПОЛ при гіпотиреозі // Науч. вестн. Тюмен. мед. акад. – 2001. – № 1. – С. 138-140.
3. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб.

дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.

4. Мецишен І.Ф. Глутатионова система організму за умов норми та патології. – Чернівці: Мед-академія, 1999. – 26 с.

5. Мецишен І.Ф. Метод визначення окиснювальної модифікації білків плазми (сироватки) крові // Буковин. мед. вісник. – 1998. – 2, № 1. – С. 156-158.

6. Мецишен І.Ф., Петрова І.В. Окислення і відновлення глутатіону в органах крыс при введенні этонія // Укр. біохим. журн. – 1983. – 55,

№ 5. – С. 571-573.

7. Мещишен І.Ф., Польовий В.П. Механізм окиснювальної модифікації білків // Буковин. мед. вісник. – 1999. – 3, № 1. – С. 196-205.

8. Новый фармакотерапевтический подход к лечению и профилактике нарушенной биоценоза кишечника. Информация фирмы "Lek" (Словения) // Укр. мед. часопис. – 1998. – № 2 (4). – С. 30-32.

9. Паньків В.І. Захворювання щитоподібної залози. – Чернівці: БДМА, 2003. – 258 с.

10. Сорокулова И.Б. Сравнительное изучение биологических свойств биоспорина и других коммерческих препаратов на основе бацилл // Микробиол. журн. – 1997. – 59, № 6. – С. 43-49.

11. Стальная И.Д., Горишвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

12. Шостакович-Корецкая Л.Р., Кривуша Е.Л., Чергинец А.В. Тактический подход к коррекции дисбиоза кишечника у детей пробиотическими препаратами. Опыт применения препарата Линекс // Укр. мед. часопис. – 1999. – № 2 (10). – С. 61-64.

13. Isman C.A., Yebreve B.C., Alican I. Methimazole-induced hypothyroidism in rats ameliorates oxidative injury in experimental colitis // J. Endocrinol. – 2003. – 177, № 3. – P. 471-476.

## ВЛИЯНИЕ ЛИНЕКСА И БИОСПОРИНА НА ПРО- И АНТИОКСИДНОЕ СОСТОЯНИЕ КРОВИ И ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА КРЫС ПРИ ГИПОТИРЕОЗЕ

**А.А. Маковийчук, И.Ф. Мещишен**

БУКОВИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

### Резюме

*Исследовано влияние эубиотиков линекса и биоспорина на про- и антиоксидное состояние крови и тканей желудочно-кишечного тракта при мерказолиловом гипотиреозе. Показано, что экспериментальный гипотиреоз вызывает повышение уровня малонового диальдегида в эритроцитах и понижение активности прооксидных систем тканей желудочно-кишечного тракта. На этом фоне имеет место возрастание уровня показателей антиоксидной защиты (восстановленного глутатиона и активности каталазы). Введение на фоне экспериментального гипотиреоза линекса и биоспорина на протяжении 14 дней приводило к нормализации про- и антиоксидной защиты организма, которая особенно была выражена у биоспорина.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** мерказолиловый гипотиреоз, про- и антиоксидная защита, желудочно-кишечный тракт, линекс, биоспорин.

## LINEX AND BIOSPORIN INFLUENCE UPON THE PRO- AND ANTIOXIDANT BLOOD CONDITION AND GASTROINTESTINAL TRACT OF RATS AT HYPOTHYROIDISM

**A.A. Makoviychuk, I.F. Meschysheh**

BUCOVYNIAN STATE MEDICAL ACADEMY

### Summary

*The influence of eubiotics Linex and Biosporin upon the pro- and antioxidant blood condition and the tissues of the gastrointestinal tract under mercazolic hypothyroidism has been examined. It has been found that experimental hypothyroidism induces the rising of malonic aldehyde level in the erythrocytes and reduction of prooxidant activity of the gastrointestinal tissues. Against this background we can observe the increasing of antioxidant defense indices (reduced glutathione and catalase activity). Linex and Biosporin administration against a background of experimental hypothyroidism during 14 days has led to normalization of antioxidant defense of the organism, especially with Biosporin introduction.*

**KEY WORDS:** mercazolic hypothyroidism, pro- and antioxidant defense, gastrointestinal tract, Linex, Biosporin.

Отримано 19.11.2003 р.

Адреса для листування: А.А. Маковийчук, вул. Ентузіастів, 5, кв. 154, Чернівці, 58000, Україна.

## ВПЛИВ МАЛОЇ ДОЗИ АЦЕТАТУ СВИНЦЮ НА ЕКСПРЕСІЮ ГЛІАЛЬНОГО ФІБРИЛЯРНОГО КИСЛОГО БІЛКА В МОЗКУ ЩУРІВ У РАННІЙ ПОСТНАТАЛЬНИЙ ПЕРІОД

**А.О. Тихомиров, В.С. Недзвецький, Ж.О. Корякіна, П.О. Неруш<sup>1</sup>**  
ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ДНІПРОПЕТРОВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ<sup>1</sup>

*Досліджували вплив ацетату свинцю у концентрації 50 мг/л в питній воді на поліпептидний склад та вміст білка в гліальних проміжних філаментах мозку щурів в ранній постнатальний період (1-14 днів). Виявлено достовірне ( $p < 0,01$ ) підвищення експресії гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) у мозочку та великих півкулях на 14 день постембріонального розвитку. У головному мозку тварин, які перебували під дією ацетату свинцю, відзначається поява деградованих імунореактивних поліпептидів ГФКБ у діапазоні Mr 46-40 кДа. Одержані результати свідчать про розвиток астрогліальної реакції у відповідь на хронічний вплив ацетату свинцю в ембріональний період.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** гліальний фібрилярний кислий білок, ранній постнатальний період розвитку ЦНС, ацетат свинцю.

ВСТУП. Нейроепітеліальні компоненти нервової тканини характеризуються особливою різноманітністю унікальних білків цитоскелета, яким притаманні певна субклітинна локалізація та особливості експресії на різних етапах онтогенезу. Специфічними білками проміжних філаментів (ПФ) цитоскелета ЦНС є триплет білків нейрофіламентів у нейронах та гліальний фібрилярний кислий білок (ГФКБ) у гліальних клітинах [2]. Припускають, що саме вони зумовлюють специфіку функціонування цитоскелета нервової тканини в нормі та за умов впливу нейротоксичних чинників [9]. ГФКБ відіграє важливу роль у модуляції рухомості астроцитів та забезпечує структурну стабільність їх відростків [14]. Білок ПФ астроцитів бере участь у процесах астрогліозу, який індукується різними чинниками хімічної та фізичної природи, травматизацією ЦНС, а також метаболічними розладами [18]. Відповідь на пошкодження нервової тканини супроводжується інтенсивною проліферацією та гіпертрофією астроцитів, прискореним синтезом ГФКБ та реекспресією віментину, білка ПФ, що характерний лише для незрілих гліальних клітин [19]. Показано, що ці модифікації метаболізму та зміни білкового спектра відіграють фундаментальну роль в астрогліальній відповіді та зумовлюють

нейропротекторну і репаративну функції гліоцитів [12].

Нейрони найбільш чутливі до змін мікрооточення та гліально-нейрональної взаємодії в період ембріонального та раннього постнатального розвитку. Ця стадія онтогенезу ЦНС пов'язана з процесами міграції нейронів, дендрито- та аксоногенезом, встановленням синаптичних контактів. Встановлено ключову роль у цих подіях недиференційованих клітин астроглії [17]. Вплив нейротоксичних чинників на ранніх етапах розвитку ЦНС може викликати незворотні морфо-функціональні порушення процесів диференціації цих клітин [23]. Одними з найбільш небезпечних полютантів вважають сполуки свинцю, кількість яких у довкіллі невпинно зростає завдяки наявності широкого кола джерел антропогенного забруднення (викиди виробництв, вихлопи авто, спалювання вугілля тощо) [1]. Іони  $Pb^{2+}$  індукують руйнування елементів цитоскелета нейронів та накопичення фібрилярного матеріалу в перикаріоні. Припускають, що гальмування аксонального транспорту є однією з причин свинцевої нейродегенерації [25]. ПФ цитоскелета астроглії також залучаються до патологічних процесів, що супроводжують свинцеву інтоксикацію. Раніше при використанні змін експресії ГФКБ як маркера нейротоксичних ефектів обмежувалися головним чином до-

© А.О. Тихомиров, В.С. Недзвецький, Ж.О. Корякіна, П.О. Неруш, 2003.

слідженням мозку дорослих тварин [20]. Але існують дані, які вказують на зсуви строків диференціювання та дозрівання астроцитів і розвиток стану гліозу під час впливу низьких концентрацій солей свинцю [24]. Постійна присутність свинцю у повітрі, питній воді та продуктах харчування у кількостях, що наближаються до підпорогових, зумовлює необхідність дослідження молекулярних механізмів, які визначають особливості патологічного впливу низьких доз  $Pb^{2+}$  на ЦНС у період розвитку.

Метою даної роботи було вивчення змін поліпептидного складу гліальних ПФ та вмісту ГФКБ у мозку щурів за умов впливу ацетату свинцю протягом пренатального та раннього постнатального періодів розвитку.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Вагітних щурів-самиць лінії Wistar було рандомізовано поділено на дві групи. Тварини 1-ої групи (експериментальної) отримували з питною водою 50 мг/л ацетату свинцю з моменту запліднення та у період лактації, 2-ї групи (контрольної) – дистильовану питну воду. Народжених щурят обох груп декапітували на 1-й, 7-й та 14-й дні постнатального періоду (ПНД-1, ПНД-7 та ПНД-14 відповідно). Головний мозок щурят ПНД-7 та ПНД-14 розділяли на відділи (мозочок та великі півкулі), у тварин ПНД-1 для дослідження брали мозок *an mass*.

Тканину мозку гомогенізували у 50 мМ трис-НСІ буфері (рН-7,4), який містив 2 мМ ЕДТА, 1 мМ 2-меркаптоетанол, 0,1 мМ фенілметилсульфонілфторид та 10 мкг/мл соєового інгібітора трипсину. Всі маніпуляції проводили при температурі 4 °С. Гомогенат центрифугували при 30 000 г протягом 60 хв. Отриманий супернатант ( $S_1$ ) містив розчинні білки мозку. Осад промивали після його ресуспендування у тому ж буфері та центрифугування при 25 000 г протягом 45 хв. Після цього осад ресуспендували у трис-буфері, який додатково містив 4 мМ сечовину. Наступне центрифугування проводили при 30 000 г протягом 60 хв. Супернатант ( $S_2$ ) містив цитоскелетні філаментні білки. Вміст загального білка визначали за методом [6]. Білки фракцій  $S_1$  та  $S_2$  фракціювали за молекулярною масою електрофоретично у градієнті ПААГ (7-18 %) у присутності 0,1 % додецилсульфату натрію (ДСН). Поліпептидний склад гліальних філаментів та вміст ГФКБ визначили за допомогою імуноблотингу із застосуванням поліклональної моноспецифічної антисироватки у розведенні 1:1500, як описано раніше [4].

Кількісний аналіз ГФКБ проводили шляхом порівняння інтенсивностей забарвлення відповідних поліпептидних зон між експеримен-

тальними та контрольними пробами, віднесених до кількості загального білка у фракціях. Запропонований підхід при кількісному аналізі ГФКБ є більш адекватним та інформативним, ніж традиційні методи (імуноелектрофорез, імуноферментний аналіз). Слід зауважити, що інтенсивність імунозабарвлення при ІФА або площа піку преципітації при ІЕФ не завжди відповідає вмісту цього білка. Обмежений протеоліз інтактного поліпептиду з Мт 49 кДа може призводити до підвищення кількості епітопів ГФКБ [8]. Імуноблотинг ГФКБ після попереднього електрофоретичного розділення дає змогу оцінювати відносну кількість окремих поліпептидів, у тому числі деградованих, а не лише визначати ступінь його загальної імунореактивності.

Обробку одержаних даних проводили методами математичної статистики для малих виборок [3]. Відносний вміст ГФКБ виражали у вигляді середньої величини  $\pm$  стандартна похибка середньої величини, достовірну різницю між групами оцінювали із застосуванням t-критерію Стьюдента ( $p < 0,05$ ) після перевірки гіпотез про нормальність розподілення та різницю між генеральними дисперсіями.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Рівень і поліпептидний склад ГФКБ визначали у розчинній і цитоскелетній білкових фракціях. Результати імуноблотинга показали, що ацетат свинцю викликав збільшення вмісту білка в гліальних філаментах мозку щурят 1, 7 та 14-го днів після народження. Результати кількісного визначення ГФКБ представлено на рисунку 1. Найбільш виражені зміни експресії ГФКБ відбулися у мозку новонароджених щурів (ПНД-1) порівняно з контролем того ж віку. Існують дані, що пік експресії ГФКБ в нормі припадає на діапазон між 9 та 15 ПНД [13]. У ранній постембріональний період незрілі астроцити експресують ГФКБ у дуже обмежених кількостях, а їх проміжні філаменти складаються переважно з віментину [22]. Поява інтактного поліпептиду ГФКБ з Мт 49 кДа у сечовинній фракції свідчить про розвиток астрогліальної відповіді у незрілому головному мозку щурів. Визначені зміни концентрації ГФКБ відбуваються лише за рахунок синтезу *de novo* інтактного філаментного поліпептиду 49 з Мт кДа. У відповідних розчинних фракціях не виявлено достовірної різниці між вмістом розчинної форми білка в дослідних та контрольних тварин. Питання про функціональне значення розчинних поліпептидів ГФКБ залишається нез'ясованим. Уперше розчинну фракцію ГФКБ було отримано з нервової тканини людини та тварин *post mortem*, а її походження



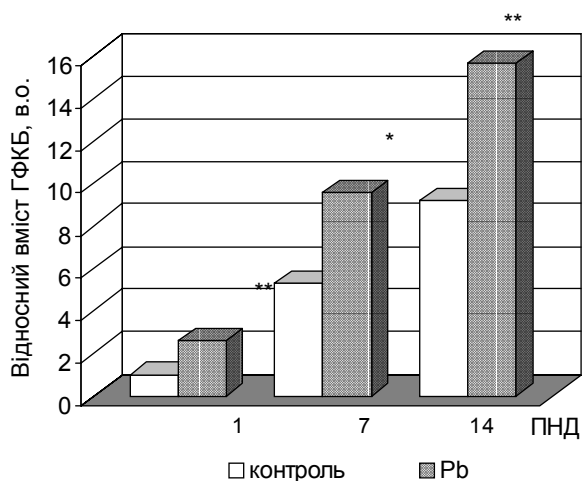


Рис. 1А. Відносний вміст ГФКБ в мозочку контрольної групи щурів і групи тварин за умов впливу ацетату свинцю на 1-й день (мозок *ap mass*) після народження (1), 7-й (7) і 14-й (14). Зміни достовірні: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

пов'язували з активацією  $Ca^{2+}$ -залежної нейтральної протеїнази [7]. Останнім часом доведено, що неполімеризовані розчинні субодиниці ГФКБ можуть з'являтися у мозку *in vivo*, а надзвичайна гетерогенність імунореактивних поліпептидів спостерігається при впливах, які асоційовані із  $Ca^{2+}$ -опосередкованими механізмами фосфорилування та протеолізу. Лімітований протеоліз білків, які складають філамент, може бути одним зі шляхів реконструкції фібрилярного апарату астроцитів [5].

Астроцитарна відповідь у зрілій ЦНС проявляється у вигляді збільшення вмісту ГФКБ на тлі чітко виражених змін поліпептидного складу гліальних філаментів. Результати імуноблотинга свідчать як про зростання вмісту, так і про зміни поліпептидного складу за умов впливу  $Pb^{2+}$  в ранній постнатальний період розвитку головного мозку (рис. 2). Підсилення експресії ГФКБ вказує на можливість фібрилогенезу, який притаманний гіпертрофованим астроцитам при пошкодженні, та/ або активної проліферації і дозрівання астроцитів. У роботі [11] показано, що вплив малих доз  $Pb^{2+}$  на ембріональний мозок не індукує гіпертрофію астрогліальних клітин, тому підвищення рівня ГФКБ пов'язане насамперед з останньою причиною.

Механізм набуття астроцитами чітких ознак диференційованих клітин, особливо на перших етапах постнатального розвитку, до кінця не з'ясовано. Збільшення кількості білка в астроцитарних проміжних філаментах може бути наслідком прискореної проліферації, диференціювання та дозрівання астроцитів у відповідь на свинцеву інтоксикацію. Більш виражені зміни експресії ГФКБ при інтоксикації продемонстровано на різних етапах постнатального періоду порівняно зі зрілим мозком. Значення та наслідки реактивного астроцитозу

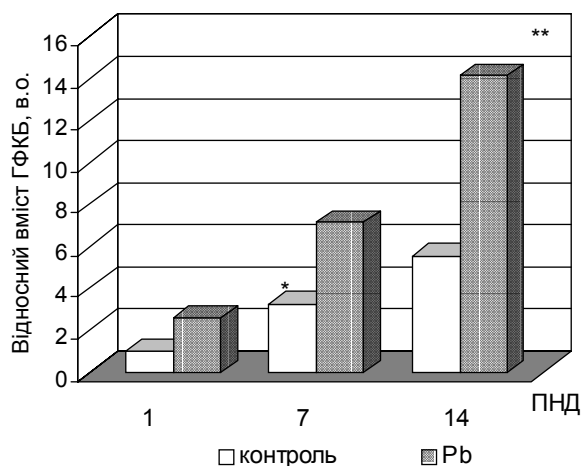


Рис. 1Б. Відносний вміст ГФКБ у півкулях контрольної групи щурів і групи тварин за умов впливу ацетату свинцю на 1-й день (мозок *ap mass*) після народження (1), 7-й (7) і 14-й (14). Зміни достовірні: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ .

і формування гліальних рубців залишаються актуальними питаннями, особливо для ЦНС в період раннього онтогенезу. Астроцити "нокаутуваних" за геном ГФКБ щурів втрачали здатність формувати клітинні відростки, коли співкультивувалися з нейронами [17]. Астрогліальні клітини щурів, "нокаутуваних" одночасно за генами ГФКБ та віментину, здатні формувати гліальний рубець після пошкодження тканини мозку, однак його щільність була недостатньою для підтримки цілісності гематоенцефалічного бар'єру. Ці дані свідчать про те, що ГФКБ та віментин необхідні для адекватної астроцитарної відповіді на пошкодження ЦНС. Хронічний вплив  $Pb^{2+}$  модулює експресію генів, зокрема сприяє підвищенню рівня м-РНК ГФКБ у гіпокампі, стріатумі й мозочку [21]. Експресія ГФКБ є також суттєвою умовою для нормальної архітектури білої речовини та цілісності гематоенцефалічного бар'єру [15]. Цілком імовірно, що передчасна проліферація астроцитів та прискорена експресія цитоскелетного білка, що викликаються ацетатом свинцю, спрямовані саме на реалізацію астроцитами своїх протекторних властивостей. Астроцити відомі як головні клітини-"акумулятори" свинцю в тканині мозку [16]. Існують дані, що  $Pb^{2+}$  має високу спорідненість з органічними лігандами та утворює комплексні сполуки з нуклеофільними групами білків [10].

Питання про те, яким чином розвиток гліозу та передчасне диференціювання астроцитів у ранній постнатальний період впливають на процеси дозрівання ЦНС, є дискусійним. Саме незрілі астроцити відіграють головну роль у нейрональній міграції та нейропатогенезі. Дослідження нейронального виживання та росту нейритів при спільному культивуванні нейронів та "нокаутуваних" за ГФКБ та віментину

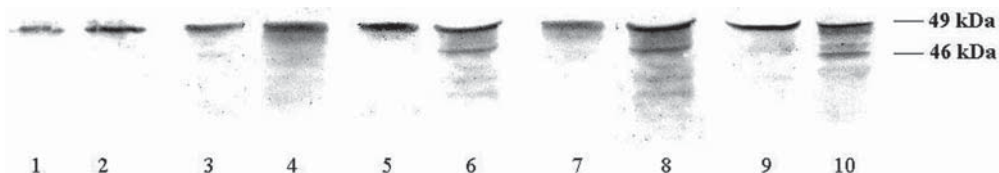


Рис. 2. Імуноблотинг сечовинних фракцій головного мозку експериментальних та контрольних щурят: 1 – мозок щурят цілком ПНД-1 за умов впливу ацетату свинцю; 2 – мозок щурят цілком ПНД-1 контрольної групи; 3 – мозочок щурят ПНД-7 за умов впливу ацетату свинцю; 4 – мозочок щурят ПНД-7 контрольної групи; 5 – великі півкулі щурят ПНД-7 за умов впливу ацетату свинцю; 6 – великі півкулі щурят ПНД-7 контрольної групи; 7 – мозочок щурят ПНД-14 за умов впливу ацетату свинцю; 8 – мозочок щурят ПНД-14 контрольної групи; 9 – великі півкулі щурят ПНД-14 за умов впливу ацетату свинцю; 10 – великі півкулі щурят ПНД-14 контрольної групи.

тином астроцитів дали позитивні результати. Мутантні астроцити, які проявляли основні риси незрілості, значною мірою сприяли виживанню нервових клітин, стимулювали нейритогенез та синаптогенез. Як показано у роботі [24], мікрогліоз та астроцитоз *in vitro* у спільній культурі незрілих нервових клітин та гліоцитів перешкоджають регенерації аксонів, зрілі астроцити припиняють синтез нейротрофічних факторів і специфічних молекул клітинної адгезії та екстрацелюлярного матриксу. Встановлено, що психофізіологічні характеристики значно порушуються у дорослих щурів, якщо

вплив  $Pb^{2+}$  припадав на ембріональний період та тривав до 16 ПНД. Вплив низьких доз  $Pb^{2+}$  до повного дозрівання головного мозку може викликати необоротні зсуви у нейронально-гліальній взаємодії та пластичності нервової системи в цілому [23].

**ВИСНОВОК.** Виявлене зростання вмісту ГФКБ і зміни поліпептидного складу свідчать про участь проміжних філаментів астроцитарного цитоскелета в астрогліальній відповіді, яка розвивається внаслідок нейротоксичної дії свинцю на ранніх етапах розвитку ЦНС.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Бандман А.Л., Гудзовский Л.С., Дубейковская Л.С. и др. Вредные химические вещества. Неорганические соединения элементов I-IV групп. – Л.: Химия, 1988. – 512 с.
2. Березин В.А., Шевченко Г.М. Нейроспецифические белки цитоскелета // Укр. биохим. журн. – 1987. – **59**, № 1. – С. 222-232.
3. Кокунин В.А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн. – 1975. – **47**, № 6. – С. 776-791.
4. Недзвецкий В.С., Березин В.А., Оберняк Т.И., Жмарева Е.А. Характеристика специфических белков промежуточных филаментов в опухолях головного мозга человека // Биохимия. – 1986. – **51**, № 11. – С. 1843-1850.
5. Недзвецкий В.С., Бусыгина С.Г., Березин В.А., Дворецкий А.И. ЦНС-синдром. Характеристика промежуточных филаментов головного мозга крысы // Радиобиол. – 1990. – **30**, № 2. – С. 243-246.
6. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248-254.
7. De Armond S.J., Fajardo M., Naughton S.A., Eng L.F. Degradation of glial fibrillary acidic protein by a calcium dependent proteinase: an electroblot study // Brain Res. – 1983. – **262**. – P. 275-282.
8. Eng L.F., D'Amelio F.E., Smith M.E. Dissociation of GFAP intermediate filaments in EAE: Observations in the lumbar spinal cord // Glia. – 1989. – **2**. – P. 308-317.
9. Fuchs E., Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function and disease // Ann. Rev. Biochem. – 1994. – **63**. – P. 345-382.
10. Goering P.L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity // Neurotoxicol. – 1993. – **14**, № 2. – P. 45-60.
11. Harry G.J., Schmitt T.J., Gong Z., et. al. Lead-induced alterations of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the developing rat brain // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 1996. – **139**. – P. 84-93.
12. Janzer R.C., Raff M.C. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells // Nature. – 1987. – **325**. – P. 253-257.
13. Laundry C.F., Ivo G.O., Broun I.R. Developmental expression of glial fibrillary acidic protein in the rat brain analysed by *in situ* hybridization // J. Neurosci. Res. – 1990. – **25**. – P. 149-203.
14. Lepekhn E.A., Eliasson C., Berthold C.H. et al. Intermediate filaments regulate astrocyte motility // J. Neurochem. – 2001. – **79**. – P. 617-625.
15. Liedtke W., Edelmann W., Bieri P.L., et. al. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination // Neuron. – 1996. – **17**. – P. 607-615.
16. Lindahl L.S., Bird L., Legare M.E. et al. Differential ability of astroglia and neuronal cells to accumulate lead: dependence on cell type and on degree of differentiation // Toxicol. Sci. – 1999. – **50**, № 2. – P. 236-243.
17. Menet V., Gimenez y Ribotta M., Chauvet N. et al. Inactivation of the glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression // J. Neurosci. – 2001. – **21**. – P. 6147-6158.

18. Norenberg M.D. Reactive astrocytosis // In: Ascher M., Kimelberg H.K. The Role of Glia in Neurotoxicity / Boca Raton CRC Press. – N.Y., 1996. – P. 93-107.
19. Norton W.T., Aquino D.A., Hozumi I. et al. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review // Neurochem. Res. – 1992. – **17**. – P. 877-885.
20. O'Callaghan J.P. Neurotypic and gliotypic proteins as biochemical markers of neurotoxicity // Neurotoxicol. Teratol. – 1988. – **10**. – P. 445-452.
21. Partl S., Herbst H., Schaeper F. et al. GFAP gene expression is altered in young rats following developmental low level lead exposure // Neurotoxicol. – 1998. – **19**. – P. 547-551.
22. Sancho Tello M., Valles S., Montoliu C. et al. Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures // Glia. – 1995. – **15**, № 2. – P. 156-166.
23. Stoltenburg-Didinger G., Punder I., Peters B. et al. Glial fibrillary acidic protein and RNA expression in adult rat hippocampus following low-level lead exposure during development // Histochem. Cell Biol. – 1996. – **105**. – P. 431-442.
24. Yokoyama K., Araki S. Assessment of slow axonal transport in lead-exposed rats // Environ. Res. – 1992. – **59**. – P. 440-446.
25. Zurich M.G., Eskes C., Honegger P. et al. Maturation-dependent neurotoxicity of lead acetate in vitro: implication of glial reactions // J. Neurosci. – 2002. – **70**. – P. 108-116.

## ВЛИЯНИЕ МАЛОЙ ДОЗЫ АЦЕТАТА СВИНЦА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЛИАЛЬНОГО ФИБРИЛЛЯРНОГО КИСЛОГО БЕЛКА В МОЗГУ КРЫС В РАННИЙ ПОСТНАТАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

А.А. Тихомиров, В.С. Недзвецкий, Ж.А. Корякина, П.А. Неруш<sup>1</sup>  
ДНЕПРОПЕТРОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ДНЕПРОПЕТРОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ<sup>1</sup>

### Резюме

Исследовали влияние ацетата свинца (50 мг/л) в питьевой воде на полипептидный состав и содержание белка в глиальных промежуточных филаментах мозга крыс в ранний постнатальный период (1-14 дней). Установлено достоверное ( $p < 0,01$ ) повышение экспрессии глиального фибриллярного кислого белка (ГФКБ) в мозжечке и больших полушариях на 14-й день постэмбрионального развития. В головном мозге животных, находившихся под воздействием ацетата свинца, отмечается появление деградированных иммунореактивных полипептидов ГФКБ в диапазоне Mr 46-40 кДа. Полученные результаты свидетельствуют о развитии астроглиальной реакции в ответ на хроническое влияние ацетата свинца в эмбриональный период.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глиальный фибриллярный кислый белок, ранний постнатальный период развития ЦНС, ацетат свинца.

## RAT BRAIN GLIAL FIBRILLARY ACIDIC PROTEIN EXPRESSION IN THE EARLY POSTNATAL PERIOD FOLLOWING LOW-LEVEL LEAD ACETATE EXPOSURE

A.O. Tykhomyrov, V.S. Nedzvetsky, Zh.O. Koryakina, P.O. Nerush<sup>1</sup>  
DNIPROPETROVSK NATIONAL UNIVERSITY  
DNIPROPETROVSK STATE MEDICAL ACADEMY<sup>1</sup>

### Summary

Lead acetate influence (in concentration 50 mg/l) in drinking water on polypeptide composition and content of the glial intermediate filament protein in the early postnatal period (1-14 days) was investigated. Sufficient elevation ( $h < 0,01$ ) of glial fibrillary acidic protein (GFAP) level was shown in cerebellum and hemispheres on the 14-th postnatal day. Immunoreactive products of GFAP degradation in the range of Mr 46-40 kDa were found in lead-exposed rat brain. Results obtained testify to activation of astroglial response on the chronic lead acetate influence during embryonic period.

KEY WORDS: glial fibrillary acidic protein, early postnatal development of CNS, lead acetate.

Отримано 12.06.2003 р.

Адреса для листування: А.О. Тихомиров, кафедра біофізики та біохімії біолого-екологічного факультету, Дніпропетровський національний університет, пров. Науковий, 13, Дніпропетровськ, 49050, Україна.

## ОСОБЛИВОСТІ МЕТАБОЛІЧНОГО СТАТУСУ ХВОРИХ ІЗ СИНДРОМОМ "HIP-SPINE"

**І.А. Зупанець, Ф.С. Леонтьєва, В.О. Туляков, О.П. Тимошенко, О.М. Хвисьюк**  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ  
ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ ХРЕБТА ТА СУГЛОБІВ ІМ. М.І. СИТЕНКА АМН УКРАЇНИ, ХАРКІВ

У статті наведено відомості про зміни метаболічного статусу хворих з синдромом "hip-spine". На основі оцінки результатів біохімічного обстеження 95-ти пацієнтів із синдромом "hip-spine" відзначено, що показники обміну в сполучній тканині цих хворих мають суттєві відмінності в залежності від початкової ланки патологічного процесу.

Виділено найінформативніші для діагностики та прогнозування показники:

1. Прямий синдром "hip-spine" з первинною локалізацією біохімічних змін у тканинах хребта характеризується незначними проявами запального процесу при суттєвій зміні маркерів дистрофії сполучної тканини, особливо хряща.

2. Зворотний синдром "hip-spine" – аналогічними якісними, але більш вираженими у кількісному відношенні змінами біохімічного спектра сироватки крові й сечі хворих. Зазначений спектр змін свідчить про наявність значних осередків деструкції тканин опорно-рухового апарату.

3. Змішаний варіант синдрому "hip-spine" – наявністю більш вираженої запальної реакції, ніж в інших групах, при менш активному прояві маркерів деструкції сполучної тканини, що свідчить про переважання реактивного процесу над деструктивними змінами. У групі, що розглядається, виявлено відхилення від норми за величиною рівня холестерину і  $\beta$ -ліпопротеїнів, що вказує на посилення процесів перекисного окиснення ліпідів і поступовий розвиток атеросклеротичних змін. Відзначено ознаки активізації перебігу остеопорозного процесу, реактивної артропатії та вікової перебудови опорних тканин суглобів і хребта.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** синдром "hip-spine", біохімія, метаболізм, показники, діагностика.

ВСТУП. Синдром "hip-spine" ("стегно-хребет") являє собою порівняно нову нозологічну одиницю, однак, захворювання, пов'язані з ним, усе частіше діагностують разом або окремо [18].

Комплекс взаємно зумовлених деструктивно-дистрофічних процесів в тканинах тазостегнового суглоба і хребта, названий синдромом "hip-spine", розвивається на фоні спектра визначених структурно-метаболічних порушень, які супроводжуються характерними кількісними змінами біохімічних показників у рідких біологічних середовищах організму – сироватці крові й сечі.

Основу захворювань, що проявляються у вигляді синдрому "hip-spine", становлять ті чи інші порушення обміну сполучної тканини, найчастіше дистрофічно-деструктивного або запального генезу, або ті, що є реакцією на

специфічні інфекційні процеси, наприклад хвороба Рейтера.

Незважаючи на доволі схожі клінічні прояви синдрому "hip-spine" (біль та порушення локомоторної функції поперекових сегментів хребта і тазостегнових суглобів), у кожній окремій людини патологічний процес має індивідуальні особливості. Так, захворювання може брати свій початок з ураження тазостегнових суглобів [11, 19]. Переважно зниження функції суглобів хворі компенсують за рахунок рухів суглоба. Ці обставини створюють сприятливі умови для формування патологічної рухомості поперекового відділу хребта, найчастіше сегментів L4-L5, L5-S1 пізніше – спондилостезу на місці зазначених міжхребцевих дисків. При цьому в синовії первантажених суглобів збільшується активність матриксних металопротеаз, які виходять із зруйнованих клітин хряща, що призводить до каскадного прискорення деструктивного процесу [6, 17, 20].

© І.А. Зупанець, Ф.С. Леонтьєва, В.О. Туляков, О.П. Тимошенко, О.М. Хвисьюк, 2003.

В іншому етіологічному варіанті прояв синдрому "hip-spine" починається з ушкодження саме хребта. При цьому зниження рухомості поперекових сегментів змушує хворого більше навантажувати тазостегнові суглоби і швидше зношувати їх. Таким чином, спроби компенсувати недостатність одного відділу опорно-рухового апарату за рахунок іншого призводять до розвитку дегенеративно-дистрофічних процесів у суміжних з ними ділянках.

Окремо слід розглянути реактивні артрити, що внаслідок впливу, наприклад хламідійної чи уреаплазмової інфекції, викликають порушення одночасно в тазостегнових суглобах і хребті. Лікування хворих зазначених груп має істотні особливості. Тому для ефективного проведення лікувальних заходів необхідно чітко диференціювати джерело процесу, що призводить до розглянутої поєднаної патології.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** У період виконання даної роботи було проведено дослідження біохімічних показників сироватки крові і добової сечі 95-ти хворих з синдромом "hip-spine", які лікувалися в клініці патології великих суглобів Інституту патології хребта і суглобів ім. проф. М.І. Ситенка АМН України. При цьому виділено такі групи пацієнтів:

1. Прямий синдром "hip-spine", перші прояви якого зумовлені патологічними змінами, локалізованими в тканинах хребетних сегментів.

2. Зворотний синдром "hip-spine", при якому первинні прояви були локалізовані в тканинах тазостегнового суглоба.

3. Змішаний синдром "hip-spine", що включає в себе усі варіанти патології з проявами ушкоджень як суглобів, так і хребта, випадки дисплазії, реактивний артрит, генералізований остеопороз тощо.

Добір методик для біохімічного обстеження проводили таким чином, щоб визначити основні групи метаболітів сполучної тканини. При цьому визначали вуглеводно-білкові комплекси: глікопротеїни (за методом О.П. Штейнберга і Я.Н. Доценко [10]), сіалові кислоти (за Гессом [10]), фракційний склад глікозаміноглікансульфатів (ГАГС) [1], загальних хондроїтинсульфатів (за методом Ю.Ю. Лапса, Л.І. Слуцького [7]), ензиматичні маркери обміну в сполучній тканині зокрема активність кислоти і лужної фосфатази (за методом Боданського [3]), а також кісткового ізоферменту останньої [2]. З метою одержання уявлення про рівень обміну макромолекулярних компонентів матриксу кісткової і хрящової тканин у комплекс обстеження

хворих із синдромом "hip-spine" було введено визначення екскреції із сечею глікозаміногліканів (ГАГ) за N. Di Ferrante, C. Rich [12] і оксипроліну за А.А. Крель, Л.Н. Фурцевою [4, 9].

Крім того, було проведено визначення показників для оцінки соматичного статусу, наявності і вираження запальних реакцій у пацієнтів з синдромом "hip-spine". З цією метою досліджували вміст загального білка біуретовим методом, протеїнограми з поділом фракцій білка методом електрофорезу на папері, рівень холестерину за методом Ілька,  $\beta$ -ліпопротеїнів за методом Бурштейна і Самай [3], кальцію методом титрування з флюорексоном за методом Моїзіс і Зак [8]. Застосовані методи є уніфікованими, за винятком методів визначення хондроїтинсульфатів і фракційного складу ГАГС у сироватці крові, а також екскреції ГАГ і оксипроліну із сечею [5].

Отримані результати було статистично оброблено за методом Фішера-Стюдента з використанням t-критерію Стюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Дані біохімічного обстеження хворих з синдромом "hip-spine" узагальнені в таблиці 1.

Аналіз результатів досліджень свідчить про те, що між групами пацієнтів з різними варіантами цього синдрому існують достовірні ( $p < 0,05$ ) відмінності у вмісті метаболітів і активності досліджених ферментів залежно від того, в якому місці переважно виявлялися первинні вогнища деструкції і дистрофії тканин опорно-рухового апарату.

Вміст загального білка був однаковим у хворих усіх трьох груп, однак у протеїнограмі пацієнтів зі змішаним типом синдрому "hip-spine" рівень  $\alpha_1$ -фракції глобулінів був вищим, ніж у двох інших групах. Очевидно, це пов'язано з тим, що саме в цю групу входили пацієнти, в яких спостерігалися явища запалення, реактивної перебудови у формі артропатії, можливо, мікропереломів внаслідок розвитку генералізованого остеопорозу. Імовірно, це було наслідком залучення в процес як сегментів хребетного стовпа, так і суглобів.

При зворотному синдромі "hip-spine" в половині хворих вміст  $\alpha_1$ -глобулінів був більшим верхньої межі норми, а при прямому синдромі "hip-spine" – тільки в 31 % із загальної кількості пацієнтів з первинними змінами в тканинах хребетних сегментів. Рівень  $\alpha_2$ -фракції глобулінів також був вищим у хворих із змішаним варіантом синдрому "hip-spine" ( $p < 0,05$ ); в інших двох проаналізованих групах у більшості пацієнтів показник перевищував верхні межі

фізіологічної норми в 50-75 % від загальної кількості хворих. Інші фракції глобулінів у протеїнограмі ( $\beta$  і  $\gamma$ ) були на однаковому рівні.

Як встановлено багатьма дослідниками, концентрація компонентів сироватки крові, що містять вуглеводи та віддзеркалюють обмін органічного позаклітинного матриксу кісткової і хрящової тканин, при дистрофічно-деструктивних ушкодженнях збільшується [13, 14]. Це стосується і нейтральних глікопротеїнів і протеогліканових субодиниць матриксу. Якщо в групах пацієнтів із незмішаним типом синдрому "hip-spine" вміст сіалових кислот був на рівні верхніх значень норми, то при змішаній формі патології даний показник значно підвищувався і складав ( $2,82 \pm 0,11$ ) ммоль/л (норма –  $2,00-2,30$  ммоль/л). Концентрація глікопротеїнів у сироватці крові зростала у всіх хворих, незалежно від варіанта прояву синдрому "hip-spine", однак найбільшу величину виявлено в групі пацієнтів зі змішаною формою захворювання, тобто у тих випадках, коли патологічні зміни було виявлені в тканинах тазостегнового суглоба і хребта одночасно.

Проте рівень хондроїтинсульфатів, що підвищується більшою мірою при деструктивних змінах у кістковій і хрящовій тканинах [15], зріс у 2,2 раза порівняно з верхньою межею норми при зворотному синдромі "hip-spine", тобто, коли патологічний процес первинно маніфестував у голівці стегнової кістки. Як відомо, концентрація хондроїтинсульфатів у синовіальній рідині має тісну кореляцію з їх концентрацією в сироватці крові. Тому зазначені зміни можна віднести і до синовіальної рідини обстежених хворих. Даний рівень розглянутого показника характерний для вираженого остеоартрозу [16].

При прямому синдромі "hip-spine" і змішаному типі патології рівень хондроїтинсульфатів зростав у 1,7 і 1,3 раза порівняно з верхньою межею норми.

Розподіл ГАГС сироватки крові на три фракції з їх подальшим аналізом дозволив підтвердити описані раніше результати. Так, при зворотному синдромі "hip-spine", аналогічно підвищенню рівня загальних хондроїтинсульфатів, збільшувався вміст ГАГС у всіх групах, причому це було особливо виражено при зворотному синдромі "hip-spine". Дане збільшення відбувалося за рахунок I і III фракцій, у яких переважали, відповідно, хондроїтин-6-сульфат і інші фракції, за винятком хондроїтин-4-сульфату, а саме: кератансульфат, гепарансульфат, гепарин і дерматансульфат.

Описане явище спостерігалось при інтенсивному руйнуванні протеогліканів суглобного

хряща, коли продукти деградації хрящової тканини надходять у кровеносне русло, що супроводжується збільшенням вмісту деяких фракцій ГАГС у сироватці крові й у сечі.

Дійсно, у групі хворих зі зворотною формою синдрому "hip-spine" відбувалася гіперекскреція ГАГ із сечею, що узгоджується з гіперглікозгліканемією.

Активність ферментів, що відображають інтенсивність біосинтезу в остеобластах (лужна фосфатаза) та процес деградації елементів кістки і хряща (кисла фосфатаза), була незначно збільшеною, особливо останньої. Активність лужної фосфатази достовірно підвищувалась у частини пацієнтів з синдромом "hip-spine" змішаного типу, очевидно, за рахунок загоєння мікропереломів, що супроводжують зазначений тип ушкоджень. Проте активність кісткового ізоферменту істотно не відрізнялася в різних групах обстежених хворих.

Активність кислої фосфатази була більшою від нормальної величини при зворотному і змішаному типах синдрому "hip-spine", що корелювало з вищим рівнем активності лужної фосфатази. Даний вид порушення метаболізму має місце при виражених явищах альтерації і відповідає перерахованим вище фактам і даним.

Ще одним підтвердженням висловленої гіпотези є і те, що в групі пацієнтів зі змішаним типом синдрому "hip-spine" більшою мірою, ніж у двох інших, зростала екскреція оксипроліну, що підтверджує наявність вираженого процесу катаболічної спрямованості в суглобах і хребті обстежених хворих.

**ВИСНОВКИ.** Таким чином, використання біохімічних методів при обстеженні хворих з різними варіантами синдрому "hip-spine" дало можливість охарактеризувати різні групи пацієнтів за типом метаболічних порушень структури кісткової і хрящової тканин. При цьому виявилось, що кожен варіант має строго визначену біохімічну характеристику:

1. Прямий синдром "hip-spine" з первинною локалізацією біохімічних змін у тканинах хребта характеризується збільшенням рівня  $\alpha_2$ -фракції глобулінів у сироватці крові, незначним підвищенням концентрації глікопротеїнів, а також істотним зростанням концентрації хондроїтинсульфатів (у 1,6-1,7 раза стосовно верхньої межі норми). Спостерігалось незначне збільшення вмісту в сироватці крові фракції хондроїтин-6-сульфатів, активності кислої фосфатази, екскреції ГАГ і оксипроліну із сечею.

2. Зворотний синдром "hip-spine" – подібними якісними, але більш вираженими в

Таблиця 1 – Біохімічні показники сироватки крові и сечі хворих із синдромом "hip-spine"

Показники	Одиниці вимірювання	Групи хворих			Показники контрольної групи (M±m)	Межі норми
		Справжній "hip-spine" (M+m)	Зворотний "hip-spine" (M+m)	Змішаний "hip-spine" (M+m)		
1	2	3	4	5	6	7
Показники сироватки крові						
Загальний білок	г/л	76,4±8,4	74,2±6,1	78,6±5,4	5,10±0,05	65,0-85,0
Кальцій	ммоль/л	2,50±0,09	2,40±0,08	2,40±0,05	2,51±0,04	2,20-2,70
Сіалові кислоти	ммоль/л	2,07±0,18	2,28±0,34	2,82±0,11*	2,00±0,03	2,00-2,30
Глікопротеїни	од.	0,500±0,030	0,560±0,020	0,620±0,020*	0,425±0,005	0,25-0,45
Хондроїтинсульфати	г/л	0,168±0,021	0,224±0,020*	0,134±0,008	0,076±0,004	0,000-0,100
Фракції білка:						
Альбуміни	%	52,6±5,4	51,8±6,9	52,2±4,0	58,40±1,14	52,0-62,0
Глобуліни α <sub>1</sub>	%	6,83±0,45	7,34±0,51	8,29±0,21*	5,32±0,15	4,00-7,00
Глобуліни α <sub>2</sub>	%	9,40±0,82	8,48±0,72	9,96±0,36*	7,92±0,10	7,00-9,00
Глобуліни β	%	14,00±1,36	13,76±1,62	12,91±1,32	12,40±0,19	9,00-14,00
Глобуліни γ	%	17,96±1,84	17,27±2,14	16,69±0,89	15,75±0,27	14,00-19,00
Холестерин	ммоль/л	6,8±0,8	6,1±0,5	7,5±0,3*	4,97±0,20	3,6-6,3
β-ліпопротеїни	од.	5,2±0,3	54,0±3,8	69,0±2,6*	42,12±1,74	35,0-55,0
Фракції глікозаміно-глікансульфатів:						
Загальні						
I фракція	од.	7,10±0,90	8,90±0,70	6,60±0,80	5,85±0,47	5,4-6,3
II фракція	од.	3,40±0,40	4,50±0,40	3,80±0,50	3,90±0,43	3,5-4,1
III фракція	од.	2,20±0,20	2,90±0,10	2,00±0,10	2,80±0,29	2,5-3,1
Активність лужної фосфатази	ммоль/л год	1,12±0,16	1,52±0,26	1,10±0,10	1,04±0,01	0,50-1,30
Кістковий ізофермент лужної фосфатази	%	72,0±0,2	75,0±0,5	78,0±0,4	71,0±8,0	60,0-80,0
Активність кислої фосфатази	ммоль/л год	0,72±0,13	0,91±0,08	0,83±0,05	0,26±0,03	0,2-0,6
Глікозаміноглікани	мг/добу	5,8±0,6	6,9±0,4	4,8±0,5	4,50±1,00	3,3-3,5
Оксипролін	мг/добу	5,8±0,6	6,9±0,4	4,8±0,5	25,00±1,40	11,0-39,0

Примітка. \* – різниця з показниками контрольної групи достовірна.

кількісному відношенні змінами біохімічного спектра сироватки крові й сечі хворих. Так, при даному типі синдрому мало місце зростання концентрації α<sub>1</sub>-фракції глобулінів, що свідчить про більш гострий перебіг запального процесу в організмі. Відзначалося значне підвищення в сироватці крові рівня глікопротеїнів і, особливо, хондроїтинсульфатів (у 2,2 раза стосовно верхньої межі норми) за рахунок I і III фракцій ГАГС. При цьому спостерігалось одночасне зростання активності лужної і кислої фосфатази, а також виведення із сечею оксипроліну і ГАГ (останні – значно більше, ніж в інших аналізованих групах). Даний спектр змін свідчить про наявність значних осередків деструкції тканин опорно-рухового апарата.

3. Змішаний варіант синдрому "hip-spine" проявляється вираженою запальною реакцією (більше, ніж в інших групах, зростання вмісту в сироватці крові α<sub>1</sub>- і α<sub>2</sub>-фракцій

глобулінів у протеїнограмі, концентрації сіалових кислот вище норми, чого не було в інших групах, а також глікопротеїнів. Однак вміст хондроїтинсульфатів у сироватці крові хворих даної групи зростав незначно, що свідчить про перевагу реактивного процесу над деструктивними змінами. У розглянутій групі виявлено відхилення від норми за величиною вмісту холестерину і β-ліпопротеїнів, що вказує на посилення процесів перекисного окиснення ліпідів і поступовий розвиток атеросклеротичних змін.

Разом із тим, фракційний склад ГАГС і рівень екскреції ГАГ із сечею в пацієнтів даної групи істотно не порушувалися, що корелює з вмістом хондроїтинсульфатів у сироватці крові. Однак збільшення активності лужної і кислої фосфатази та екскреції оксипроліну із сечею може бути доказом перебігу остеопоротичного процесу, реактивної артропатії і вікової перебудови опорних тканин суглобів і хребта.

## ЛІТЕРАТУРА

1. А.с. ССР № 960626. Способ определения гликозаминогликансульфатов в сыворотке крови / М.Р. Штерн, О.П. Тимошенко, Ф.С. Леонтьева, Г.Ф. Ключева Г.Ф. – 1982.
2. Власов Б.Я., Войтович Т.Г. К методике определения активности костного изофермента щелочной фосфатазы в сыворотке крови // Реабилитация и инвалидность от травм: Научные труды. – Иркутск, 1979. – Вып. 147. – С. 96-97.
3. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. – Минск: Беларусь, 1982. – 366 с.
4. Крель А.А., Фурцева Л.Н. Методы определения оксипролина в биологических жидкостях и их применение в клинической практике // Вопр. мед. хим. – 1968. – **14**, вып. 6. – С. 635.
5. Об унификации клинических лабораторных методов исследования: Приказ МЗ СССР № 290. – М., 1972. – 207 с.
6. Остеоартроз. Консервативна терапія / За ред. М.О. Коржа, Н.В. Дедух, І.А. Зупанця. – Х.: Прапор, 1999. – 336 с.
7. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. – Рига: Медицина, 1968. – 427 с.
8. Тодоров И. Комплексонометрическое определение кальция в сыворотке крови по методу Моизиса и Зака // Клинические лабораторные исследования в педиатрии. – София: Медицина и физкультура, 1968. – 666 с.
9. Френкель Л.А., Ланько А.И. Модификация микрометода определения сиаловых кислот в биологических тканях // Рационализаторские предложения и изобретения в медицине. – К.: Здоров'я, 1978. – 369 с.
10. Штейнберг С.Я., Доценко Я.Н. Новый метод определения гликопротеидов в сыворотке и плазме крови // Врач. Дело. – 1962. – № 12. – С.43-45.
11. Arden N.K., Nevitt M.C., Williams E. et al. The incidence of radiographic hip osteoarthritis in elderly white women // XIV European League Against Rheumatism Congress. Speakers Theses. – Glasgow, 1999. – P. 258.
12. Di Ferrante N., Rich C. The Determination of Acid Aminopolysaccharides in Urine // J. Lab. – 1956. – **48**, № 3. – P. 491-494.
13. Petersson J.F., Borgard T., Svensson B., Saxne T. Changes in cartilage and bone metabolism identified by serum markers in early arthritis of the knee joints // Br. J. Rheumatol. – 1998. – **37**. – P. 46-50.
14. Poole A.R. Early changes in cartilage matrix turnover in osteoarthritis // XIV European League Against Rheumatism Congress. Speakers Theses. – Glasgow, 1999. – P. 9.
15. Roos H., Dahlberg L., Hoerrner L.A. et al. Markers of cartilage matrix metabolism in human joint fluid and serum: the effect of exercise // Osteoarthritis Cartilage. – 1995. – **3**, № 1. – P. 7-14.
16. Saamamen A.M., Kiviranta I., Jurvelin J. et al. Proteoglycan and collagen alterations in canine knee articular cartilage following 20 km daily running exercise for 15 weeks // Connect. Tissue Res. – 1994. – **30**, № 3. – P. 191-201.
17. Van den Hoogen B.M., van de Lest C.H., van Weeren P.R. et al. Loading-induced changes in synovial fluid affect cartilage metabolism // Br. J. Rheumatol. – 1998. – **37**, № 6. – P. 671-676.
18. Vignon E., Balblanc J.C., Mathieu P. et al. Metalloprotease activity, phospholipase A2 activity and cytokine concentration in osteoarthritis synovial fluids // Osteoarthritis Cartilage. – 1993. – **1**, № 2. – P. 115-120.
19. Williams M. Frankel S. A population study of arthritis of the hip and knee // J. Bone Jt. Surg. – 1995. – **77-B**, № 2. – P. 141.
20. Williams J., Katz R., Childs D. et al. Keratan sulfate content in the superficial and deep layers of osteoarthritic and nonfibrillated human articular cartilage in osteoarthritis // Calcified Tissue International. – 1988. – **42**. – P. 162-166.

## ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СТАТУСА БОЛЬНЫХ С СИНДРОМОМ "HIP-SPINE"

**И.А. Зупанец, Ф.С. Леонтьева, В.А. Туляков, О.П. Тимошенко, А.Н. Хвисьюк**

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ  
ИНСТИТУТ ПАТОЛОГИИ ПОЗВОНОЧНИКА И СУСТАВОВ ИМ. М.И. СИТЕНКО АМН УКРАИНЫ, ХАРЬКОВ

### Резюме

В статье приведены сведения об изменении метаболического статуса больных синдромом "hip-spine". На основании оценки результатов биохимического обследования 95-ти пациентов с синдромом "hip-spine" отмечено, что показатели обмена в соединительной ткани этих больных имеют существенные отличия в зависимости от начального звена патологического процесса.

Выделены наиболее информативные для диагностики и клинического прогноза показатели:



1. Прямой синдром "hip-spine" с первичной локализацией биохимических изменений в тканях позвоночника характеризуется незначительными проявлениями воспалительного процесса при существенном изменении маркеров дистрофии соединительной ткани, в особенности хряща.

2. Обратный синдром "hip-spine" – аналогичными качественными, но более выраженными в количественном отношении изменениями биохимического спектра сыворотки крови и мочи больных. Данный спектр изменений свидетельствует о наличии значительных очагов деструкции тканей опорно-двигательного аппарата.

3. Смешанный вариант синдрома "hip-spine" – наличием более выраженной воспалительной реакции, чем в других группах, при менее активном проявлении маркеров деструкции соединительной ткани, что свидетельствует о преобладании реактивного процесса над деструктивными изменениями. В рассматриваемой группе выявлены отклонения от нормы по величине уровня холестерина и  $\beta$ -липопротеидов, что указывает на усиление процессов перекисного окисления липидов и постепенное развитие атеросклеротических изменений. Отмечены признаки активизации протекания остеопоротического процесса, реактивной артропатии и возрастной перестройки опорных тканей суставов и позвоночника.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** синдром "hip-spine", биохимия, метаболизм, показатели, диагностика.

## THE METABOLIC STATUS FEATURES OF PATIENTS WITH "HIP-SPINE" SYNDROME

I.A. Zupanets, F.S. Leontjeva, V.O. Tuliakov O.P. Tymoshenko, O.M. Khvysjuk  
NATIONAL PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, KHARKIV  
INSTITUTE OF SPINE AND JOINTS PATHOLOGY BY M.I. SYTENKO OF UKRAINIAN ACADEMY  
OF MEDICAL SCIENCES, KHARKIV

### Summary

The information about the metabolic status changes of patients with the syndrome "hip-spine" are presented in the article. In the article there is shown that connective tissue metabolism parameters of patients with "hip-spin" syndrome have great differences depending on the beginning link of pathological process.

The most informative parameters for diagnostic and prognosis are accented:

1. The true hip-spine syndrome with primary localization of biochemical changes in spine tissues is characterized by the insignificant inflammatory process manifestation and the great changes of connective tissue and especially dystrophy markers.

2. The reverse hip-spine syndrome is characterized by analogical qualitative but more expressed quantitative changes of patients blood serum and urine biochemical spectrum. This spectrum is indicative for presence of great focuses of locomotion apparatus tissues destruction.

3. The mixed variant of hip-spine syndrome is characterized by the presence of more pronounced inflammatory reaction than in other groups, with less active manifestation of connective destruction markers, which testifies about the prevalence of the reactive process on the destructive changes. In this group the deviations from norm for the cholesterol and b-lipoproteins level were revealed, which is indicative for lipid peroxidation increasing and progressive atherosclerosis changes development. The signs of osteoporosis process, reactive arthropathy and age rebuilding of base joint and spine tissues activation are marked.

**KEY WORDS:** hip-spine syndrome, biochemistry, metabolism, parameters, diagnostic.

Отримано 02.06.2003 р.

Адреса для листування: І.А. Зупанець, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.

## ВПЛИВ ХОЛЕЦИСТОКІНІНУ-ТЕТРАПЕПТИДУ НА СТАН ГОРМОНАЛЬНОГО ТА ВУГЛЕВОДНОГО ОБМІНУ В ДІАБЕТИЧНИХ ТВАРИН

С.Д. Тржецинський, Ю.М. Колесник, В.В. Дунаєв  
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

*У роботі наведено дані досліджень на білих щурах впливу 10-денного центрального та периферичного введення холецистокініну-тетрапептиду (ХЦК-4) на гормональний стан та вуглеводний обмін здорових та діабетичних тварин. З'ясовано, що введення ХЦК-4 здоровим тваринам викликає підвищення концентрації інсуліну в сироватці та кількості еритроцитів, що містять інсулін у крові. Однак це підвищення не чинить істотного впливу на рівень глюкози та фруктозаміну в плазмі, що, ймовірно, пов'язано з зростанням під дією ХЦК-4 концентрації кортикостероїдів у крові. Введення ХЦК-4 тваринам з цукровим діабетом викликає збільшення глікемії, зниження вмісту глікогену в тканинах, базального рівня інсуліну в плазмі та кількості еритроцитів, що містять інсулін, а також підвищення вмісту кортикостероїдів у крові. Також зростає індекс напруги, що свідчить про значну напругу компенсаторних можливостей організму. Більш виражена дія спостерігається при центральному введенні нейропептиду.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **цукровий діабет, холецистокінін-тетрапептид, інсулін, кортикостероїди, глюкоза, фруктозамін, глікоген, індекс напруги.**

ВСТУП. Упродовж останніх років увага багатьох дослідників зосереджена на нейропептидах, що належать до природних сполук метаболічного типу дії і мають широкий спектр регуляторного впливу на процеси життєдіяльності організму на різних рівнях його організації [3]. Зокрема встановлено, що нейропептиди, синтезовані в гіпоталамусі, беруть активну участь у регуляції ендокринної функції підшлункової залози. Останні впливають як на центри самого гіпоталамуса і стовбура мозку, що мають відношення до регуляції споживання їжі та води, так і на периферичні ендокринні залози, що беруть участь у регуляції вуглеводного та ліпідного обміну [14]. Відбувається вплив на специфічні рецептори організму-мішеней як нервово-провідниковим шляхом, так і дистантно. Було встановлено, що розвиток цукрового діабету в щурів супроводжується підвищенням процесів синтезу в гіпоталамусі і нейросекреції цілого ряду нейропептидів, у тому числі і холецистокініну [6].

У ході експериментів *in vitro* на ізольованій підшлунковій залозі та культурі острівців встановлено властивість холецистокініну підсилю-

вати синтез і секрецію інсуліну [13, 17], що пов'язано з наявністю специфічних рецепторів до цього пептиду на мембрані  $\beta$ -клітин [16]. Однак слід зазначити, що в ході досліджень *in vivo*, як правило, вивчали ефекти однократного введення пептидів тваринам без патології [12]. Такі дані, на нашу думку, не дають повного уявлення про вплив досліджуваного нейропептиду на ендокринну функцію підшлункової залози, тому що не враховують особливості гормонорецепторних регуляторних взаємозв'язків в умовах ушкодження панкреатичних острівців та метаболічних порушень при діабеті. Крім того, відомо, що деякі нейропептиди безпосередньо діють на метаболічні процеси в організмі та їхні ефекти можуть розрізнятися залежно від шляхів введення, дози й тривалості їхнього надходження в організм.

Тому метою наших досліджень було вивчення змін показників гормонального статусу й вуглеводного обміну в нормі та з експериментальним цукровим діабетом при повторному центральному й периферичному введенні ХЦК-4.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проведено на щурах-самцях лінії Вістар масою

© С.Д. Тржецинський – , Ю.М. Колесник – д.мед.н., проф., В.В. Дунаєв – д.мед.н., проф., 2003.

250-270 г. Цукровий діабет у тварин моделювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення стрептозотоцину (СТЗ) (SIGMA Chemical, США) у дозі 50 мг/кг у 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН-4,5). Холецистокініну-тетрапептид (30-33) виробництва фірми "Peninsula Laboratories Inc." (США) щурам вводили протягом 10 діб двома шляхами: центральним та периферичним. Для центрального – інтрацеребровентрикулярного (іцв) – введення пептиду експериментальним тваринам попередньо імплантували сталеву канюлю у правий латеральний шлуночок мозку. Нейропептид вводили щодня в дозі 20 пм в 3 мкл 0,9 % розчину NaCl. Периферично вводили інтраперитонеально (іп) ХЦК-4 – у дозі 10 нм у 0,5 мол 0,9 % розчину NaCl. Введення пептиду діабетичним щурам починали на 25-ту добу від введення стрептозотоцину. Експериментальних тварин поділили на 9 груп: 1-а – контрольні щури; 2-а – контрольні тварини, яким вводили ХЦК інтраперитонеально (К+ХЦК іп); 3-я група – контрольні тварини, яким вводили ХЦК-4 інтрацеребровентрикулярно (К+ХЦК-4 іцв); 4-а – діабетичні тварини, яких декапітували на 25-у добу після введення СТЗ (Д 3 тижні); 5-а – діабетичні тварини, яких декапітували на 35-у добу після введення СТЗ (Д 5 тижнів); 6-а – діабетичні тварини, яким вводили ХЦК-4 інтраперитонеально (Д+ХЦК-4 іп); 7-а – діабетичні тварини, яким вводили ХЦК-4 інтрацеребровентрикулярно (Д+ХЦК-4 іцв). З метою контролю за ефектами багаторазового інтрацеребровентрикулярного та інтраперитонеального введення нейрогормону додатково 20 щурам інтраперитонеально та інтрацеребровентрикулярно протягом 10 днів вводили 0,9 % розчин NaCl в обсязі, в якому вводилися нейрогормони. При цьому достовірних змін досліджуваних параметрів, порівняно з контрольною групою тварин, не відзначалося. У піддослідних щурів регулярно реєстрували масу тіла. Декапітацію тварин проводили на тлі 8-годинного голодування під етаміналовим наркозом. У щурів відбирали кров та фрагменти печінки й стегнового м'яза для дослідження. Кількість еритроцитів, що містять інсулін, у мазках крові визначали за методом [11] й виражали в відсотках до загальної кількості полічених еритроцитів. Концентрацію інсуліну (ІНС) в сироватці крові тварин – радіоімунологічним методом, кортикостероїдів (КС) – флуорометричним методом аналізу [1]. Вміст глюкози в плазмі крові визначали глюкозооксидазним методом, фруктозаміну – за методом [2]. Вміст глікогену в гомогенатах печінки та кісткової мускулатури визначали – за методом [8].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Встановлено, що як центральне, так і периферичне багаторазове введення ХЦК-4 здоровим тваринам призводило до збільшення вмісту інсуліну в периферичній крові (табл. 1). При цьому зростала як концентрація цього гормону в плазмі, так і кількість еритроцитів в крові, які містять інсулін. Так само спостерігалось підвищення вмісту кортикостероїдів в крові. Слід зазначити, що інсуліностимулювальний ефект був більш вираженим при центральному введенні ХЦК-4, ніж при периферичному. Інсуліностимулювальний ефект ХЦК-4, отриманий нами в ході хронічного експерименту на здорових тваринах, відповідає результатам досліджень, проведених раніше на культурі  $\beta$ -клітин [10, 17]. Однак ці зміни не супроводжувалися значними змінами концентрації глюкози в руслі крові. Дослідження глікогену в тканинах показало збільшення його вмісту в скелетній мускулатурі, особливо при центральному введенні ХЦК-4 (на 28 % при іп введенні та на 62 % при іцв введенні відповідно). Ці ефекти можуть бути пов'язані з підвищенням концентрації як інсуліну, так і кортикостероїдів у крові, що, як відомо, хоча й належать до групи контрінсулярних гормонів і знижують чутливість тканин до дії інсуліну, проте можуть сприяти зростанню вмісту глікогену в скелетних м'язах [7].

Розвиток цукрового діабету у щурів супроводжувався зменшенням маси тіла (на 3-му тижні – на 16 %, а на 5-му – на 25 % відповідно) та вираженою гіперглікемією, що прогресивно збільшувалася від 3-го до 5-го тижня експерименту. Паралельно спостерігалось зростання вмісту в крові фруктозаміну (на 3-му тижні – на 35 %, а на 5-му – на 71 % відповідно), який є інтегральним показником глікемії за останні 2-3 тижні та свідчить про стійке порушення вуглеводного обміну у діабетичних тварин (табл. 1), і зниження кількості депонованого в еритроцитах інсуліну. Так само зменшувалися й запаси глікогену в тканинах. У той же час реєструвалося значне збільшення вмісту кортикостероїдів у руслі крові на (3-му тижні – в 2,3, а на 5-му – у 3,3 рази).

Такі значні зміни метаболічних показників розглядаються як гострий стрес, і для оцінки ваги функціональної напруги гормональної системи організму у піддослідних тварин ми використовували індекс напруги, що дорівнює відношенню відсоткових величин концентрації кортикостероїдів та інсуліну (КС/Інс) [9]. Вихідний рівень гормонів у крові інтактної групи щурів приймали за 100 %. У ході наших експериментів у діабетичних тварин визначалося стійке збільшення індексу напруги (табл. 1),

що свідчить про значну напругу адаптаційних можливостей організму, особливо наприкінці 5-го тижня діабету.

Введення діабетичним щурам нейропептиду впродовж 10 днів не виявляло впливу на динаміку зменшення маси тіла, що була такою ж, як у контрольних діабетичних тварин. При цьому спостерігалася більш виражена гіперглікемія, ніж у щурів з 5-тижневим діабетом, що поєднувалася з вираженою гіперфруктозамінемією (табл. 1). У той же час рівень інсуліну в плазмі та кількість еритроцитів, що містять інсулін, практично не змінився порівняно з діабетичними тваринами без введення нейропептиду. Вміст глікогену в тканинах діабетичних щурів, які отримували ХЦК-4, був нижчим, ніж у контрольних тварин на 5-му тижні діабету. Рівень кортикостероїдів збільшився в 1,3 раза при периферичному та у 1,4 раза при центральному введенні порівняно з контрольною групою діабетичних тварин.

Крім того, при введенні ХЦК-4 діабетичним щурам спостерігалася значне зростання індексу напруги. Варта уваги й те, що у цьому випадку ефекти центрального введення нейропептиду були більш вираженими, ніж периферичного, а значне підвищення індексу напруги в цій групі тварин свідчило про те, що стан напруги став загрозливим, можливо, виснажилися адаптаційні можливості організму, розвинулися глибокі патологічні зміни, що в остаточному результаті призвели до загибелі частини щурів у групі (з 15 тварин до кінця експерименту дожило 8).

Таким чином, при багаторазовому введенні ХЦК-4 тваринам в нормі та при цукровому

діабеті спостерігаються протилежні ефекти на інсуліно-синтетичну функцію підшлункової залози. Ці факти підтверджують раніше висловлені припущення [13, 18] про порушення нейрохімічних та ендокринних процесів регуляції функції периферичних ендокринних залоз в умовах патології, у тому числі й при діабеті. Протилежна спрямованість ефектів хронічного введення ХЦК-4 у здорових і діабетичних тварин, на наш погляд, може бути зумовлена декількома причинами.

При діабеті можливе порушення зв'язування ХЦК-4 із рецепторами на поверхні  $\beta$ -клітин, що пояснюють зменшенням кількості як рецепторів до ХЦК-4 [15], так і  $\beta$ -клітин, які функціонують у панкреатичних острівцях при цій патології. З огляду на те, що в основі патогенезу стрептозотоцинового діабету в тварин первинно лежить ушкодження  $\beta$ -клітин з наступною автоімунною деструкцією панкреатичних острівців і повторна стимуляція ХЦК-4  $\beta$ -клітин, можливо, призводить до їхнього виснаження та деструкції.

Так само відомо, що С-кінцевий тетрапептид ХЦК-4 має стимулювальну дію на секрецію як інсуліну, так і глюкагону та соматостатину [13]. В діабетичних тварин спостерігається порушення внутрішньоострівцевої паракринної регуляції синтезу та секреції гормонів. Це пов'язано з гіпертрофією  $\beta$ - та  $\delta$ -клітин при діабеті, що супроводжується підвищенням синтезу і секреції глюкагону та соматостатину в кровотік [5]. Як відомо, важкість захворювання визначається співвідношенням інсулін/глюкагон в руслі крові [4, 20]. Можливо, при діабеті переважає стимулювальна дія ХЦК-4 на  $\alpha$ -клітини

Таблиця 1 – Вміст інсуліну, кортикостерону та деяких показників вуглеводного обміну в крові здорових та діабетичних тварин при введенні ХЦК-4

Групи тварин	Шлях введення	Вміст в крові							
		Інсулін, нмоль/л	Кількість еритроцитів, які містять інсулін, %	Глюкоза, моль/л	Фруктозамін, мкмоль/г	Глікоген в м'язах, мг/г тканини	Глікоген в печінці, мг/г тканини	Кортикостерон, мкмоль/л	Індекс напруги КС/Інс
Контроль		60,2±3,8	82,9±2,9	3,600±0,066	9,56±0,93	2,58±0,29	31,09±2,15	0,20±0,02	1,00
Дослідні з введенням ХЦК-4	іп	70,1±2,7*	86,2±2,0*	3,99±0,14	11,44±0,40	3,42±0,24*	25,68±2,61	0,32±0,04*	1,42
	іцв	75,6±1,9*	88,8±2,2*	4,18±0,25	11,66±1,15	3,69±0,27*	28,54±1,54	0,38±0,06*	1,56
Діабетичні 3 тижні		40,4±3,8*	72,1±3,9*	8,45±2,09*	22,27±0,93*	1,43±0,12*	7,14±0,58*	0,69±0,07*	5,31
Діабетичні 5 тижнів		18,0±3,2**	37,9±4,7**/**	12,30±0,78*	34,73±3,74**/**	1,56±0,13*	7,36±0,65*	0,54±0,07*	9,4
Діабетичні з введенням ХЦК-4	іп	17,2±4,1**	39,4±4,0**/**	18,17±1,61**/**	31,69±4,29**/**	0,990±0,078**/**	6,02±1,10*	0,71±0,07*	12,81
	іцв	15,9±2,8***	41,6±4,7**/**	23,13±0,72**/**	49,71±5,44**/**	0,91±0,14**/**	3,57±0,49**/**	0,76±0,07**/**	14,98

Примітка: \* – різниця достовірна порівняно з інтактними тваринами ( $p < 0,05$ );

\*\* – різниця достовірна порівняно з щурами з 3-тижневим діабетом ( $p < 0,05$ );

\*\*\* – різниця достовірна порівняно з щурами з 5-тижневим діабетом ( $p < 0,05$ ).

підшлункової залози, що підтверджується окремими даними про транзиторну гіперглікемію, яка спостерігається після одноразового центрального введення ХЦК-4 [21]. При цьому ще більше зміщується рівновага в балансі інсулін/глюкагон на користь глюкагону. Даним ефектом можна пояснити комплекс виявлених нами порушень у гормональному і вуглеводному обміні при введенні ХЦК-4 діабетичним тваринам. Крім того, ХЦК-4, завдяки стимуляції симпатико-адреналової системи, здатний підвищувати вміст кортикостероїдів у крові [19], що так само збільшує гормональний та метаболічний дисбаланс.

**ВИСНОВКИ.** 1. Багаторазове введення ХЦК-4 здоровим тваринам викликає підвищення концентрації інсуліну в сироватці та

кількості еритроцитів, що містять інсулін, в крові. Однак це підвищення не чинить істотного впливу на рівень глюкози та фруктозаміну в плазмі, що, ймовірно, пов'язано з зростанням концентрації кортикостероїдів у крові.

2. Введення ХЦК-4 тваринам з цукровим діабетом збільшує глікемію, знижує вміст глікогену в тканинах.

3. У щурів з цукровим діабетом багаторазове введення ХЦК-4 викликає зниження базального рівня інсуліну в плазмі та кількості еритроцитів, що містять інсулін, а також зростання концентрації кортикостероїдів у крові. Так само підвищується індекс напруги, що свідчить про значну напругу компенсаторних можливостей організму.

4. Більш виражену дію проявляє центральний шлях введення нейропептиду.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Балашов Ю.Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами // Физиол. журн. СССР. – 1990. – **76**, № 2. – С. 280-283.
2. Викторова Л.Н., Городецкий В.К. Колориметрический метод определения неферментативно гликозилированного альбумина и гемоглобина // Лаб. дело. – 1990. – № 5. – С. 15-18.
3. Громов Л.А. Нейропептиды – основа новых лекарственных средств // Фармакол. вісник. – 1996. – № 5. – С. 17-20.
4. Касимова Е.С. Изучение глюкагона и его соотношения с инсулином у больных сахарным диабетом: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 1981. – 16 с.
5. Колесник Ю.М., Абрамов А.В., Мельникова О.В. Взаимоотношения гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и пептидергической систем гипоталамуса у животных с экспериментальным сахарным диабетом // Пробл. эндокринологии. – 1996. – **42**, № 1. – С. 34-37.
6. Колесник Ю.М., Абрамов А.В. Эндокринная функция поджелудочной железы при экспериментальном сахарном диабете у крыс и ее особенности при адаптации к гипоксии // Пробл. эндокринологии. – 1993. – **39**, № 5. – С. 37-40.
7. Кортач В.И. Влияние кортикотропина и гидрокортизона на углеводный обмен в скелетных мышцах // Укр. биохим. журн. – 1988. – **60**, № 2. – С. 61-66.
8. Методы биохимических исследований / Под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленинград. унта, 1992. – С. 181-183.
9. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. – Новосибирск: Наука, 1983. – 232 с.
10. Садовникова Н.В., Федотов В.П., Швачкин Ю.П. и др. Стимулирующая секрецию инсулина активность некоторых производных С-концевого тетрапептида холецистокинина // Хим.-фарм. журн. – 1987. – № 12. – С. 1424-1427.
11. Сандуляк Л.И. Свойство эритроцитов депонировать и транспортировать инсулин // Успехи совр. биол. – 1987. – **3**, вып. 2. – С. 207-216.
12. Федотов В.П., Садовникова Н.В., Гудошников В.И. и др. Влияние тетрапептида холецистокинина (ССК-4) на функцию островков Лангерганса и аденогипофиза // Бюл. экперим. биол. и мед. – 1984. – № 6. – С. 729-731.
13. Федотов В.П., Садовникова Н.В., Чернушкина А.В. Инсулинотропные факторы в норме и при патологии // Пробл. эндокринологии. – 1992. – **38**, № 5. – С. 12-17.
14. Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Ашмарин И.П. Пептидергическая регуляция гомеостаза // Успехи совр. биол. – 2002. – **122**, № 2. – С. 190-203.
15. Funakoshi A., Miyasaka K., Jimi A. et al. Little or no expression of the cholecystokinin-A receptor gene in the pan-creas of diabetic rats (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty = OLETF rats) // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1994. – **199**, № 2. – P. 482-488.
16. Funakoshi A., Miyasaka K., Kanai S. et al. Pancreatic endocrine dysfunction in rats not expressing the chole-cystokinin-A receptor // Pancreas. – 1996. – **12**, № 3. – P. 230-236.
17. Knittel J.J., Hafner B., Patel D.G., Verspohl E.J. Stimulation of insulin secretion from pancreatic islets by the chole-cystokinin-tetrapeptide analogs Trp-Pro-Asp-Phe-NH<sub>2</sub> and Trp-Pro-Asp-Phe(4'-NO<sub>2</sub>)-NH<sub>2</sub> // Pept. Res. – 1990. – **3**, № 5. – P. 224-227.
18. Leibowitz S.F. Specificity of hypothalamic

peptides in the control of behavioral and physiological processes // Ann. N-Y. Acad. Sci. – 1994. – 739. – P. 12-35.

19. Sander L.D., Porter I.B. Influence of bombesin, CCK at secretion CRF and corticosterone concentration in rat // *Pep-tides*. – 1988. – 9, № 1. – P.113-119.

20. Shah Pankaj, Basu Ananda, Basu Rifa, Rizza Robert. Impact of fact of suppression of glucagons on glucose tolerance in humans // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – 277, № 2, Pt. 1. – P. E283-E290.

21. Williams G., Bloom S.R. Regulatory peptides, the hypothalamus and diabetes // *Diabet. Med.* – 1989. – 6, № 6. – P. 427-485.

## ВЛИЯНИЕ ХОЛЕЦИСТОКИНИНА-ТЕТРАПЕПТИДА НА СОСТОЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО И УГЛЕВОДНОГО ОБМЕНА У ДИАБЕТИЧЕСКИХ ЖИВОТНЫХ

С.Д. Тржецинский, Ю.М. Колесник, В.В. Дунаев  
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

### Резюме

В работе приведены данные исследований на белых крысах влияния 10-дневного центрального и периферического введения холецистокинина-тетрапептида (ХЦК-4) на гормональное состояние и углеводный обмен здоровых и диабетических животных. Выяснено, что введение ХЦК-4 здоровым животным вызывает повышение концентрации инсулина в сыворотке и количества эритроцитов, которые содержат инсулин в крови. Однако это повышение не оказывает существенного влияния на уровень глюкозы и фруктозамина в плазме, что, вероятно, связано с возрастанием под воздействием ХЦК-4 концентрации кортикостероидов в крови. Введение ХЦК-4 животным с сахарным диабетом вызывает увеличение гликемии, снижение содержания гликогена в тканях, базального уровня инсулина в плазме и количества эритроцитов, которые содержат инсулин, а также повышение содержания кортикостероидов в крови. Также возрастает индекс напряжения, что свидетельствует о значительном напряжении компенсаторных возможностей организма. Более выраженное действие наблюдается при центральном введении нейропептида.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сахарный диабет, холецистокинин-тетрапептид, инсулин, кортикостероиды, глюкоза, фруктозамин, гликоген, индекс напряжения.

## CHOLECYSTOKININ-TETRAPEPTIDE INFLUENCE ON STATUS OF HORMONAL AND CARBOHYDRATE METABOLISM IN DIABETIC ANIMALS

S.D. Trzhetsynsky, Y.M. Kolesnyk, V.V. Dunayev  
ZAPORIZHZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

### Summary

This work contains the data obtained after the study of the effect of 10 days central and peripheral administration of cholecystokinin-tetrapeptide (CCK-4) on hormonal status and carbohydrate metabolism in normal and diabetic white rats. It was found that CCK-4 introduction causes the rise of insulin concentration in serum and amount of insulin-containing erythrocytes in blood of normal animals. However, this rise does not influence considerably the glucose and fructosamine levels in plasma that is obviously connected with increase of corticosteroid concentration in blood at the influence of CCK-4. CCK-4 introduction to diabetic animals results in glycemia increase, glycogen content reduction in tissues, the reduction of insulin basal level in plasma and amount of erythrocytes as well as the increase of corticosteroid content in blood. The increase of stress index is observed which evidences about significant tension of compensatory abilities of an organism. More pronounced action is observed at central administration of neuropeptides.

KEY WORDS: diabetes mellitus, cholecystokinin-tetrapeptide, insulin, corticosteroids, glucose, fructosamine, glycogen, stress index.

Отримано 25.06.2003 р.

Адреса для листування: С.Д. Тржецинський, вул. Грязнова, 75, кв. 1, Запоріжжя, 69002, Україна.

## РОЛЬ МЕТАЛОТІОНЕЇНІВ У ЗВ'ЯЗУВАННІ ЦИНКУ І МІДІ В ТКАНИНАХ КОРОПА ЗА ДІЇ НА ОРГАНІЗМ ЦИНКУ

О.Б. Столяр

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. ВОЛОДИМИРА ГНАТЮКА

*Досліджено вплив іонів цинку (2,0 мг/л протягом 14 діб) на організм коропа. Показано, що за цих умов відбуваються агрегація, зміна УФ-спектрів металотіонеїнів, пригнічення їх синтезу. Спостерігаються зменшення вмісту цинку та міді у металотіонеїнах та його збільшення у інших термостабільних компонентах тканин, підвищення рівня в печінці небілкових тіолів та зниження білкових.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **короп, термостабільні білки, металотіонеїни, тіоли, цинк, мідь.**

ВСТУП. Використання сполук цинку у рибному господарстві як кормових добавок [9, 12] викликає інтерес до вивчення здатності організму риб акумулювати його у вигляді нетоксичних сполук та виявлення ознак її зниження. Депонування і перерозподіл цинку між різними цинковмісними сполуками в клітинах хребетних здійснюється за допомогою Zn-металотіонеїнів (МТ) та глутатіону [10]. МТ також зв'язують значну частку від загального вмісту міді в тканинах [5]. Нами було показано, що дія іонів цинку в концентрації, близькій до природного вмісту у воді (0,1 мг/л), на коропа сприяє акумуляції цинку в МТ та активує антиоксидні процеси в тканинах [2, 4]. Тому являло інтерес дослідити участь МТ коропа у зв'язуванні цинку та міді при вмісті цинку у воді, який перевищує природний. Ми обрали концентрацію цинку у воді 2,0 мг/л, вплив якої на акумуляцію цинку, білковий обмін та антиоксидний захист в тканинах коропа досить добре вивчено [1, 4, 6].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на дворічках коропа лускатого (*Cyprinus carpio L.*) масою 200-250 г в осінній період. Риб, групами по 6 тварин, після акліматизації до лабораторних умов утримували протягом 14 діб у басейнах об'ємом 200 л при температурі близько 18 °С у відстояній, добре аерованій воді. Воду в басейнах змінювали кожних 2 дні. Риб не годували. Одна група була контрольною, іншій у воду додавали 2,0 мг/л

© О.Б. Столяр – к.біол.н., 2003.

Zn<sup>2+</sup> (ZnSO<sub>4</sub>). Для аналізу брали передню частку печінки, зяброві дуги та ентероцити. Усі процедури з виділення термостабільних білків, МТ, визначення вмісту білків, тіолів і металів проводили, як описано в [2, 3]. Визначали також включення рівномірно міченого гліцину ([U<sup>14</sup>C]) в розчин термостабільних білків та небілковому розчині печінки коропа [3]. Контроль денатурації білків здійснювали за їх розчинністю в 0,6 М КСІ після центрифугування 2 мл 5 % гомогенату тканини (5000 об./хв, 15 хв). Результати визначення показників об'єднаних фракцій термостабільних білків після хроматографії на сефадексі G-75 подано як усереднені значення двох-трьох вимірів. Інші результати обробляли статистично.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За дії цинку на коропа вміст білків в печінці та їх здатність до денатурації, а також включення гліцину в небілковий розчин, відповідають нормі (табл. 1, 2). Разом із тим, зменшується вміст термостабільних білків, істотно змінюється рівень тіолів, причому спостерігається селективність відповіді білкових і небілкових тіолів.

У результаті гель-хроматографії розчину термостабільних білків на сефадексі G-75 одержано дві фракції (М – приблизно 60 і 6 кДа) [2], УФ-спектри яких істотно відрізняються між собою (рис. 1). Низькомолекулярну фракцію було ідентифіковано як МТ [2, 9, 10]. За дії цинку її об'єм зменшується, спектральні ознаки МТ – пік з максимумом приблизно

250 нм [8] – втрачаються. Разом із тим, їх появу відзначено у фракції високомолекулярних термостабільних білків. Ці ознаки можуть бути зумовлені агрегацією МТ. Подібні зміни спостерігались нами у коропа і за дії токсичних доз інших металів [3, 5] та відомі з літератури [13]. Радіоактивність розчину термостабільних білків (табл. 2) значно зменшується, що в поєднанні з вищенаведеними фактами свідчить про пригнічення синтезу і функціональних можливостей МТ.

Дані про сумарний вміст металів в розчині термостабільних білків печінки коропа та їх фракціях за дії цинку свідчать про те, що для цинку він відповідає нормі, але для міді зростає у 2 рази проти неї (рис. 2). В складі МТ в печінці і зябрах значно зменшується вміст обох металів, а в ентероцитах – лише міді. При цьому спостерігається акумуляція цинку і міді іншими компонентами – високомолекулярною фракцією термостабільних білків і, як було показано

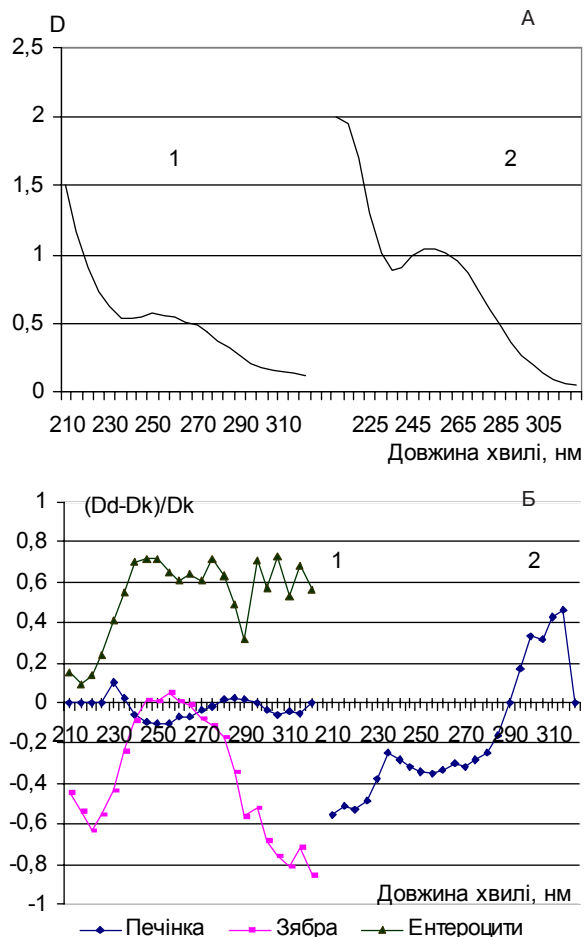


Рис. 1. УФ-спектри фракцій термостабільних білків печінки коропа, виділених на сефадексі G-75 в 0,01 М трис-НСІ буфері, Рн-8,0 за дії на організм іонів  $Zn^{2+}$ : А – УФ-спектр поглинання (D) в контролі, Б – відношення поглинання за дії суміші й у контролі  $(Dd-Dk)/Dk$ ; 1 – білки з Мг приблизно 67 кДа, 2 – металотіонеїни.

для печінки, небілковими компонентами розчину. Найбільш стабільним був вміст цинку в МТ ентероцитів. Вміст МТ, визначений на основі даних про кількість у них цинку і міді, в печінці за дії цинку зменшується з 444 до 268 мкг/г тканини, в зябрах – з 256 до 122 мкг/г тканини, а в ентероцитах не зазнає істотних змін – 164 і 180 мкг/г відповідно.

Серед різних важких металів, дію яких на організм риб добре досліджено, цинк відзначається тим, що його гомеостаз найбільш

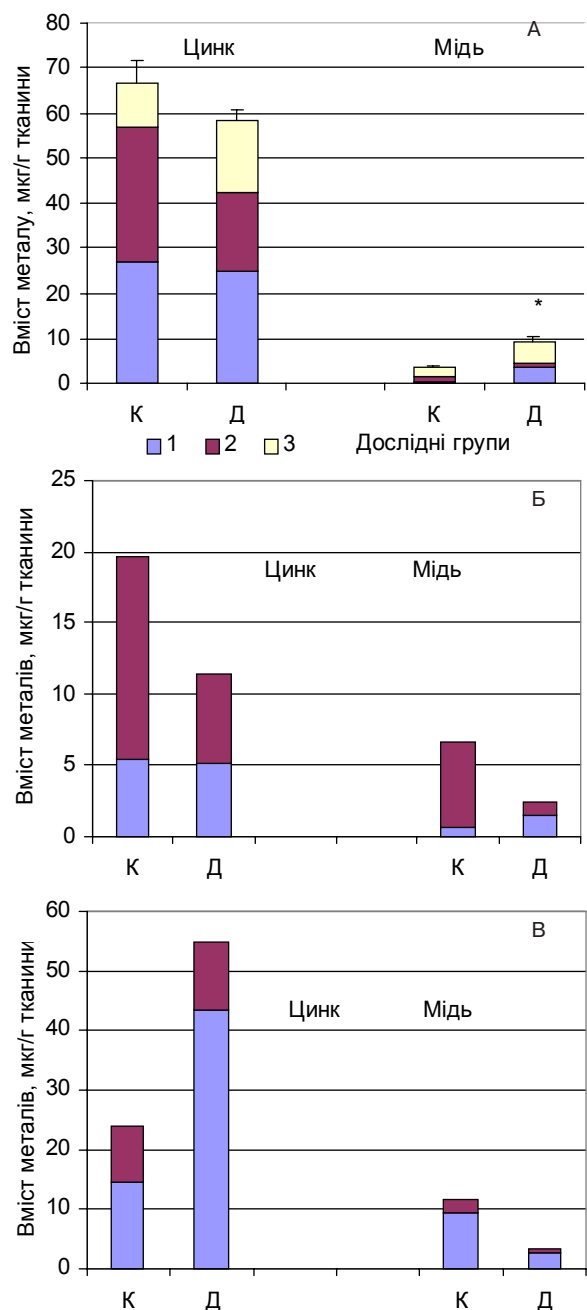


Рис. 2. Вміст металів у термостабільних компонентах тканин коропа за дії 2,0 мг/л цинку на організм: А – печінки, Б – зябер, В – ентероцитів; 1 – високомолекулярні білки, 2 – металотіонеїни, 3 – небілковий розчин; К – контроль, Д – дослід.



Таблиця 1 – Вміст білків і тіолів у печінці коропа за дії іонів цинку ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Група тварин	Вміст білків, мг/г тканини			Вміст тіолів, мкмоль/г тканини	
	загальний	розчинних в 0,6 М КСІ	термостабільних	небілкових	білкових
Контроль	106,2±7,5	45,0±9,6	3,77±0,10	2,86±0,24	9,07±0,72
Дослід	110,0±7,1	58,0±8,3	3,19±0,18*	5,70±0,86*	5,32±1,09*

Примітка. Тут і далі \* – відмінність, порівняно з контролем, достовірна ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 2 – Включення радіоактивного гліцину в розчинні сполуки печінки коропа за дії 2,0 мг/л іонів цинку, імпульс на 1 г тканини ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Компонент тканини	Контроль	Дослід
Небілковий розчин	3131±33	2481±343
Розчин термостабільних білків	6962±112	1631±186*

досконало регульований [6, 7, 9, 11]. Тканинну специфіку акумуляції цинку в МТ, яку ми спостерігали, також можна, ймовірно, пояснити тим, що травний тракт є найважливішим шляхом абсорбції цинку у тварин [9], а отже, і тканиною, якій властива найефективіша регуляція його вмісту. Однак, як показують наші результати, загальні показники рівня цинку або білків в тканині не можуть свідчити про стабільність її функції. Так, відзначене нами раніше посилення прооксидних процесів за дії цинку [4] може бути зумовлене збільшенням вмісту рівня розчинної форми міді. Зміни вмісту інших елементів за дії цинку на риб на тлі постійного або навіть зменшеного вмісту самого цинку в тканинах відмічали й інші автори [11].

Як показали наші результати, спеціалізовані низькомолекулярні тіолові сполуки, які беруть участь у внутрішньоклітинному розподілі і екскреції цинку, МТ та глутатіон, чутливо реагують на перевищення нетоксичної дози цього металу. Зростання вмісту небілкових тіолів свідчить про те, що ці сполуки (переважно глутатіон) можуть бути ефективними в детоксикації надлишку металів [11]. Селективність тіолів відносно цинку також є специфічною саме для його дії і відрізняється від такої, що ми спостерігали для марганцю, свинцю, міді [3, 5].

**ВИСНОВОК.** Перевищення нетоксичного рівня цинку в середовищі чутливо відображають вміст МТ та інших тіолових сполук і розподіл цинку та міді між ними в тканинах коропа.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Курант В.З. Динамика белков и нуклеиновых кислот в организме карпа под влиянием повышенных концентраций марганца, цинка и меди // Гидробиол. журн. – 2001. – **37**, № 4. – С. 45-51.
2. Столяр О.Б. Вплив іонів цинку, марганцю та свинцю на термостабільні білки печінки коропа // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, № 1. – С. 85-89.
3. Столяр О.Б., Курант В.З., Хоменчук В.А., Грубинко В.В. Свойства низкомолекулярных термостабильных белков и содержание тиолов в гепатопанкреасе карпа при воздействии сублетальных концентраций ионов свинца и марганца // Гидробиол. журн. – 2001. – **37**, № 5. – С. 73-80.
4. Столяр О.Б., Мудра А.Є., Клебан О.Л., Костюк С.А. Вплив сублетальних концентрацій йонів цинку на метаболічну функцію та антиоксидантно-прооксидантний статус гепатопанкреасу коропа // Наукові записки Тернопільського педуніверситету. Серія: Біологія. – Тернопіль, 2001. – № 1(12). – С. 97-100.
5. Столяр О.Б., Хоменчук В.О., Арсан В.О., Грубинко В.В. Роль низькомолекулярних сірковмісних сполук гепатопанкреасу коропа у зв'язуванні іонів міді // Доп. НАН України. – 2001. – № 3. – С. 198-203.
6. Хоменчук В.О., Курант В.З., Коновець І.М. та ін. Вплив деяких фізико-хімічних параметрів водного середовища на накопичення важких металів в організмі коропа // ДАН України. – 2000. – № 5. – С. 173-176.
7. Chowdhury M.J., Grosell M., McDonald D.G., Wood C.M. Plasma clearance of cadmium and zinc in non-acclimated and metal-acclimated trout // Aquatic Toxicol. – 2003. – **64**, № 3. – P. 259-275.
8. Dallinger R., Egg M., Kock G., Hofer R. The role of metallothionein in cadmium accumulation of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) from high alpine lakes // Aquatic Toxicol. – 1997. – **38**, № 1-3. – P. 47-66.
9. Glover C. N., Hogstrand C. Effects of dissolved

metals and other hydrominerals on in vivo intestinal zinc uptake in freshwater rainbow trout // Aquatic Toxicol. – 2003. – **62**, № 4. – P. 281-293.

10. Jacob C., Maret W., Vallee B. L. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1998. – **95**, № 7. – P. 3489-3494.

11. Phillips D. J.-H., Rainbow P. S. Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms // Mar.

Environ. Res. – 1989. – **28**, № 1-4. – P. 207-210.

12. Spry D. J., Modson P. V., Wood C. M. Relative contribution of dietary and waterborne zinc in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* // Can. J. Fish. And Aquat. Sci. – 1988. – **45**, № 1. – P. 32-41.

13. Wilhelmsen T. W., Olsvik P. A., Hansen B. H., Andersen R. A. Evidence for oligomerization of metallothioneins in their functional state // J. Chromatogr. A. – 2002. – **979**, № 1-2. – P. 249-254.

## РОЛЬ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В СВЯЗЫВАНИИ ЦИНКА И МЕДИ В ТКАНЯХ КАРПА ПРИ ДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ ЦИНКА

**О.Б. Столяр**

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. ВЛАДИМИРА ГНАТЮКА

### Резюме

*Исследовано действие ионов цинка (2,0 мг/л на протяжении 14 суток) на организм карпа. Показано, что в этих условиях происходят агрегация, изменение УФ-спектров металлотиионеинов, угнетение их синтеза. Наблюдаются уменьшение содержания цинка и меди в металлотиионеинах и его увеличение в других термостабильных компонентах тканей, повышние уровня в печени небелковых тиолов и снижение белковых.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** карп, термостабильные белки, металлотиионеины, тиолы, цинк, медь.

## THE ROLE OF METALLOTHIONEINS IN THE ZINC AND COPPER BINDING IN CARP TISSUES UNDER THE ZINC EFFECT ON THE ORGANISM

**O.B. Stolyar**

TERNOPIL STATE PEDAGOGICAL UNIVERSITY BY VOLODYMYR HNATYUK

### Summary

*The influence of the zinc ions (2,0 mg/l for up 14 days) on the carp organism has been investigated. It was revealed the decreasing of the content, aggregation, changing of UV-spectra of metallothioneins and inhibition of their synthesis. The decreasing of the zinc and copper content in the metallothioneins and increasing in the another thermostable compounds of the tissues, the increasing of the nonprotein thiols and decreasing of protein thiols were observed.*

**KEY WORDS:** carp, thermostable proteins, metallothioneins, thiols, zinc, copper.

Отримано 02.09.2003 р.

Адреса для листування: О.Б. Столяр, вул. За Рудкою, 14, кв. 77, Тернопіль, 46003, Україна.

## ПЕРЕКИСНЕ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА СТАН АНТИОКСИДНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ТОКСИЧНОГО ГЕПАТИТУ ТА ДІЇ НАСТОЯНКИ ПЕРСТАЧУ ПРЯМОСТОЯЧОГО

**Н.Б. Тефтьюєва, І.Ф. Мецишен**  
БУКОВИНСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

*Вивчено ефективність застосування настоянки перстачу прямостоячого (НПП) при токсичному гепатиті, викликаному тетрахлорметаном. Його вводили щурам внутрішньошлунково у дозі 0,1 мл на 100 г маси протягом 14 днів. Дослідження впливу НПП на показники оксидного та антиоксидного стану крові тварин проведено на 3-тю, 7-му та 14-ту доби. Під дією настоянки на 7-й день спостерігалося суттєве зниження вмісту в крові малонового діальдегіду, а також молекулярних продуктів ПОЛ, що містять ізольовані подвійні зв'язки, дієнові кон'югати, кетодієни та сполучені триєни. В той же час відбулася нормалізація активності каталази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази. Застосування НПП упродовж 14 діб сприяло повній нормалізації вмісту в крові малонового діальдегіду і молекулярних продуктів ПОЛ, а також активності досліджуваних ферментів антиоксидного захисту крові щурів.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** настоянка перстачу прямостоячого, перекисне окиснення ліпідів, відновлений глутатіон, глутатіонпероксидаза, каталаза.

**ВСТУП.** У багатьох випадках першопрічиною розвитку патологічного процесу в клітинах, тканинах і організмі в цілому є активізація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у біологічних мембранах, що особливо зростає під впливом несприятливих факторів навколишнього середовища [2]. Останнім часом спостерігається збільшення кількості захворювань печінки токсичного генезу, особливо під впливом гепатотоксичних галогенозаміщених вуглеводнів, які широко використовують у сучасній промисловості [1, 15, 16]. Препарати рослинного походження через різноманітність їх фармакологічного впливу на організм людини та збалансованість хімічного складу особливо привертають до себе увагу науковців. Перстач прямостоячий завдяки широкій розповсюдженості на всій території земної кулі, дешевизні сировини, особливостям хімічного складу вже багато років застосовується в народній медицині різних країн, введений до офіційних фармакопей [3, 17, 19]. Проте недостатньо досліджено можливості його практичного використання.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Із висушеного кореневища, що відповідає вимогам ДЕСТ © Н.Б. Тефтьюєва, І.Ф. Мецишен – д.біол. н., проф., 2003.

6716-71 [12], виготовлено настоянку перстачу прямостоячого (НПП) у співвідношенні 1:5 на 40 % етиловому спирті згідно з вимогами Державної Фармакопеї [8]. Експериментальні дослідження проведено на 76 білих безпородних статевозрілих щурах-самцях масою (200±10,0) г, які перебували на повноцінному раціоні віварію при температурі 19-20 °С. Усі тварини перед початком експерименту голодували протягом 24 год.

Токсичний гепатит моделювали шляхом дворазового (через день) внутрішньошлункового введення тваринам 50 % олійного (оливкового) розчину  $CCl_4$  із розрахунку 0,25 мл на 100 г маси [16]. Піддослідних щурів було поділено на три групи: I – інтактні тварини; II – тварини після введення  $CCl_4$ ; III – тварини, уражені  $CCl_4$ , яким вводили НПП у дозі 0,1 мл на 100 г маси. Дозу препарату встановлено на основі проведених раніше в системі *in vitro* та *in vivo* досліджень [17]. Настоянку розводили дистильованою водою і вводили щурам внутрішньошлунково протягом 14 днів після інтоксикації. Тварин забивали шляхом декапітації під легким ефірним наркозом на 3-тю, 7-му та 14-ту доби введення НПП. Кров відбирали в присутності ЕДТА в концентрації 1 мг/мл цільної крові.

Стан ПОЛ крові щурів оцінювали за вмістом малонового діальдегіду (МДА) в еритроцитах, який виражали в нмоль/мл еритроцитів [4]; спектрофотометрично визначали кількість сполук з ізольованими подвійними зв'язками (ІПЗ), дієнових кон'югатів (ДК), кетодієнів та сполучених триєнів (КД та СТ) [6].

У цільній крові тварин титраційно визначали вміст відновленого глутатіону (ГSH) і розраховували його в мкмоль/мл крові [7]. В еритроцитах досліджували активність ферментів: глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6ФД) [КФ 1.1.1.49] – в гемолізатах крові (1:20) за методом Корнберга і Хорекера в модифікації Ю.Л. Захар'їна [9], виражали в мкмоль утвореного НАДФН/хв·г Hb; про активність глутатіонредуктази (ГР) [КФ 1.6.4.2] судили за зменшенням кількості НАДФН [18], виражали її в мкмоль НАДФН/хв·г Hb; глутатіонпероксидази (ГП) [КФ 1.11.1.9] – за кількістю окисненого глутатіону, що утворився з відновленого глутатіону при знешкодженні пероксиду водню в глутатіонпероксидазній реакції [5], виражали в мкмоль ГSSГ/хв·мл крові; глутатіон-S-трансферази (Г-S-T) [КФ 2.5.1.18] – за накопиченням кон'югату відновленого глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом, який утворився у ході реакції під дією ферменту, виражали в нмоль/хв·мл плазми [20]. Активність каталази [КФ 1.11.1.6] визначали спектрофотометрично і розраховували в мкмоль  $H_2O_2$ /хв·г Hb [13].

Одержані експериментальні дані обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента [10].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Тетрахлорметан є гепатотропною отрутою [15, 16], яка під дією цитохрому P-450 печінки окиснюється з утворенням вільних радикалів та електрофільних метаболітів, зокрема радикала  $CCl_3O$ ; що індукує процеси вільнорадикального окиснення ліпідів. Як наслідок, пошкоджуються мембранні фосфоліпіди, нуклеїнові кислоти, структурні білки та ферменти гепатоцитів [1, 2, 15].

Одне з центральних місць у антиоксидному захисті організму займає система глутатіону [11, 14]. Відомо [14], що він бере безпосередню участь у детоксикації ксенобіотиків, а також забезпечує відновлення гідропероксидів, що утворюються під час ПОЛ.

Результати проведеного нами експерименту показали (табл. 1, 2), що на 3-тю добу в крові інтоксикованих тетрахлорметаном щурів спостерігалось значне (у 2 рази), порівняно з контролем, підвищення рівня МДА, а також збільшення вмісту молекулярних продуктів

ПОЛ: ІПЗ – на 31,3 %; ДК – на 51,1 %; КД та СТ – на 41,6 %. Зросли рівень ГSH (на 25,0 %) та активність ферментів його обміну: Г-6ФДГ (на 15,5 %), ГР (на 13,4 %), Г-S-T (на 65,8 %); знизилась активність ГП (на 10,9 %) порівняно з показниками групи інтактних тварин. Зменшилася активність каталази (на 21,3 %) порівняно з контролем. Ці показники, можливо, слід розцінювати як компенсаторну реакцію з боку організму тварин у відповідь на посилення процесів ПОЛ при отруєнні щурів тетрахлорметаном. Проте, очевидно, спостерігалась недостатність компенсаторних механізмів антиоксидного захисту організму щурів в детоксикації продуктів ПОЛ.

На 7-му добу експерименту в групі інтоксикованих тварин зберігалось підвищення рівня МДА в крові (на 72,8 %) й молекулярних продуктів ПОЛ: ІПЗ – на 22,2 %; ДК – на 30,7 %; КД та СТ – на 16,9 % порівняно з показниками інтактних щурів. Зберігалися також збільшеними вміст ГSH (на 21,3%) та активність ферментів його обміну: Г-6ФД (на 13,2 %), глутатіонредуктази (на 11,9 %), Г-S-T (на 42,5 %); активність ГП зросла порівняно з попереднім строком, але все ще залишалась зниженою (на 7,3 %) порівняно з показниками групи інтактних тварин. Зберігалось зменшення активності каталази (на 17,6 %) порівняно з контролем.

Результати дослідження показали, що введення інтоксикованим тетрахлорметаном тваринам НПП у дозі 0,1 мл на 100 г маси щура протягом 3-х діб зменшувало вміст у крові МДА і молекулярних продуктів ПОЛ. Спостерігалися зниження рівня відновленого глутатіону, активності ферментів його обміну (Г-6ФД, ГР, Г-S-T) та підвищення активності ГП і каталази порівняно з показниками у нелікованих тварин.

Введення тваринам НПП (0,1 мл на 100 г маси щура) на фоні післядії  $CCl_4$  протягом 7 діб зменшило вміст МДА в крові щурів (на 14,2 %), а також молекулярних продуктів ПОЛ. Активність каталази була на 11,5 % вищою, а глутатіон-S-трансферази – на 17,8 % нижчою, ніж у групі нелікованих тварин. Під дією НПП значно швидше нормалізувався рівень відновленого глутатіону та ферментів глутатинової ланки антиоксидного захисту організму щурів.

Через 14 діб після інтоксикації  $CCl_4$  вміст МДА у крові нелікованих тварин знизився порівняно з попереднім строком, але залишався вищим, ніж у щурів контрольної групи (на 42 %). Зберігалися підвищеними рівень молекулярних продуктів ПОЛ (ІПЗ – на 14,9 %; ДК – на 15,1 %) та активність ГР (на 10,3 %) і

Таблиця 1 – Стан антиоксидної системи крові щурів за умов експериментального токсичного гепатиту та дії настоянки перстачу прямоствоячого (НПП) ( $M \pm m$ ;  $n=8-20$ )

Групи тварин, умови досліджу	Досліджувані показники						
	Каталаза (мкмоль/хв·гНв)	Глюкозо-6-фосфат-дегідрогеназа (мкмоль НАДФН/хв·гНв)	Глутатіон-редуктаза (мкмоль НАДФН/хв·гНв)	Глутатіон відновлений (мкмоль/мл крові)	Глутатіон-пероксидаза (мкмоль ГSSГ/хв·мл крові)	Глутатіон-S-трансфераза (нмоль/хв·мл плазми)	
Контроль	146,00±6,75	6,08±0,11	2,92±0,08	1,08±0,02	20,70±0,42	37,60±2,15	
3-я доба	Інтоксикація СС <sub>4</sub>	115,00±4,31*	7,02±0,17*	3,31±0,11*	1,35±0,08*	18,50±0,23*	62,40±1,84*
	Інтоксикація + НПП	124,00±5,95*	6,53±0,20	3,22±0,12*	1,24±0,07*	18,80±0,17*	55,40±1,61*
7-а доба	Інтоксикація СС <sub>4</sub>	121,00±9,34*	6,88±0,16*	3,27±0,06*	1,31±0,04*	19,20±0,51*	53,60±1,44*
	Інтоксикація + НПП	135,00±7,84	6,36±0,15	3,08±0,09	1,14±0,02*	20,50±1,10	44,00±1,57*
14-а доба	Інтоксикація СС <sub>4</sub>	139,00±6,28	6,32±0,12	3,22±0,11*	1,06±0,03	20,60±0,48	44,80±1,65*
	Інтоксикація + НПП	150,00±6,43	6,16±0,12	2,98±0,05	1,12±0,03	21,40±0,56	38,70±1,93

Примітка. \* – зміни достовірні порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ ).

Таблиця 2 – Стан ПОЛ крові щурів за умов експериментального токсичного гепатиту та дії настоянки перстачу прямоствоячого (НПП) ( $M \pm m$ ;  $n=8-20$ )

Групи тварин, умови досліджу	Досліджувані показники				
	ІПЗ ( $E_{220}$ /мл крові)	ДК ( $E_{232}$ /мл крові)	КД і СТ ( $E_{278}$ /мл крові)	МА (нмоль/мл еритроц.)	
Контроль	3,96±0,07	1,86±0,04	0,77±0,04	12,59±0,47	
3-я доба	Інтоксикація СС <sub>4</sub>	5,20±0,12*	2,81±0,07*	1,09±0,05*	24,93±0,59*
	Інтоксикація + НПП	4,96±0,18*	2,75±0,12*	0,95±0,06*	23,02±0,98*
7-а доба	Інтоксикація СС <sub>4</sub>	4,84±0,16*	2,43±0,07*	0,90±0,04*	21,76±1,0*
	Інтоксикація + НПП	4,57±0,12*	2,02±0,04*	0,87±0,05	18,68±0,62*
14-а доба	Інтоксикація СС <sub>4</sub>	4,55±0,13*	2,14±0,07*	0,77±0,03	17,88±0,90*
	Інтоксикація + НПП	3,98±0,14	1,84±0,06	0,75±0,06	13,93±1,35

Примітка. \* – зміни достовірні порівняно з контролем ( $p \leq 0,05$ ).

Г-S-T (на 19 %) порівняно з показниками інтактних тварин.

Рівень МДА у щурів, які отримували НПП протягом 14 діб, був на 22,1 % нижчим, ніж у нелікованих тварин. На фоні застосування НПП протягом 14 днів з метою корекції порушень окисно-антиоксидного статусу організму відбувалася нормалізація вмісту відновленого глутатіону та активності досліджуваних ферментів антиоксидного захисту крові щурів.

Отже, настоянка перстачу прямоствоячого проявляє високу антиоксидну активність при токсичних ураженнях печінки. Така дія НПП, можливо, зумовлена наявністю в рослині великої кількості біологічно активних речовин, відомих як антиоксиданти прямої дії [3, 17, 19]. Це, зокрема, флавоноїди та інші поліфеноли, каротиноїди,

дубильні речовини пірокатехінової групи, корична, синапова, ферулова кислоти. Крім того, можливо, НПП активізує каталітичну редокс-систему глутатіону, яка також бере безпосередню участь у знешкодженні токсичних продуктів ПОЛ [14].

**ВИСНОВКИ.** 1. За експериментального токсичного гепатиту в крові щурів відбувається некомпенсоване підвищення інтенсивності процесів вільнорадикального окиснення ліпідів.

2. Застосування НПП у дозі 0,1 мл на 100 г маси щура на фоні інтоксикації СС<sub>4</sub> протягом 7 діб призводить до істотного зниження досліджуваних показників перекисного окиснення ліпідів крові тварин, упродовж 14 днів – до повної нормалізації досліджуваних показників антиоксидної системи крові щурів.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бабак О.Я. Хронические гепатиты. – К.: Издательство Блиц-Информ, 1999. – 208 с.
2. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиокислительный гомеостаз в норме и патологии // Под ред. Ю.А. Зозули – К.: Чернобыльинтеринформ. – 1997. – Ч. 1. – 420 с.
3. Большакова И.В., Лозовская Е.Л., Сапегинский И.И. Антиоксидантные свойства растительных экстрактов // Биофизика. – 1998. – **43**, № 2. – С. 186-188.
4. Васильева Н.В. Стан оксидантної та захисної глутатионової системи крові хворих в різні періоди мозкового інсульту // Буковин. мед. вісник. – 1998. – **2**, № 2. – С. 80-84.
5. Власова С. Н., Шабунина Е.И., Переслегина И.А. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – С. 19-21.
6. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопросы мед. химии. – 1989. – **35**, вып. 1. – С. 127-131.
7. Геруш І.В., Мещишен І.Ф. Стан глутатионової системи крові за умов експериментального виразкового ураження гастродуоденальної зони та дії настойки ехінацеї пурпурової // Вісник проблем біології та медицини. – 1998. – № 7. – С. 10-15.
8. Государственная фармакопея СССР. 9-е изд. – М.: Медгиз, 1961. – С. 412-413.
9. Захарьин Ю.Л. Метод определения активности глюкозо-6-Фосфат-дегидрогеназы и 6-фосфоглюконатдегидрогеназы // Лаб. дело. – 1967. – № 6. – С. 327-330.
10. Иванов Ю.И., Погорелюк О.Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. – М.: Медицина, 1990. – 224 с.
11. Колесниченко Л.С., Кулинский В.И. Глутатионтрансферазы // Успехи соврем. биол. – 1998. – **107**, вып. 2. – С. 179-194.
12. Корневище лапчатки (дикого калгана, дубровки), ГОСТ 6716-71. – М.: Государственный комитет стандартов Совета Министров СССР, 1971. – 6 с.
13. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
14. Мещишен І.Ф. Глутатионова система організму за умов норми та патології: Актова промова. – Чернівці: Медакадемія, 1999. – 26 с.
15. Пентюк А.А., Мороз Л.В., Паламарчук О.В. Поражение печени ксенобиотиками // Совр. Пробл. токсикол. – 2002. – № 2. – С.8-16.
16. Скакун Н.П., Писько Г.Т., Мосейчук И.П. Поражение печени четыреххлористым углеродом: Обзорн. инфор. – М.: НИИТЭХИМ, 1989. – 106 с.
17. Тефтьюева Н.Б., Григор'ева Н.П. Вплив настоек перстачу прямостоячого на деякі показники оксидантного та антиоксидантного стану печінки щурів // Буковин. мед. вісник. – 2001. – **5**, № 2. – С. 193-196.
18. Beutler E. Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vitro and in vivo studies // J. Clin. Invest. – 1969. – **48**, № 11. – P. 1957-1965.
19. Gazikalovic E., Bodiroga M., Ognjanovic J. Odredivanje tanina u rizomu srcenjaka. Determination of tannins in the rhizomes of *Potentilla tormentilla* // Vojnosanitetski Pregled (Published in Serbo-Croatian, Roman). – 1992. – **49**, № 4. – P. 339-342.
20. Habig H.W., Pabst M.J., Jacoby W.B. Glutathione-S – Transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation // J. Biol. Chem. – 1974. – **249**, № 22. – P. 7130-7139.

## ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ КРЫС ПРИ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ И ДЕЙСТВИИ НАСТОЙКИ ЛАПЧАТКИ ПРЯМОСТОЯЧЕЙ

**Н.Б. Тефтьюева, И.Ф. Мещишен**

БУКОВИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

### Резюме

*Изучено эффективность применения настойки лапчатки прямостоячей (НЛП) при токсическом гепатите, вызванном тетрахлорметаном. НЛП вводили крысам внутривенно в дозе 0,1 мл /100 г веса на протяжении 14 дней. Исследование влияния НЛП на показатели оксидного и антиоксидного состояния крови животных проведено на 3-и, 7-е и 14-е сутки. Под воздействием настойки на 7-й день наблюдалось существенное снижение содержания в крови малонового диальдегида, а также молекулярных продуктов ПОЛ, которые содержат изолированные двойные связи, диеновые конъюгаты, кетодиены и сопряженные триены. Вместе с тем, происходила нормализация активности каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глутатионредуктазы и глутатионпероксидазы. Применение НЛП на*

протяженні 14 суток сприяло повній нормалізації вмісту в крові малонового діальдегіду та молекулярних продуктів ПОЛ, а також активності досліджуваних ферментів антиоксидантної захисти крові крис.

**КЛЮЧЕВІ СЛОВА:** настояшка лапчатки прямостоячей, перекисне окислення ліпідів, відновлений глутатіон, глутатіонпероксидаза, каталаза.

## LIPID PEROXIDATION AND THE STATE OF ANTIOXIDANT SYSTEM OF RAT BLOOD IN CASE OF TOXIC HEPATITIS UNDER EFFECT OF THE POTENTILLA ERECTA SPIRITUOUS TINCTURE

**N.B. Teftiuyeva, I.F. Meshchishen**  
BUCOVYNIAN STATE MEDICAL ACADEMY

### Summary

The efficacy of using the *Potentilla erecta* spirituous tincture under conditions of toxic hepatitis caused by tetrachlormethane was investigated. Tormentil tincture was administered intragastral at a dose of 0,1 ml/100g of the body weight for 14 days. Influence of tormentil tincture on the oxidative and antioxidative systems of rat blood has been studied on the 3-th, 7-th and 14-th days. The content of malonic aldehyde and endogenic lipids (isolated binary bonds, diene conjugates, ketodienes and conjugated trienes) decreased on the 7-th day after the injection of tormentil tincture. The activity of catalase, glucoso-6-phosphate dehydrogenase, glutathione reductase and glutathione peroxidase normalized on the 7-th day of the tincture introduction. Maximum effect of tinctura *Potentilla* on the intensity of the lipid peroxidation and the activity of basic antioxidants of blood was observed on the 14-th day of the experiment.

**KEY WORDS:** *Potentilla erecta* tincture, lipid peroxidation, reduced glutathione, glutathione peroxidase, catalase.

Отримано 09.06.2003 р.

Адреса для листування: І.Ф. Мещишен, кафедра медичної хімії, Буковинська державна медична академія, вул. Богомольця, 2, Чернівці, 58000, Україна.

### ВИДАВНИЦТВО "УКРМЕДКНИГА"

Передплатні видання Тернопільської державної  
медичної академії ім. І.Я. Горбачевського



"Медична хімія" – 22869;  
"Шпитальна хірургія" – 22810;  
"Вісник наукових досліджень" – 22866;  
"Вісник соціальної гігієни та організації охорони  
здоров'я України" – 22867;  
"Інфекційні хвороби" – 22868.

Наша адреса:

Видавництво "Укрмедкнига", майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001  
тел./факс (0352) 22-80-09; тел. 22-97-29

УДК 612.017.1:616.155

**ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ХОЛЕРИЧНОЇ І УРИКОЗОТРОПНОЇ ДІЙ НОВОГО ОЗДОРОВЧОГО НАПОЮ "ТРУСКАВЕЦЬКА КРИШТАЛЕВА, ЗБАГАЧЕНА АЛОЕ"**

**В.М. Філь**

*ДРОГОБИЦЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ПЕДАГОГІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА*

*В експерименті на щурах показано, що новий оздоровчий напій "Трускавецька кришталева, збагачена алое" проявляє властивості, які притаманні біоактивній воді "Нафтуся", все ж поступаючись останній.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** холерична і урикозотропна дії, оздоровчий напій "Трускавецька кришталева, збагачена алое", біоактивна вода "Нафтуся".

**ВСТУП.** УкрНДІ медичної реабілітації і курортології та науково-виробничим підприємством "Віспар" (Одеса) розроблено новий оздоровчий напій "Трускавецька кришталева, збагачена алое". За даними експериментів на щурах, він стимулює антитоксичну і холеричну функції печінки, діуретичну функцію нирок, запобігає стресовим пошкодженням слизової шлунка [5], тобто володіє низкою ефектів, притаманних біоактивній воді "Нафтуся" (БАВН). Тому цілком доречно провести кількісне порівняння бальнеоефектів обох об'єктів дослідження, розглядаючи "Нафтусю" як беззаперечний еталон.

Вплив БАВН на холерез вважають класичним проявом її бальнеоактивності. Як свідчать літературні дані [2], в експерименті з 24-денним курсовим навантаженням собак цією водою змінювались швидкість холерезу і склад жовчі. Зокрема, в першій половині курсу вміст води в жовчі збільшувався на 1 %, щільних речовин – знижувався; при цьому концентрація холатів зменшувалась на 16 %, Na – на 15 %, холестерину – на 7 %, тоді як рівень Са зростав на 23 %, білірубину – на 37 %. У другій половині курсу вміст холатів у жовчі на 49 % перевищував контрольний рівень, Na – на 10 %, холестерину – на 7 %, білірубину – на 83 %, Са – на 67 %. Через те, що швидкість холерезу зростала, екскреція перелічених компонентів жовчі зростала ще більшою мірою, ніж їх концентрація. Холато-холестериновий коефіцієнт жовчі знижувався з 91 в контролі до 82 на початку курсу, а потім підвищувався до 127.

© В.М. Філь, 2003.

Виявлено тісну кореляцію між швидкістю холерезу й екскрецією Na, секрецією холатів й екскрецією Са. За даними деяких авторів [3], у хронічному експерименті на щурах, на фоні збільшення швидкості холерезу, відповідно, на 11, 28, 30 %, відбувалось лише зростання холато-холестеринового коефіцієнта: через один тиждень – на 41 %, через два – на 25 %, через три – на 74 %.

Упродовж 2002-2003 рр. Б.І. Аксентійчук [1] розвивав концепцію про урикозотропну дію БАВН як ланку механізму її лікувальної дії.

Викладене дало нам підстави використати для порівняльної оцінки бальнеоактивності нового оздоровчого напою "Трускавецька кришталева, збагачена алое" (виробництва ЗАТ "Акваріус") холеричний і урикозотропний тести.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** В експерименті було задіяно 24 щури-самки лінії Wistar, з них 9 отримували щоденно впродовж 3 тижнів через зонд БАВН (св. 21-Н) в дозі 15 мл/кг при вільному доступі до цієї води, налитої в поїлки; 9 – приймали досліджуваний напій; решта 6 тварин становили контрольну групу, одержуючи за аналогічною схемою водопровідну воду. Після завершення курсу збирали добову сечу і брали пробу крові із хвоста. В обох біорідинах визначали концентрацію уратів і креатиніну, користуючись уніфікованими методиками. Потім під уретановим наркозом робили лапаротомію, канюлювали жовчовивідну протоку для збору жовчі і перфузували дуоденою-нальний відрізок тонкої кишки дистильованою



водою для визначення її абсорбції, як це описано раніше [3]. Після завершення 30-хвилинного гострого досліду щурів декапітували з метою забору печінки і перфузованої петлі тонкої кишки та їх зважування.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** У експерименті відтворено жовчогінну дію БАВН (табл. 1). Так, абсолютний холерез зростає на 58 %, а розрахований на 1 г печінки – на 46 %, що зумовлено тенденцією до збільшення її маси. Екскреція з жовчу холатів зростає на 96 (абсолютна) і 79 % (на 1 г печінки), що поліпшує травлення, екскреція холестерину – на 85 і 71 % відповідно, що сприяє підтриманню нормального його вмісту в плазмі. Разом із тим, холато-холестериновий коефіцієнт жовчі підвищується лише на 7 %, що відображає лише тенденцію до зниження її літогенності. Досліджуваний напій теж чинить холеретичний ефект, але

менш виражений. Так, швидкість жовчотоку досягає 94 (абсолютна) і 95 % (відносна) порівняно з еталоном, концентрація в жовчі холатів – 92 % за аналогічної концентрації холестерину, екскреція холатів – 85 і 86 %, холестерину – 94 і 95 %.

Швидкість абсорбції води в кишечнику вірогідно не змінюється в жодній дослідній групі порівняно з контрольною.

Обидві досліджувані рідини однаковою мірою збільшують добовий діурез і екскрецію з сечею уратів. Паралельно зростає екскреція креатиніну (табл. 2).

**ВИСНОВОК.** Наведені дані, разом із опублікованими раніше [4-8], свідчать про те, що вода "Трускавецька кришталева, збагачена алоє" характеризується низкою властивостей, притаманних біоактивній воді Нафтуса, все ж поступаючись останній.

Таблиця 1 – Порівняльне дослідження курсових ефектів на параметри холерезу і ентеральної абсорбції води у щурів

№ з/п	Група	Водопровідна вода	Вода "Трускавецька кришталева, збагачена алоє"	Вода "Нафтуса"
		(6)	(9)	(9)
1	Маса тіла, г	225±13	221±6	224±5
2	Маса печінки, г	6,17±0,20	6,56±0,16	6,64±0,14
3	Холерез, мкл/хв; мкл/хвг печінки	6,4±0,9	9,5±0,2*	10,1±0,5*
		1,04±0,14	1,45±0,05*	1,52±0,07*
4	Холестерин у жовчі, г/л	0,88±0,05	1,01±0,07	1,02±0,07
5	Холати у жовчі, г/л	7,35±0,36	8,27±0,57	8,98±0,63*
6	Холато-холестериновий коефіцієнт	8,48±0,44	8,36±0,63	9,06±0,80
7	Екскреція холестерину, мкг/хв; мкг/хвг печінки	5,5±0,6	9,6±0,7*	10,2±0,8*
		0,90±0,11	1,46±0,11*	1,54±0,12*
8	Екскреція холатів, мкг/хв; мкг/хвг печінки	46,5±5,7	77,7±4,2*	91,1±9,0*
		7,64±1,09	11,82±0,54*	13,68±1,26*
9	Ентеральна абсорбція води, мкл/хв·г кишки	28,7±4,5	27,9±4,6	27,2±3,4

Примітка. Тут і в наступній таблиці \* – вірогідні ефекти.

Таблиця 2 – Порівняльне дослідження курсових ефектів на параметри обміну уратів і креатиніну у щурів

№ з/п	Група	Водопровідна вода	Вода "Трускавецька кришталева, збагачена алоє"	Вода "Нафтуса"
		(6)	(9)	(9)
1	Маса тіла, г	225±13	221±6	224±5
2	Урикемія, мкМ/л	300±10	308±11	310±12
3	Креатинемія, мкМ/л	115±1	111±1	112±1
4	Діурез, мл/добу 100 г	2,5±0,5	3,9±0,4*	4,0±0,5*
5	Урати в сечі, мМ/л	1,33±0,12	1,28±0,16	1,25±0,16
6	Урикозурия, мкМ/добу 100 г	3,15±0,49	4,78±0,60*	4,79±0,61*
7	Креатинінурия, мкМ/добу 100 г	4,90±0,45	5,99±0,24*	5,94±0,25*

## ЛІТЕРАТУРА

1. Аксентійчук Б.І. Роль сечової кислоти у механізмах лікувально-профілактичної дії бальнеочинників курорту Трускавець // II Національний конгрес фізіотерапевтів та курортологів "Курортні природні ресурси та фізичні чинники в медичній реабілітації" (Слов'янськ, 12-13 листопада 2002 р.): Мед. реабіл., курортол., фізіотер. – 2002. – № 3 (дод.). – С. 165-168.
2. Есипенко Б.Е. Физиологическое действие минеральной воды "Нафтуся". – К.: Наук. думка, 1981. – 216 с.
3. Івасівка С.В., Попович І.Л., Аксентійчук Б.І., Білас В.Р. Природа бальнеочинників води "Нафтуся" і суть її лікувально-профілактичної дії. – Трускавець, 1999. – 125 с.
4. Ільницька-Рибчич Т.О. Порівняльне дослідження дії пляшкованої води "Трускавецька кришталева, збагачена алое" та біоактивної води "Нафтуся" на імунний статус ліквідаторів аварії на ЧАЕС // Укр. бальнеол. журн. – 2003. – № 2. – С. 66-70.
5. Соловійова В.П., Нікіпелова О.М., Сухіна Є.М. Новий оздоровлюючий напій – мінеральна вода "Трускавецька кришталева з екстрактом алое" // Укр. бальнеол. журн. – 2002. – № 3. – С. 37-39.
6. Філь В.М., Ільницька-Рибчич Т.О. Порівняльне дослідження бальнеоактивності нового оздоровлювального напою – "Трускавецька кришталева, збагачена алое" // Укр. бальнеол. журн. – 2003. – № 1. – С. 42-44.
7. Чебаненко О.І., Ільницька-Рибчич Т.О., Філь В.М. Перспективи використання пляшкованої води "Трускавецька кришталева, збагачена алое" для реабілітації осіб з екологічною імунодисфункцією // II Міжнар. наук.-практ. конф. "Ресурси природних вод Карпатського регіону" (Львів, 15-16 травня 2003 р.). – Львів, 2003. – С. 166-169.

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ХОЛЕРИТИЧЕСКОГО И УРИКОЗОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ НОВОГО ОЗДОРОВИТЕЛЬНОГО НАПИТКА "ТРУСКАВЕЦЬКА КРИШТАЛЕВА, ЗБАГАЧЕНА АЛОЕ"

**В.М. Філь**

*ДРОГОБЫЧСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. ИВАНА ФРАНКА*

### Резюме

*В эксперименте на крысах показано, что новый оздоровительный напиток Трускавецька кришталева, збагачена алое, оказывает холерический и урикозотропный эффекты, присущие биоактивной воде "Нафтуся", все же уступая последней.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** холерическое и урикозотропное действия, оздоровительный напиток "Трускавецька кришталева, збагачена алое", биоактивная вода "Нафтуся".

## COMPARATIVE INVESTIGATION OF CHOLERETIC AND URICOSOTROPIC EFFECT OF NEW CURATIVE DRINK WATER "TRUSKAVETSKA CRISTALINE, INRICHED WITH ALOE"

**V.M. Fil**

*DROHOBYCH STATE PEDAGOGICAL UNIVERSITY BY IVAN FRANKO*

### Summary

*It is shown in experiments on rats that curative drink water "Truskavetska cristaline, inriched with aloe" has choleretic and uricosotropic effect, simulates those ones of bioactive water "Naftussya" but less expressed.*

**KEY WORDS:** choleretic and uricosotropic effect of new curative drink water "Truskavetska cristaline, inriched with aloe", bioactive water "Naftussya".

*Отримано 31.10.2003 р.*

**Адреса для листування:** В.М. Філь, вул. В.Івасюка, 11, Трускавець, Львівська обл., 82200, Україна.

## ВПЛИВ НЕОПОЇДНИХ АНАЛГЕТИКІВ НА ВТОРИННУ ІМУННУ ВІДПОВІДЬ

Ю.М. Максимов, Ф.П. Трінус, В.Г. Аркадьєв, О.Є. Ядловський,  
З.П. Омеляненко, В.С. Хоменко, Т.В. Шатиркіна  
ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ

*У досліджах на білих мишах, імунізованих баранячими еритроцитами, показано, що парацетамол і новий неопіодний анальгетик піродазол не змінюють показників вторинної відповіді.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** парацетамол, піродазол, вторинна відповідь.

**ВСТУП.** Здоров'я людини в сучасному світі розглядається як один із найважливіших чинників соціально-економічного розвитку країни. Практична медицина часто стикається з захворюваннями дорослих і дітей, що супроводжуються болем та лихоманкою. На першому місці стоять гострі респіраторні захворювання, що викликаються вірусами, мікробами, найпростішими і їхніми асоціаціями і супроводжуються лихоманкою, запальними процесами тощо. Це і змушує лікарів призначати нестероїдні протизапальні лікарські засоби (НПЗЗ) як компонент терапії даних захворювань [1, 3]. Іншими причинами частого їх використання є біль (головний, суглобовий та ін.), захворювання опорно рухового апарату тощо [4]. НПЗЗ притаманний ряд побічних ефектів: уражують шлунково-кишковий тракт (виразкоутворення в шлунку), мають нефро- і гепатотоксичність, викликають агранулоцитоз, нерідко фатальний. Важливо те, що гастротоксичність може мати місце як при ентеральному, так і парентеральному шляху введення [5]. Упродовж останніх років почали з'являтися публікації про вплив НПЗЗ і на клітинну пам'ять [7]. Метою нашого дослідження було вивчити такий вплив.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Для вирішення питання щодо впливу НПЗЗ на вторинну імунну відповідь нами було відтворено класичну методику на білих нелінійних мишах з використанням тимусозалежного антигену еритроцитів барана (ЕБ). Первинну імунізацію проводили шляхом інтраперитонеального введення оптимальної дози ЕБ з розрахунку 0,2 мл на 20 г

маси тіла (106 еритроцитів) [2]. Повторну імунізацію здійснювали через 3 тижні. Щоб отримати більш чітке уявлення про процес антитілоутворення після первинної імунізації, було проведено два контрольних виміри титрів антитіл – на 13 та 20 доби. В експерименті використовували парацетамол та новий ненаркотичний анальгетик піродазол у дозах 1/10ЛД<sub>50</sub> (піродазол – 31,5 мг/кг та парацетамол – 88,8 мг/кг), які вводили один раз перорально чи один раз протягом трьох днів, що передувало введенню антигена. Як блокатор клітинної пам'яті застосовували скополамін у дозі 1 мг/кг внутрішньом'язово. Динаміку анальгезії вивчали на моделі "гаряча пластина" [6].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Імунну відповідь оцінювали за рівнем сироваткових імуноглобулінів, а також за масою тимуса та селезінки піддослідних тварин. Отримані результати оброблено статистично та наведено в таблиці 1.

Досліди показали, що вибрана схема імунізації чітко відтворює на білих мишах класичну картину вторинної імунної відповіді. Після піку титрів сироваткових антитіл на тимусозалежний антиген відмічалось природне зниження рівня як гемолізину, так і гемаглютеніну. Наступне (через 3 тижні) введення антигену призвело до швидкого посилення процесу антитілоутворення спостерігались вищі значення титрів антитіл (табл. 1).

При подальших дослідженнях модель вторинної імунної відповіді була використана нами для вивчення впливу НПЗЗ на імунну пам'ять. Парацетамол та піродазол в дозах 1/10ЛД<sub>50</sub> вводили один раз перорально чи один раз протягом трьох днів, що передувало введенню антигену. Умови проведення експери-

© Ю.М. Максимов – д.мед.н., проф., Ф.П. Трінус – д.мед.н., проф., чл.-кор. АМНУ та НАНУ, В.Г. Аркадьєв, О.Є. Ядловський – к.біол.н., З.П. Омеляненко – к.мед.н., В.С. Хоменко – к.мед.н., Т.В. Шатиркіна – к.мед.н., 2003.

менту збережено у усіх серіях досліду. До всіх дослідних груп ставили відповідний контроль вторинної імунної відповіді на інтактних тваринах.

Основною метою дослідів було визначити можливий негативний вплив досліджуваних НПЗЗ на функціональну здатність малих лімфоцитів (клітини пам'яті) за даними характеристики вторинної імунної відповіді.

Дані таблиці 2 свідчать про те, що парацетамол і піродазол, в умовах їх одно- чи триразового застосування до повторного введення антигену, не змінюють характеру вторинної імунної відповіді. Це підтверджується відсутністю статистично вірогідних змін маси лімфоїдних органів та титрів сироваткових антитіл у тварин піддослідних груп порівняно з контролем.

В окремій групі дослідів було вивчено можливий вплив скополаміну та комбінації його з парацетамолом безпосередньо перед другою імунізацією (табл. 3).

Отримані дані свідчать про те, що скополамін в дозі 1 мг/кг не змінює характеру вторинної імунної відповіді. Аналогічна картина спостерігається при застосуванні скополаміну разом із парацетамолом перед другою імуні-

зацією, тобто вторинна імунна відповідь за своєю інтенсивністю не відрізняється від показників контрольної групи.

Дослідження на білих нелінійних мишах з використанням тимусозалежного антигену свідчить про те, що як одно-, так і триразове застосування піродазолу або парацетамолу (1/10 ЛД<sub>50</sub>) не проявляє негативного впливу на імунну відповідь.

Для визначення впливу вторинної імунної відповіді нами було вивчено інтенсивність анальгезії парацетамолу та піродазолу на моделі "гаряча пластина" (табл. 4). Суттєвих змін в динаміці анальгезії парацетамолу та піродазолу не виявлено.

**ВИСНОВОК.** Дослідження на білих нелінійних мишах з використанням тимусозалежного антигену свідчать про те, що як одно-, так і триразове застосування піродазолу або парацетамолу (1/10 ЛД<sub>50</sub>) не змінює характеру вторинної імунної відповіді. Скополамін у дозі 1 мг/кг, як при самостійному застосуванні, так і в комбінації з парацетамолом, не впливає на показники вторинної імунної відповіді.

Таблиця 1 – Показники первинної та вторинної імунної відповіді у білих мишей, імунізованих еритроцитами барана (n=1)

Серії дослідів	Стат. показники	Маса селезінки		Маса тимуса		Антитіла, log <sub>2</sub>	
		абс., мг	%	абс., мг	%	гемолізину	гемаглютеніни
7-ма доба після первинної імунізації	M±m	100,0±9,3	0,64±0,05	21,0±3,4	0,12±0,02	11,4±0,6	6,4±0,3
13-та доба після первинної імунізації	M±m	121,4±14,2	0,56±0,08	39,0±7,6	0,16±0,02	10,1±0,6	6,1±0,6
20-та доба після первинної імунізації	M±m	200,0±27,5	0,86±0,1	37,0±4,4	0,15±0,02	7,4±0,8	4,00±0,17
7-ма доба після повторної імунізації	M±m	213,8±23,0*	0,84±0,07	34,2±2,4*	0,14±0,07	16,80±0,65*	14,0±0,6*

Примітка. \* – p<0,05 відносно первинної імунної відповіді.

Таблиця 2 – Вплив парацетамолу та піродазолу на вторинну імунну відповідь у білих мишей

Серії дослідів	Стат. показники	Маса селезінки		Маса тимуса		Антитіла, log <sub>2</sub>	
		абс., мг	%	абс., мг	%	гемолізину	гемаглютеніни
Контроль, інтактні тварини	M±m	245,0±7,0	1,40±0,20	42,0±4,5	0,22±0,01	16,4±0,6	13,4±0,4
Парацетамол (одноразово)	M±m	226,0±7,4	1,10±0,40	50,0±3,8	0,25±0,05	14,5±0,5	12,0±0,5
Парацетамол (триразово)	M±m	200,0±17,4	0,72±0,06	47,0±3,1	0,21±0,01	15,5±0,5	14,0±0,40
Контроль, інтактні тварини	M±m	140,5±12,1	0,70±0,10	52,3±5,5	0,25±0,01	15,00±0,33	13,0±0,5
Піродазол (одноразово)	M±m	152,0±7,0	0,08±0,30	46,2±6,8	0,24±0,04	13,8±0,5	13,0±0,5
Піродазол (триразово)	M±m	137,3±13,4	0,62±0,07	47,3±3,7	0,21±0,01	15,1±0,6	14,3±0,8

Таблиця 3 – Вплив скополаміну на вторинну імунну відповідь у білих мишей, які отримували парацетамол (n=10)

Серії дослідів	Стат. показники	Маса селезінки		Маса тимуса		Антитіла, log <sub>2</sub>	
		абс., мг	%	абс., мг	%	гемолізину	гемаглютеніни
Контроль, інтактні тварини	M±m	204,0±18,0	0,89±0,11	38,0±5,0	0,16±0,01	14,8±1,1	13,3±0,5
Парацетамол (одноразово)	M±m	146,0±19,1	0,81±0,14	23,0±3,7	0,12±0,01	13,3±1,2	13,1±0,2
Скополамін	M±m	209,0±24,0	0,97±0,10	27,8±7,8	0,11±0,04	13,4±1,6	11,0±1,5
Скополамін+парацетамол	M±m	225,0±32,5	1,00±0,11	34,3±5,8	0,15±0,02	14,8±0,7	11,6±1,2

Таблиця 4 – Динаміка аналгезії парацетамолу (внутрішньошлункове введення мишам у дозі 110 мг/кг) на моделі "гаряча пластина" (n=5)

Препарат	Одиниці виміру	Вихідні дані	Час після введення, хв			
			30	60	90	120
Парацетамол	с	15,90±0,86	21,3±1,24	19,4±1,27	18,4±1,11	15,6±0,96
Латентний період	%		32,05	22,00	15,7	4,2
Парацетамол+ повторна імунізація	с	17,26±0,83	22,02±1,40	21,54±0,86	20,58±0,93	19,74±1,00
Латентний період	%		27,6	24,8	19,3	14,3
Парацетамол+ скополамін	с	16,62±0,78	22,24±0,70	21,26±1,31	20,94±0,53	18,04±0,48
Латентний період	%		33,8	30,6	25,9	8,05
Піродазол	с	14,91±1,21	36,68±5,24	34,14±2,10	47,8±6,10	27,20±2,35
Латентний період	%		146,05	129,00	220,7	82,5
Піродазол+ повторна імунізація	с	17,00±0,93	31,30±4,06	38,8±5,6	40,62±7,09	37,85±5,95
Латентний період	%		84,6	128,8	138,3	122,3

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Сигидин А.Я., Шварц Г.Я., Арзамасцев А.П., Либерман С.С. Лекарственная терапия воспалительного процесса. – М.: Медицина, 1988. – 240 с.
2. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів // Методичні рекомендації. – К.: Авіценна, 2001. – 528 с.
3. Тринус Ф.П. Фармакотерапевтический справочник. – К.: Здоров'я, 1998. – 880 с.
4. Тринус Ф.П., Клебанов Б.М., Ганджа И.М., Сейфулла Р.Д. Фармакологическая регуляция воспаления. – К.: Здоров'я, 1987. – 144 с.
5. Ackerman Z., Flugelman M.Y., Wax Y. et al. Hepatitis during measles in young adults: possible role of antipyretic drugs // Hepatology. – 1989. – **10**, № 2. – P. 203-206.
6. Komlos E., Porsresr J., Knole J. Morfin-prostigmin synergismus // Az. Acta. Physiol. Acad. Scient. Hungaricae. – 1950. – № 1. – P. 77-83.
7. Lopez-Armanda M.J., Sanches-Pernaute O., Largo R. et al. Modulation of cell recruitment by anti-inflammatory agents in antigen-induced arthritis // Ann. Rheum. Diseases. – 2002. – **61**, № 11. – P. 1027-1030.

## ВЛИЯНИЕ НЕОПИОИДНЫХ АНАЛГЕТИКОВ НА ВТОРИЧНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

**Ю.М. Максимов, Ф.П. Тринус, В.Г. Аркадьев, О.Е. Ядловский, З.П. Омеляненко, В.С. Хоменко, Т.В. Шатыркина**  
ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ

#### Резюме

*В опытах на белых мышах, иммунизированных бараньими эритроцитами, показано, что парацетамол и новый неопиоидный анальгетик пиродазол не изменяют показателей вторичного иммунного ответа.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** парацетамол, пиродазол, вторичный иммунный ответ.

## INFLUENCE OF NONOPIOID ANALGETICS ON THE SECONDARY IMMUNE RESPONSE

**Yu.M. Maxymov, F.P. Trinus, V.G. Arkadiyev, O.Ye. Yadlovsky, Z.P. Omelianenko, V.S. Khomenko, T.V. Shatyrykina**  
INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF AMS OF UKRAINE

#### Summary

*In experiments on white mice to be immunized by mutton erythrocytes it was shown that paracetamol and new nonopioid analgetic pirodazol don't change the indices of the secondary immune response.*

**KEY WORDS:** paracetamol, pirodazol, secondary response.

Отримано 28.10.2003 р.

Адреса для листування: О.Е. Ядловський, ІФТ АМНУ, вул. Е.Потьє, 14, Київ-57, 03057, Україна.

## ВПЛИВ ПОВНОГО ГОЛОДУВАННЯ НА ВМІСТ ПРОДУКТІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ І СТАН АНТИОКСИДНОЇ СИСТЕМИ НА ФОНІ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОГО ГЕПАТОЗУ

О.І. Кузів

ТЕРНОПІЛЬСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ІМ. І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

*Встановлено, що ураження печінки білих щурів тетрахлорметаном супроводжується різкою активацією процесів перекисного окиснення ліпідів і пригніченням компонентів системи антиоксидного захисту. Утримання тварин з тетрахлорметановим гепатозом на повному голодуванні призводило до нормалізації порушеного співвідношення між процесами пероксидації та антиоксидного захисту.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** повне голодування, тетрахлорметановий гепатоз, перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантний захист.

**ВСТУП.** Проблема токсичних гепатопатій, незважаючи на значні успіхи сучасної теоретичної та практичної гепатології, залишається вельми актуальною. Це зумовлено значним забрудненням довкілля, продуктів харчування, зростанням хімічної промисловості, хімізацією побуту, застосуванням, нерідко безконтрольним, лікарських засобів, які мають гепатотоксичну дію [4, 10]. У зв'язку із цим, пошук і використання ефективних методів лікування токсичних уражень печінки є одним із важливих завдань медицини. Згідно із сучасними уявленнями, патологічний процес, який має місце за дії ксенобіотиків, характеризується порушенням морфо-функціонального стану мембран гепатоцитів, що викликає дискоординацію діяльності ензимних систем. Більшість науковців вважає, що ключову роль у дезорганізації ультраструктури мембран відіграє активація вільнорадикальних процесів, яка є наслідком безпосереднього впливу ксенобіотиків на мембранні структури або утворених у результаті їх біотрансформації токсичних метаболітів, здатних активувати процеси вільнорадикального окиснення [3, 7, 8, 20].

Метою роботи було вивчити вплив повного голодування на процеси вільнорадикального окиснення і систему антиоксидного захисту при тетрахлорметановому гепатозі.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди проведено на 63 білих безпородних щурах-самцях  
© О.І. Кузів, 2003.

масою 150-180 г. Токсичний гепатоз викликали шляхом підшкірного введення 50 % тетрахлорметану в дозі 2 г/кг маси. Щурів із токсичним гепатозом утримували на звичайному раціоні віварію. Тварин із тетрахлорметановим гепатозом, які перебували на повному голодуванні, розміщували по одній в клітці з вільним доступом до води. Щурів поділили на три групи: 1-ша – інтактні, 2-га – контроль (тетрахлорметановий гепатоз), 3-тя – тетрахлорметановий гепатоз + повне голодування на воді. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом на 1, 3, 7 і 14 доби (7 доба відновного харчування). Досліджували плазму крові і тканину печінки.

Інтенсивність вільнорадикальних процесів визначали за рівнем малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів [19], а систему антиоксидантного захисту оцінювали за активністю каталази [13], вмістом церулоплазміну [1] і відновленого глутатіону [18].

Експериментальні дані опрацьовані статистичним методом з використанням комп'ютерної програми Excel на PC Pentium II.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Результати експерименту подано в таблиці 1. Як видно з наведених у ній показників, гостре отруєння тетрахлорметаном викликало різку активацію процесів вільнорадикального окиснення, при цьому максимальний рівень продуктів пероксидації зареєстровано на 7-му добу дослідження (в плазмі крові вміст малонового діальдегіду

підвищився до 338 %, у печінці – до 446 % проти даних інтактних тварин, рівень дієнових кон'югатів склав, відповідно, 272 і 203 %). Зазначену активацію перекисного окиснення ліпідів при введенні тетрахлорметану можна пояснити агресивною дією метаболітів отрути, які утворюються як побічні продукти за біотрансформації його в гладенькій ендоплазматичній сітці гепатоцитів [12, 14, 15, 17, 21, 22].

Застосування повного голодування в отруєних тетрахлорметаном тварин спричиняло суттєве пригнічення реакцій ліпопереокиснення як у плазмі крові, так і в тканині печінки протягом усього експерименту, починаючи уже з 1-ї доби. Зниження рівня малонового діальдегіду та дієнових кон'югатів, з одного боку, найбільш вірогідно зумовлене відсутністю речовин, які є джерелом пероксидації (немає екзогенного надходження харчових продуктів), а з іншого – повне голодування, як доведено морфологічними дослідженнями [16], викликає підвищення функціональної активності зірчастих макрофагів – клітин Купфера, які мають здатність пригнічувати активність цитохром Р450-залежних монооксигеназ і достатньо ефективно регулювати процеси пероксидації [2, 5, 9].

Як випливає із даних таблиці 1, ураження тетрахлорметаном супроводжувалося і пору-

шенням з боку антиоксидної системи. Так, рівень каталази в плазмі крові зазнавав фазних змін, підвищуючись до 7-ї доби експерименту і різко знижуючись на 14-й день. Проте вміст каталази і відновленого глутатіону в гомогенаті печінки перебував у зворотній залежності від інтенсивності перекисного окиснення ліпідів, досягаючи мінімальних значень на 7-му добу експерименту (відповідно, 41 і 62 % проти інтактних тварин). Таке пригнічення активності ферменту каталази та відновленого глутатіону, напевно, зумовлене їх виснаженням внаслідок підвищеного використання та пригнічення інтенсифікованих процесів пероксидації, а також зниженням їх синтезу в результаті деструкції пероксисом і дегрануляції та альтерації гранулярної ендоплазматичної сітки гепатоцитів вільними радикалами.

Повне голодування тварин із тетрахлорметановим гепатозом сприяло покращанню показників системи антиоксидного захисту (табл. 1). Так, знизився рівень каталази в плазмі крові, статистично достовірно зросла її активність і відновленого глутатіону в тканині печінки.

Як відомо, ефективним антиоксидним ферментом плазми крові є також церулоплазмін. Ми, як і інші автори [6, 7, 10, 11], зареєстрували зростання активності церулоплазміну в усі

Таблиця 1 – Вплив повного голодування на показники вмісту продуктів пероксидації і стан антиоксидної системи в динаміці тетрахлорметанового гепатозу (M±m)

Показник	Об'єкт дослідження	Інтактні тварини	Термін експерименту, доба							
			1		3		7		14	7 відновн.
			CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> +повне голодування	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> +повне голодування	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> +повне голодування	CCl <sub>4</sub>	CCl <sub>4</sub> +повне голодування
Малановий діальдегід	плазма, мкмоль/л	5,01±0,14	8,11±0,21**	5,51±0,11*	14,85±0,14**	12,45±0,27**	16,93±0,19**	10,97±0,21**	13,10±0,91**	5,34±0,33
	печінка, мкмоль/кг	47,62±0,41	81,91±1,01**	57,65±1,06**	157,15±1,17**	134,77±1,09**	217,01±1,25**	99,31±1,17**	121,03±1,19**	48,72±1,21
Дієнові кон'югати	плазма, x10 <sup>3</sup> ум. од./л	1,81±0,05	2,21±0,18	1,32±0,03	4,92±0,26**	3,00±0,03**	5,10±0,32**	2,63±0,11**	3,71±0,39**	2,10±0,15
	печінка, x10 <sup>3</sup> ум. од./кг	5,87±0,19	6,37±0,13	3,61±0,09**	11,90±0,01**	9,26±0,07**	14,97±1,01**	9,85±0,71**	12,96±0,91**	6,06±0,39
Каталаза	плазма, кат/л	0,210±0,001	0,27±0,03**	0,25±0,01	0,25±0,07	0,22±0,03	0,30±0,09	0,26±0,07	0,14±0,03*	0,20±0,03
	печінка, кат/кг	6,62±0,07	5,48±0,11*	6,00±0,21	3,71±0,12**	4,73±0,11**	2,69±0,02**	5,99±0,15	4,37±0,19**	6,71±0,37
Церулоплазмін	плазма, г/л	0,23±0,01	0,27±0,04	0,26±0,03	0,32±0,02*	0,32±0,06*	0,36±0,07*	0,30±0,12*	0,31±0,05*	0,24±0,07
Відновлений глутатіон	печінка, мкмоль/кг	3,51±0,31	2,71±0,27	3,07±0,09	2,31±0,13*	2,79±0,11*	2,17±0,19*	3,21±0,11	2,74±0,10*	3,49±0,17

Примітка. Різниця достовірна відносно інтактних тварин: \* – p<0,05, \*\* – p<0,001.

періоди спостереження за тетрахлорметанового гепатозу, що може бути зумовлено підвищеним надходженням ензиму в плазму крові внаслідок некрозу гепатоцитів, а також компенсаторною активацією його синтезу гепатоцитами [6, 7]. Повне голодування призводило до нормалізації активності даного ферменту лише в період відновного харчування.

Отримані результати розширюють уявлення про механізми коригувальної дії повного голодування при отруєннях ксенобіотиками, які здатні гальмувати процеси перекисного окиснення ліпідів.

**ВИСНОВКИ.** 1. Повне голодування є ефективним і патогенетично обґрунтованим засобом корекції тетрахлорметанового гепатозу.

2. Ефективність впливу повного голодування при тетрахлорметановому гепатозі проявляється зниженням вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів і нормалізацією системи антиоксидного захисту.

3. Простота, доступність і висока ефективність повного голодування дозволяє вважати за доцільне подальше експериментальне вивчення його для обґрунтування його застосування за токсичного ураження печінки ксенобіотиками.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Бестужева С.В., Колб В.Г. Справочник по клинической химии. – Минск, 1982. – С. 290-291.
2. Венгеровский А.И., Батурина Н.О., Саратиков А.С. Гепатопротекторные механизмы действия простагландина E // Эксперим. и клинич. фармакол. – 1997. – **60**. – С. 78-82.
3. Владимирюв Ю.А. Свободные радикалы и антиоксиданты // Вестн. Рос. АМН. – 1998. – № 7. – С. 43-51.
4. Возианов Ж.И. Вирусные гепатиты // Лікування та діагностика. – 1997. – № 1. – С. 33-37.
5. Головенко Н.Я. Некоторые аспекты биохимии, молекулярной биологии и генетики цитохрома P-450 // Современные проблемы токсикологии. – 2001. – № 3. – С. 17-23.
6. Гонский Я.И., Корда М.М., Клищ И.Н. Влияние энтеросорбции на перекисное окисление липидов и антиоксидантную систему при экспериментальном токсическом гепатите // Эксперим. и клинич. медицина. – 1991. – **31**, № 2. – С. 184-188.
7. Гонский Я.И., Корда М.М., Клищ И.Н., Фира Л.С. Роль антиоксидантной системы в патогенезе токсического гепатита // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 1996. – № 2. – С. 43-45.
8. Гонський Я.І., Підручна С.Р. Вікові особливості вмісту продуктів ПОЛ у крові та гомогенаті печінки здорових і уражених  $CCl_4$  тварин // Актуальні проблеми морфології. – Тернопіль, 1996. – С. 182.
9. Гордієнко А.Д., Левченко В.В., Сморошова Н.Б. Вплив нового комбінованого фосфоліпідного гепатопротектора ліпофену на процеси фіброзотворення в печінці щурів при хронічному гепатиті // Одес. мед. журн. – 2002. – № 2 (70). – С. 6-8.
10. Губский Ю.И. Коррекция химического поражения печени. – К.: Здоров'я, 1989. – 168 с.
11. Джалалов А.Д., Максимов В.А. Диагностическая ценность определения церулоплазмينا и

трансферина при некоторых острых и хронических заболеваниях печени // Тер. архив. – 1982. – № 2. – С. 57-59.

12. Клищ І.М. Особливості перебігу окисно-відновних процесів у печінці щурів різного віку за токсичного ураження тетрахлорметаном // Укр. біохім. журн. – 1998. – **70**, № 6. – С. 106-112.

13. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.

14. Костюк В.А. Роль ковалентного связывания и перекисного окисления липидов в повреждении печени четыреххлористым углеродом // Биохимия. – 1991. – **56**, вып. 10. – С. 1878-1885.

15. Костюк В.А., Потапович А.И., Маслова Г.Т. Состояние антиокислительной системы печени крыс при воздействии четыреххлористого углерода // Укр. биохим. журн. – 1992. – **64**, № 3. – С. 111-115.

16. Кузів О.І. Зміна морфології гепатоцитів і клітин Купфера за харчової депривації // Матеріали VII Міжнародного конгресу студентів і молодих вчених. – Тернопіль, 2003. – С. 229.

17. Кузів О.І., Дмитренко О.В., Дацко Т.В. Морфологічні зміни в печінці за токсичного гепатиту // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. – Вип. 7. – С. 153.

18. Мещишен И.Ф., Петрова И.В. Окисление и восстановление глутатиона в органах крыс при введении этония // Укр. биохим. журн. – 1983. – **55**, № 5. – С. 571-573.

19. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1971. – С. 66-68.

20. Goel M.R., Shara M.A., Stohs S.J. Induction of lipid peroxidation by hexachlorocyclohexane, carbon tetrachloride and hexachlorobenzene in rats // Bull.



Environ. Contam. and Toxicol. – 1988. – **40**, № 2. – P. 255-262.

21. Sandhir R., Gill K.D. Effect of lead on lipid peroxidation in liver of rats // Biol. Trace. Elem. Res. – 1995. – **48**, № 1. – P. 91-97.

22. Hepatic function in workers occupationally exposed to carbon tetrachloride / Tomenson J., Baron C., O'Sullivan et al. // Occupational and Environmental Medicine. – 1995. – **52**, № 8. – P. 508-514.

## **ВЛИЯНИЕ ПОЛНОГО ГОЛОДАНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДНОЙ СИСТЕМЫ НА ФОНЕ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОВОГО ГЕПАТОЗА**

**О.И. Кузів**

ТЕРНОПОЛЬСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМ. И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

### **Резюме**

Установлено, что поражение печени белых крыс тетрахлорметаном сопровождается резкой активацией процессов перекисного окисления липидов и угнетением компонентов системы антиоксидантной защиты. Содержание животных с тетрахлорметановым гепатозом на полном голодании приводило к нормализации нарушенного соотношения между процессами пероксидации и антиоксидантной защиты.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** полное голодание, тетрахлорметановый гепатоз, перекисное окисление липидов, антиоксидантная защита.

## **EFFECT OF COMPLETE FASTING ON CONTENT OF LIPID PEROXIDATION PRODUCTS AND STATE OF ANTIOXIDANT SYSTEM AGAINST A BACKGROUND OF TETRACHLOROMETHANE HEPATOSIS**

**O.I. Kuziv**

TERNOPIL STATE MEDICAL ACADEMY BY I.YA. HORBACHEVSKY

### **Summary**

The liver damage by  $CCl_4$  in albino rats was followed by a drastic activation of lipid peroxidation processes and suppression of most components of the antioxidant system. The administration of complete fasting to the affected animals exerted the positive effect which manifested itself in a decrease of lipid peroxidation products content in the blood plasma and liver and in the partial normalization of the antioxidant protection system.

**KEY WORDS:** complete fasting, tetrachloromethane hepatitis, lipid peroxidation, antioxidant protection.

Отримано 15.12.2003 р.

Адреса для листування: О.І. Кузів, вул. Олени Кульчицької, 1, кв. 5, Тернопіль, 46000, Україна.

СОЛІ ТА МЕТАЛОКОМПЛЕКСИ НА ОСНОВІ ЗАМІЩЕНИХ  
3,5-ДИНІТРО-N-ФЕНІЛАНТРАНІЛОВИХ КИСЛОТ, ЇХ СИНТЕЗ  
ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬЛ.В. Ярцева, О.М. Свечнікова, С.Г. Ісаєв, Н.Ю. Бевз, Н.Ю. Шевельова  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Здійснено синтез нових похідних 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот, їх мідних комплексів та солей на основі 2,5-динітро-4-метил-9-аміноакридину. Будову 14 синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу та ІЧ-спектрів. Чистоту контролювали методом тонкошарової хроматографії. Встановлено, що синтезовані речовини проявляють бактеріостатичну, фунгістатичну, протизапальну, аналгетичну, жовчогінну активність. Мідні комплекси 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот та 3,5-динітро-N-фенілантранілати 2,5-динітро-4-метил-9-аміноакридинію, за класифікацією К.К. Сидорова, належать до класу малотоксичних речовин.

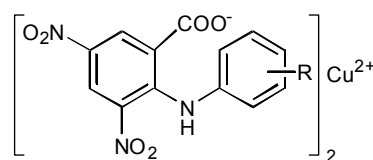
КЛЮЧОВІ СЛОВА: N-фенілантранілові кислоти, мідні комплекси, солі 9-аміноакридину, фармакологічний скринінг.

ВСТУП. Як реальна альтернатива сполукам молекулярної будови для пошуку біологічно активних сполук є синтез нових речовин катіонно-аніонного характеру саме комплексів біметалів з лігандами похідних N-фенілантранілових кислот. Ця концепція підтверджена працями вчених України при створенні нових БАС на основі нестероїдних протизапальних субстанцій та амінопохідних ароматичних карбонових кислот [1, 2, 4-10]. На основі вищенаведеного як об'єкт досліджень нами було обрано похідні 3,5-динітро-N-фенілантранілової кислоти: її мідні комплекси та солі 2,5-динітро-4-метил-9-аміноакридинію.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Мідні комплекси 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот (I-VIII) та 3,5-динітро-N-фенілантранілати 2,5-динітро-4-метил-9-аміноакридинію (IX-XIV) синтезовано на кафедрах аналітичної та фармацевтичної хімії Національного фармацевтичного університету. Мідні комплекси N-ФАК (I-VIII) одержано при взаємодії відповідних калієвих солей з сульфатом міді [6], а солі 9-аміноакридинію (IX-XIV) – згідно з методикою [9].

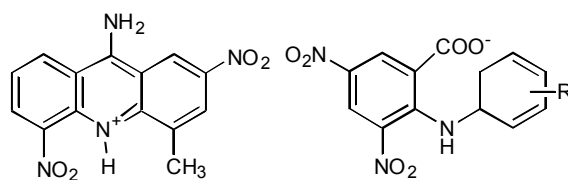
© Л.В. Ярцева, О.М. Свечнікова – д.хім.н., проф., С.Г. Ісаєв – к.фарм.н., Н.Ю. Бевз – к.фарм.н., Н.Ю. Шевельова – к.біол.н., 2003.

Будову та чистоту нових сполук (I-VIII) (рис. 1) підтверджено даними елементного, ІЧ-спектрального та хроматографічного аналізу.



I-VIII

- |                               |                |
|-------------------------------|----------------|
| I – R=2'-OCH <sub>3</sub> ;   | V – R=2'-Cl;   |
| II – R=3'-OCH <sub>3</sub> ;  | VI – R=4'-Cl;  |
| III – R=4'-OCH <sub>3</sub> ; | VII – R=3'-I;  |
| IV – R=4'-Br;                 | VIII – R=4'-I; |



IX-XIV

- |               |  |
|---------------|--|
| IX – R=2'-Cl; | XII – R=4'-OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ;        |
| X – R=3'-Cl;  | XIII – R=2'-CH <sub>3</sub> ; 4'-NO <sub>2</sub> ; |
| XI – R=4'-Cl; | XIV – R=2'-CH <sub>3</sub> ; 6'-NO <sub>2</sub>    |

Рис. 1. Мідні комплекси 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот (I-VIII) та 3,5-динітро-N-фенілантранілати 2,5-динітро-4-метил-9-аміноакридинію (IX-XIV).

Гостру токсичність синтезованих речовин ( $DL_{50}$ ) вивчали вибірково (II, IV, IX, XII, XIII) при внутрішньошлунковому їх введенні білим мишам за методом [3]. Бактеріостатичну дію – порівняно з етакридину лактатом. Для вирощування грибів використовували середовище Сабуро (рН-6,5-6,7). Навантаження становило 500 тис. репродуктивних тілець в 1 мл.

Вивчення жовчогінної дії речовин (II,V) проводили на інтактних щурах за методом Н.П. Скакуна, Д.Н. Олейника [3] у дозі 150 мг/кг.

Протизапальну активність вивчали на моделі карагенінового набряку в мишей. Тваринам вводили досліджувані сполуки перорально у дозі 25 мг/кг. Референс-препаратами були мефенамова кислота та вольтарен.

Аналгетичну активність вивчали на білих щурах [3]. Показником аналгезивної дії був час (с), протягом якого тварини витримували теплової опік шкіри хвоста при температурі 100 °С. Зазначений час реєстрували автоматично. Сполуки (I, II, IV, V) вводили внутрішньошлунково в дозі 20 мг/кг. Вивчали аналгетичну активність порівняно з анальгіном.

**РЕЗУЛЬТАТИ й ОБГОВОРЕННЯ.** За класифікацією К.К. Сидорова, мідні комплекси 3,5-динітро-N-феніл-антранілових кислот (I-VIII) і динітро-N-фенілантранілати 9-аміноакридинію (IX-XIV) при внутрішньошлунковому введенні належать до малотоксичних сполук, їх  $DL_{50} > 2000-2500$  мг/кг. Показано, що введення

Таблиця 1 – Біологічна активність похідних 3,5-динітро-M-фенілантранілових кислот

Сполука	$DL_{50}$ , мг/кг	Бактеріостатична*, МПК (мкг/мл)								Фунгістатична**, МПК (мкг/мл)		Протизапальна, % у дозі 25 мг/кг	Аналгетична, % у дозі 20 мг/кг	Жовчогінна, % у дозі 150 мг/кг
		1	2	3	4	5	6	7	8	1	2			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
I	-	250	500	250	-	-	-	-	-	-	-	-	32,6	-
II	>2500	250	250	250	250	-	-	-	-	-	-	-	0	35,9
III	-	250	250	250	250	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	>2500	62,5	125	125	125	-	-	-	-	-	-	25,6	22,4	-
V	-	62,5	125	125	125	-	-	-	-	-	-	32,1	20,2	25,6
VI	>2500	125	125	125	125	-	-	-	-	-	-	36,2	-	-
VII	-	62,5	125	125	125	-	-	-	-	-	-	20,0	-	-
VIII	-	62,5	125	125	125	-	-	-	-	-	-	12,3	-	-
IX	>2500	62,5	15,6	31,2	62,5	125	62,5	125	125	62,5	125	3,6	-	-
X	-	62,5	15,6	31,2	62,5	62,5	62,5	125	62,5	125	62,5	-	-	-
XI		31,2	15,6	15,6	62,5	62,5	62,5	125	250	62,5	62,5	-	-	-
XII	>2500	31,2	31,2	15,6	125	250	125	125	125	250	500	18,2	-	-
XIII	>2500	15,6	31,2	31,2	62,5	250	250	125	62,5	500	125	-	-	-
XIV	-	15,6	31,2	31,2	125	250	250	125	125	62,5	500	22,4	-	-
Етакридину лактат	21***	31,2	15,6	31,2	62,5	125	125	125	125	-	-	-	-	-
Мефенамова кислота	628	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30,0	-	-
Вольтарен	363	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37,5 (DE <sub>50</sub> )	-	-
Анальгін	1197	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55,0 (DE <sub>50</sub> )	-
Оксафенамід (у дозі 150 мг/кг)	4000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	59

Примітки: 1.\* – Як тест-мікроорганізми використовували: 1) *Staphylococcus aureus*; 2) *Bacillus subtilis*; 3) *Esherichia coli*; 4) *Pseudomonas aeruginosa*; 5) *Salmonella choleraesuis*; 6) *Salmonella dublin*; 7) *Salmonella thyphimurium*; 8) *Salmonella thyphisuis*.

2.\*\* – Як тест-гриби використовували: 1) *Candida albicans*; 2) *Candida triadis*.

3.\*\*\* –  $DL_{50}$  використовували при внутрішньочеревному введенні.

як аніонної частини фрагмента N-ФАК до складу солі акридину сприяє зменшенню токсичності. Як і очікувалось, мідні комплекси 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот менш токсичні, ніж вихідні кислоти (табл. 1).

Аналіз мікробіологічних досліджень показав, що мідні комплекси N-ФАК (I-VIII) проявляють слабку бактеріостатичну активність (МПК=62-500 мкг/мл). Слід відзначити, що введення до складу солі 2,5-динітро-4-метил-9-аміноакридину значно сприяє підвищенню антимікробної дії. Солі (IX-XVI) проявляють бактеріостатичну активність у таких концентраціях: щодо мікроорганізмів роду *Salmonella* – 62,5-500,0 мкг/мл, золотистого стафілокока – 15,6-31,2 мкг/мл, сінної та кишкової паличок – 15,6-31,2 мкг/мл, синьогнійної палички – 62,5-125,0 мкг/мл. Для сполук (IX-XIV) характерна протигрибкова дія в концентрації 62,5-500,0 мкг/мл відносно *Candida albicans*, *Candida triadis*.

Фармакологічний скринінг на протизапальну активність у дозі 25 мкг/кг виявив два мідних комплекси (V-VI) 3,5-динітро-N-фенілантранілової кислоти на рівні мефенамової кислоти. Ця група похідних також проявляє слабкий анагетичний та жовчогінний ефект. Всупереч прогнозу, протизапальна й анагетична активність мідних комплексів незначно відрізняється від активності вихідних кислот, а у деяких випадках навіть нижча.

**ВИСНОВОК.** Здійснено синтез мідних комплексів 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот та солей на основі вищенаведених кислот і 2,5-динітро-4-метил-9-аміноакридину, встановлено їх будову, досліджено бактеріостатичну та жовчогінну активність. Також виявлено деякі закономірності зв'язку "структура-протизапальна-аналгетична-бактеріостатична активність-токсичність".

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Бризицький О.А., Ісаєв С.Г., Свечнікова О.М. та ін. Бензоати 6,9-діаміно-2-етоксиакридинію, їх синтез та біологічна активність // Мед. хім. – 2002. – **4**, № 2. – С. 43-46.
2. Волянський Ю.Л., Крестецько С.Л. Перспективи створення протимікробних препаратів на основі акридину і фенантридину // Мед. хім. – 2002. – **4**, № 3. – С. 92-98.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
4. Ісаєв С.Г., Волкова Н.О., Алексеева Т.В. та ін. Біологічна активність нових похідних 5-нітро-9-N-R-аміноакридину // Ліки. – 2001. – № 5/6. – С. 86-88.
5. Ісаєв С.Г., Кобзар Н.П., Павлій О.І. та ін. Біологічна активність калієвих солей 3,5-динітро- та 5-бромсульфамойл-N-фенілантранілових кислот // Мед. хім. – 2002. – **4**, № 3. – С. 63-65.
6. Ісаєв С.Г., Павлій А.И., Еремина З.Г. и др. Синтез и биологическая активность медных комплексов 3-нитро-N-фенилантраниловых кислот // Лекарства – человеку. – 2001. – **15**, № 1/2. – С. 216-220.
7. Ісаєв С.Г., Яременко В.Д., Садова Л.В. Получение, физико-химические свойства и биологическая активность гидразидов 3-нитро-N-фенилантраниловых кислот и 5-нитро-9-N-ариламинопроизводных акридина // Лекарства – человеку. – 2000. – **12**, № 1. – С. 59-64.
8. Павлій О.О., Ісаєв С.Г., Бевз Н.Ю. та ін. Фармакологічна активність 4-карбоксималонанілатів та адипінатів заміщених 9-аміноакридинію // Ліки. – 2002. – № 1/2. – С. 34-37.
9. Пат. № 48689А Україна, МПК С 07 Д 219/08, А 61 К 31/435. 6,9-діаміно-2-етоксиакридинію 3,5-динітро-N-(4(-етоксифеніл)антранілат, що проявляє антимікробну, протизапальну, анагетичну, діуретичну активність та потенціюючу дію у відношенні до бензилпеніциліну натрієвої солі / Ісаєв С.Г., Зупанець І.А., Ярцева Л.В. та ін. (Україна). – Заявл. 15.08.02; Опубл. 15.08.02, Бюл. № 8. – 3 с.
10. Ткач А.О., Ісаєв С.Г., Миронюк П.Л. Тригідроксibenзоати заміщених 9-аміно-5-нітроакридинію, їх синтез та бактеріостатична активність: Зб. наук. статей "Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики" – Запоріжжя, 2001. – Вип. 7. – С. 90-95.

# СОЛИ И МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСЫ НА ОСНОВЕ ЗАМЕЩЕННЫХ 3,5-ДИНИТРО-N-ФЕНИЛАНТРАНИЛОВЫХ КИСЛОТ, ИХ СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

Ярцева Л.В., Свечникова Е.Н., Исаев С.Г., Бевз Н.Ю., Шевелева Н.Е.  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

## Резюме

Осуществлен синтез новых производных 3,5-динитро-N-фенилантраниловых кислот, их медных комплексов и солей на основе 2,5-динитро-4-метил-9-аминоакридина. Структуру 14 синтезированных соединений подтверждено данными элементного анализа и ИК-спектров. Чистоту контролировали методом тонкослойной хроматографии. Установлено, что синтезированные вещества проявляют бактериостатическую, фунгистатическую, противовоспалительную, анальгетическую, желчегонную активность. Медные комплексы 3,5-динитро-N-фенилантраниловых кислот и 3,5-динитро-N-фенилантранилаты 2,5-динитро-4-метил-9-аминоакридина, по классификации К.К. Сидорова, принадлежат к классу малотоксичных веществ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **N-фенилантраниловые кислоты, медные комплексы, соли 9-аминоакридина, фармакологический скрининг.**

# SALTS AND METALLOCOMPLEXES ON THE BASIS OF SUBSTITUTED 3,5-DINITRO-N-PHENYLANTRANYL ACIDS, THEIR SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY

L.V. Yartseva, O.M. Sviechnikova, S.G. Isayev, N.Y. Bevz, N.Y. Shevelyova  
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

## Summary

The synthesis of new derivatives of 3,5-dinitro-N-phenylanthranilic acids, their copper complexes and salts on the basis of 2,5-dinitro-4-methyl-9-aminoacridine was carried out. The composition of 14 synthesized compounds was confirmed by the data of element analysis and their infrared-spectra. The purity was controlled by the method of thin-layer chromatography. It was defined that the synthesized compounds show bacteriostatic, fungistatic, antiphlogistic and cholagogic activity. The copper complexes of 3,5-dinitro-N-phenylanthranilic acids and 3,5-dinitro-N-phenylanthranilates of 2,5-dinitro-4-methyl-9-aminoacridine belong to the class of low-toxic substances according to the classification of K.K. Sydorov.

KEY WORDS: **N-phenylanthranilic acids, copper complexes, salts of 9-aminoacridine, pharmacological screening.**

Отримано 17.01.2003 р.

Адреса для листування: С.Г. Ісаєв, вул. Гарібальді, 11-А, кв. 21, Харків, 61142, Україна.

Для отримання оперативної інформації звертайтеся  
до нашої сторінки в Інтернеті:  
<http://tdma.edu.te.ua>

## ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ ДЕЯКИХ БЕНЗИЛІДЕНПОХІДНИХ 4-АМІНО- І 3,5-ДИМЕТИЛ-4-АМІНО-1,2,4-ТРИАЗОЛУ

О.І. Панасенко

ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

*Вивчено гостру токсичність бензиліденпохідних 4-аміно- і 3,5-диметил-4-аміно-1,2,4-триазолу, виявлено деякі закономірності взаємозв'язку між хімічною будовою і токсичністю синтезованих сполук.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **1,2,4-триазоли, бензиліденамінопохідні, гостра токсичність.**

**ВСТУП.** Відомо, що похідні 1,2,4-триазолу, а також 4-аміно-1,2,4-триазолу, проявляють високу біологічну активність [1-3]. Проте дані про біологічну активність бензиліденпохідних 4-аміно- і 3,5-диметил-4-аміно-1,2,4-триазолу практично відсутні.

Тому ми вважали за необхідне вивчити біологічну активність вищеназваних сполук і виявити можливі закономірності взаємозв'язку між їх хімічною будовою та токсичністю.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Гостру токсичність сполук цієї серії вивчали на кафедрах клінічної фармакології Запорізького державного медичного університету та фармакотерапії Харківського національного фармацевтичного університету.

Дослідження проводили на білих щурах лінії Wistar за експрес-методом В.Б. Прозоровського [4]. Об'єктами дослідження були 4-бензиліденаміно-1,2,4-триазоли (сполуки 1-8), 3,5-диметил-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазоли (сполуки 9-18), броміди 1-н-пропіл-3,5-диметил-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію (сполуки 19-25), броміди 1-н-пентил-3,5-диметил-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію (сполуки 26-32), хлориди 1-н-ноніл-3,5-диметил-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію (сполуки 33-43), хлориди 1-бензил-3,5-диметил-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію (сполуки 44-51), 1-ацетат-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію (сполуки 52-60), 1-ацетат-3,5-диметил-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію (сполуки 61-67), хлориди 1-амінокарбонілметил-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію (сполуки 68-77), хлориди 1-амінокарбонілметил-3,5-диметил-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію (сполуки 78-85).

© О.І. Панасенко – к.фарм.н., 2003.

### *Експериментальна частина*

Для спостереження використовували 4 групи щурів (по 2 тварини в кожній) з додатковим застосуванням однієї попередньої та наступної доз. Водорозчинні сполуки розчиняли в 1,5 мл дистильованої води й вводили, з дотриманням правил асептики та антисептики, за допомогою шприца внутрішньочеревно. Водонерозчинні сполуки стабілізували твіном-80 та вводили через металевий зонд у шлунок. Спостереження проводили через 24 год. Результати дослідження наведено в таблиці 1.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Незаміщеної 4-аміно-1,2,4-триазол – нетоксична речовина, його LD<sub>50</sub> становить 890 (750-1060) мг/кг. Введення за аміногрупою залишків альдегідів (сполуки 1-8) у більшості випадків практично не впливає на токсичність сполук. Винятком є сполуки 6-8, токсичність яких зростає. Найбільшу токсичність мають сполуки, що містять залишки 2,4-дихлорбензальдегіду (7), 2-оксинафтальдегіду (8) і 4-диметиламінобензальдегіду (6).

Перехід до похідних 3,5-диметил-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолів (сполуки 9-19) супроводжується підвищенням токсичності сполук, але і в цьому випадку найбільш токсичною є речовина, яка містить залишок 2,4-дихлорбензальдегіду (15). Дещо підвищує токсичність введення залишків 4-бром- (9), 2-оксинафтальдегіду (18) та 2,4-диметоксибензальдегіду (17).

Введення в першому положенні пропільного замісника 3,5-диметил-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолу супроводжується подальшим підвищенням токсичності сполук (20-24). У цьому випадку введення в молекулу залишку бензальдегіду з метоксильними замісниками

Таблиця 1 – Гостра токсичність бензиліденпохідних 4-аміно- і 3,5-диметил-4-аміно-1,2,4-триазолу

№зап	R	LD <sub>50</sub> мг/кг			LD <sub>50</sub> мг/кг
1	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br-п	815(660-1000)	43	2-оксинафтил	870(630-1200)
2	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OH-о	815(710-940)	44	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	600(480-740)
3	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -о	860(580-1270)	45	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br-п	447(350-510)
4	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -п	870(630-1200)	46	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -о	580(420-800)
5	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> -м	870(630-1200)	47	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -п	580(420-800)
6	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	708(620-800)	48	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> -м	564(490-640)
7	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -Cl <sub>2</sub> -2,4	379(300-470)	49	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -п	515(450-590)
8	2-оксинафтил	564(490-640)	50	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-2-Br-5	470(330-680)
9	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br-п	447(390-510)	51	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-2-NO <sub>2</sub> -5	515(420-630)
10	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OH-о	600(480-740)	52	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br-п	515(450-590)
11	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -о	650(560-750)	53	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OH-о	755(600-950)
12	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -п	682(460-1010)	54	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -о	564(490-640)
13	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> -м	547(400-750)	55	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -п	547(400-750)
14	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	690(500-950)	56	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> -п	580(420-800)
15	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -Cl <sub>2</sub> -2,4	355(310-400)	57	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	650(530-800)
16	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-2-Br-5	650(530-800)	58	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -Cl <sub>2</sub> -2,4	470(330-680)
17	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -2,4	547(400-750)	59	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-2-Br-5	564(480-640)
18	2-оксинафтил	515(450-590)	60	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -2,4	447(390-510)
19	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br-п	515(450-590)	61	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br-п	708(590-840)
20	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -о	372(260-540)	62	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -о	682(460-1010)
21	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -п	372(260-540)	63	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -п	650(560-750)
22	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> -м	410(330-500)	64	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> -м	690(500-950)
23	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -п	410(350-470)	65	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -п	590(410-890)
24	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-2-Br-5	368(260-500)	66	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-2-Br-5	564(470-670)
25	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-2-NO <sub>2</sub> -5	435(320-600)	67	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-2-NO <sub>2</sub> -5	600(480-740)
26	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br-п	447(370-530)	68	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br-п	580(420-800)
27	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -о	447(390-510)	69	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OH-о	860(580-1270)
28	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -п	447(390-510)	70	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -о	447(370-530)
29	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> -м	460(333-630)	71	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -п	447(390-510)
30	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -п	564(490-640)	72	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> -м	542(370-530)
31	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-2-Br-5	379(300-470)	73	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	708(620-800)
32	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-2-NO <sub>2</sub> -5	470(330-680)	74	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -Cl <sub>2</sub> -2,4	447(390-510)
33	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br-п	890(730-1060)	75	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-2-Br-5	547(400-750)
34	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OH-о	755(600-900)	76	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -2,4	379(300-470)
35	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -о	755(600-950)	77	2-оксинафтил	564(490-640)
36	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -п	815(710-940)	78	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	690(500-950)
37	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> -м	815(710-940)	79	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br-п	410(350-470)
38	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> -п	815(660-1000)	80	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -OH-о	355(290-420)
39	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	860(580-1270)	81	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OCH <sub>3</sub> -п	355(310-400)
40	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -Br <sub>2</sub> -2,4	870(630-1200)	82	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> -м	447(370-530)
41	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-2-Br-5	920(670-1270)	83	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> -м	447(370-530)
42	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> (OCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -2,4	890(750-1060)	84	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	542(370-800)
			85	C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> -OH-2-NO <sub>2</sub> -5	430(290-640)

(сполуки 20, 21) або 2-окси-5-бромбензальдегіду (24) підвищує токсичність сполук.

Подовження замісника в першому положенні (сполуки 26-32) супроводжується незначним зниженням токсичності сполук, але, як і в попередньому випадку, найбільш токсичною є сполука, яка містить залишок 2-окси-5-бромбензальдегіду (31).

При переході до похідних хлориду 1-н-ноніл-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію відбувається подальше зниження токсичності сполук 33-43.

Як і слід було чекати, введення в першому положенні бензильного замісника (сполуки 44-50) супроводжується підвищенням токсичності сполук. Найбільшу токсичність мають сполуки,

що містять залишки 4-бром- (45) та 2-окси-5-бромбензальдегіду (50).

Похідні 1-ацетат-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію (52-59) – нетоксичні сполуки, їх LD<sub>50</sub> коливається в межах 755-447 мг/кг. У даному випадку зберігаються закономірності, викладені вище.

Введення двох метильних груп, перехід до 1-ацетат-3,5-диметил-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію (сполуки 61-67) практично не впливають на зміну токсичності сполук.

Хлориди 1-амінокарбонілметил-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію (сполуки 68-76), порівняно з сполуками 1-ацетат-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію (52-59), практично мало

чим відрізняються за токсичністю, їх  $LD_{50}$  перебуває в межах 860-379 мг/кг. У даному випадку токсичність підвищують такі замісники в бензольному ядрі, як метоксигрупа й атоми хлору.

Що стосується хлоридів 1-амінокарбонілметил-3,5-диметил-4-бензиліденаміно-1,2,4-триазолію (сполуки 78-85), то в цих сполуках введення в ядро бензолу бензальдегіду замісників підвищує токсичність сполук, особливо гідро- або метоксильної групи.

Таким чином, бензиліденпохідні 4-аміно- і 3,5-диметил-4-аміно-1,2,4-триазолу, згідно з класифікацією, відносять до класу малотоксичних речовин,  $LD_{50}$  яких перебуває в межах 355-920 мг/кг.

**ВИСНОВОК.** Вивчено гостру токсичність бензиліденпохідних 4-аміно- і 3,5-диметил-4-аміно-1,2,4-триазолу, виявлено деякі закономірності взаємозв'язку між хімічною будовою і токсичністю синтезованих сполук.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Авраменко Н.А., Черковская Л.Г., Беленичев И.Ф. Синтез и свойства 1-алкил, 1-метилкарбоксих-4-амино(алкиламино)-1,2,4-триазолия // Вісн. фармації. – 1999. – № 2. – С. 36-39.

2. Пат. 2136669 Россия, МПК С 07 D 240/08, А 61 К 31/41/ Бромид 1-( $\beta$ -фенилэтил)-4-( $p$ -диметиламинобензиліденаміно)-1,2,4-триазолия, обладающий антиоксидантным, противоишемическим,  $\beta$ -адреноблокирующим, утеротоническим и снижающим внутриглазное давление действием: Мазур И.А., Авраменко Н.А., Беленичев И.Ф., Волошин Н.А., Дунаев В.В., Загородних О.В., Луценко Н.С., Несте-

рова Н.А., Стец В.Р., Фаворитов В.Н., Георгиевский Г.В. – № 97109697/04; Заявл. 10.6.97; Опубл. 10.9.99, Бюл. № 25. – 4 с.

3. Пат. 23260 Україна, МПК С 07 D 249/08, А 61 К 31/41/ Бромид-1-пентил-4-( $p$ -метоксибензилідено)-1,2,4-триазолію проявляє спазмолітичну активність / Мазур І.А., Авраменко М.О., Нестерова Н.О., Фаворитов В.М., Дунаєв В.В., Візір В.А. – № 97041912; Заявл. 22.4.97; Опубл. 31.8.98. – 4 с.

4. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и её ошибки // Фармакол. и токсикол. – 1978. – 11, № 4. – С. 497-502.

## ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ НЕКОТОРЫХ БЕНЗИЛИДЕН-ПРОИЗВОДНЫХ 4-АМИНО- И 3,5-ДИМЕТИЛ-4-АМИНО-1,2,4-ТРИАЗОЛА

**О.И. Панасенко**

ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

#### Резюме

*Изучена острая токсичность бензилиденпроизводных 4-амино- и 3,5-диметил-4-амино-1,2,4-триазола, выявлены некоторые закономерности взаимосвязи между химическим строением и токсичностью синтезированных соединений.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** 1,2,4-триазолы, бензилиденаминопроизводные, острая токсичность.

## ACUTE TOXICITY OF SOME BENZILYDEN-DERIVATIVES OF 4-AMINO- AND 3,5-DIMETHYL-4-AMINO-1,2,4-TRIAZOLE

**O.I. Panasenko**

ZAPORIZHZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

#### Summary

*Acute toxicity of benzilyden derivatives of 4-amino- and 3,5-dimethyl-4-amino-1,2,4-triazole were studied, some conformities of correlation between the chemical structure and toxicity of synthesized compounds have been revealed.*

**KEY WORDS:** 1,2,4-triazoles, benzilydenamino-derivatives, acute toxicity.

Отримано 08.09.2003 р.

**Адреса для листування:** О.І. Панасенко, вул. Дніпровські пороги, 35, кв. 152, Запоріжжя, 69121, Україна.



## ВПЛИВ ІНГІБІТОРІВ РЕНІН-АНГІОТЕНЗИНОВОЇ СИСТЕМИ НА ГОСТРУ ТОКСИЧНІСТЬ АНТИГІПЕРТЕНЗИВНИХ ЗАСОБІВ З РІЗНИМИ МЕХАНІЗМАМИ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ ДІЇ

Г.О. Сирова

ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ХАРЬКІВСЬКЕ МЕДИЧНЕ УЧИЛИЩЕ № 1

Показано, що інгібітори ренін-ангіотензинової системи (ІРАС) – каптоприл (5 мг/кг), еналаприл (5 мг/кг) і лозартан (10 мг/кг) – у досліджах на мишах та щурах, не впливаючи на головні параметри гострої токсичності клофеліну, анаприліну, верапамілу й дибазолу, подовжують тривалість життя більшості піддослідних тварин. Відмічений ефект оцінюється як прояв антистресової дії ІРАС та вказує на доцільне використання вивчених сполучень в комбінованому лікуванні гіпертонічної хвороби.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** інгібітори ренін-ангіотензинової системи, каптоприл, еналаприл, лозартан, гостра токсичність, емоційний стрес.

**ВСТУП.** Сучасна фармакотерапія багатьох захворювань характеризується комплексним підходом. При гіпертонічній хворобі він ґрунтується на різних механізмах фармакологічної дії існуючих антигіпертензивних засобів, які забезпечують одночасний вплив на суттєві ланки регуляції тону судин, що призводить до підвищення й стабілізації лікувального ефекту [3].

Серед сучасних гіпотензивних засобів найбільш розповсюдженими є інгібітори ренін-ангіотензинової системи (ІРАС), які широко застосовують в лікуванні не тільки гіпертонічної хвороби, а й стенокардії, ішемічної хвороби серця, інфаркту міокарда [5, 9, 11, 13]. При цьому їх призначають не тільки у вигляді монотерапії, а й в комбінації з іншими засобами базової терапії, які відновлюють стан серця та системної гемодинаміки [2, 7, 10, 12]. В літературі відсутні дані про вплив ІРАС на показники гострої токсичності різних антигіпертензивних засобів, з якими їх можна комбінувати. Разом із тим, такий вплив при його позитивному характері може бути одним із проявів антистресової дії препаратів, яка досліджується нами щодо ІРАС [8].

Метою роботи було вивчити вплив ІРАС каптоприлу, еналаприлу й лозартану на гостру токсичність центрального  $\alpha_2$ -адреноміметика клофеліну,  $\beta$ -адреноблокатора анаприліну,

© Г.О. Сирова, 2003.

блокатора кальцієвих каналів верапамілу та інгібітора фосфодіестерази дибазолу. Всі використані препарати були вітчизняного виробництва.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди виконано на статевозрілих білих мишах обох статей лінії BALB/C (450 голів) масою 20-30 г загальноприйнятим методом вивчення гострої токсичності [1] і на білих статевозрілих щурах обох статей лінії WAG популяції Вістар (90 голів) масою 150-250 г експрес-методом за Deichmann et la Blanc [4]. В кожній з 4-х серій дослідів на мишах досліджувані антигіпертензивні препарати вводили одноразово внутрішньочеревицею в наростаючих дозах від максимального переносимих до абсолютного смертельного після одноразового введення у шлунок ІРАС через 1-2,5 год відповідно до їх фармакокінетичних особливостей. Каптоприл (КП) і еналаприл (ЕП), що належать до інгібіторів АПФ, вводили в дозі 5 мг/кг, а блокатор ангіотензинових рецепторів лозартан (Л) – 10 мг/кг. Контрольні тварини одержували антигіпертензивні засоби без попереднього введення ІРАС. В цих умовах у мишей відмічали клінічний прояв гострого отруєння за типовими симптомами порушення функції окремих систем та органів [6], кількість загиблих від кожної дози препарату тварин, верхні пара-

метри токсичності (максимально переносима  $LD_{0}$ ,  $LD_{50}$  та  $LD_{100}$ ), широту токсичної дії та термін загибелі. За тваринами, які вижили ми спостерігали протягом 14 діб, визначаючи їх масу кожні 7 днів.  $LD_{50}$  обчислювали на підставі одержаної низки доз, які викликали різний відсоток загибелі мишей (від 0 до 100 %), за методом Літчфілда-Уілкоксона [11].

У дослідах на щурах, відповідно до застосованого експрес-методу, кожну з наростаючих доз препаратів, у тому числі і на фоні ІРАС, вводили одній тварині. За  $LD_{50}$  брали найменшу (першу) дозу, яка призводила до загибелі тварини. Нагляд за щурами, які вижили, проводили так само, як у дослідах на мишах.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Одержані дані свідчать про те, що досліджувані препарати ІРАС практично не впливають на абсолютне значення  $LD_{50}$  антигіпертензивних препаратів. У дослідах на мишах (табл. 1) спостерігаються деякі окремі коливання токсикометричних показників, з яких найбільш закономірною є тенденція до зменшення абсолютної токсичності клофеліну під впливом усіх трьох ІРАС (КП<ЕП=Л) при відсутності зміни у широті токсичної дії препарату (1:2,4). У дослідах з верапамілом відмічаються така ж тенденція на фоні Л та статистично достовірне підсилення токсичності під впливом ЕП, що поєднується із збільшенням широти його токсичної дії до 1:6 замість 1:2,7 у контролі. ЕП викликає зменшення широти токсичної дії анаприліну (1:1,7) та прискорює в цих дослідах загибель тварин (через 0,5-1 год замість 0,5-4,8 год у

контролі). КП позитивно впливає на широту токсичної дії дибазолу (1:6) при 1:5 в контролі і строки загибелі в цих дослідах мишей (12-72 год замість 1-48 год). Ефект подовження життя тварин в цих дослідах більш-менш стабільно спостерігається на фоні всіх ІРАС, що можна відзначити як їх позитивний вплив на гостру токсичність досліджуваних препаратів. Він залежить від механізму дії останніх, проявляючись при поєднанні ІРАС з центральним  $\alpha_2$ -адреноміметичним (клофелін) та міотропним спазмолітичним (аерапоміл, дибазол) впливом. Блокада  $\beta$ -адренорецепторів (анаприлін) не сприяє захисту тварин інгібіторами ІРАС, як і різні механізми дії кожного препарату досліджуваної групи. З боку клінічних проявів гострого отруєння вивченими антигіпертензивними засобами у поєднанні з ІРАС превалювали процеси гальмування в ЦНС.

У дослідах на щурах одержано аналогічні дані (табл. 2): в окремих випадках (Л+анаприлін; КП+верапаміл) зниження токсичності за  $LD_{50}$  та подовження виживання тварин в умовах гострого досліду при передозуванні вивчених антигіпертензивних засобів, за винятком анаприліну.

Практична відсутність різниці в порядку величин  $LD_{50}$  у мишей і щурів зумовила низьке значення коефіцієнта видової чутливості, тобто її відсутність, тому одержані результати з певною мірою можна перенести на людину. Це підтверджує можливість прояву антистресової дії ІРАС на підставі їх модуляційного впливу на тривалість життя тварини в умовах гострого отруєння.

Таблиця 1 – Вплив ІРАС на гостру токсичність антигіпертензивних препаратів з різними механізмами дії в дослідах на мишах

Досліджувані препарати, умови дослідів	Параметри гострої токсичності				
	$LD_{0}$ , мг/кг	$LD_{50}$ , мг/кг	$LD_{100}$ , мг/кг	Широта токсичної дії	Термін загибелі, год
Клофелін	125	200 (170÷234)	300	1:2,4	0,5-12
КП+клофелін	150	215 (184÷252)	325	1:2,2	1-24
ЕП+клофелін	150	250 (210,0÷297,5)	350	1:2,4	1-24
Л+клофелін	150	238 (191,9÷295,1)	350	1:2,4	1-48
Анаприлін	75	200 (14÷214,6)	250	1:3,3	0,5-48
КП+анаприлін	75	148 (102,1÷214,6)	250	1:3,3	1-24
ЕП+анаприлін	150	186 (157,6÷219,5)	250	1:1,7	0,5-1
Л+анаприлін	75	148 (118,4÷185)	250	1:3,3	1-48
Верапаміл	75	116 (94,3÷142,7)	200	1:2,7	12-48
КП+верапаміл	100	106 (89,0÷26,1)	200	1:2	24-48
ЕП+верапаміл	25	62 (41,4÷93,0)	150	1:6	12-48
Л+верапаміл	75	126 (105÷152)	200	1:2,7	24-48
Дибазол	200	501,5 (346÷727)	1000	1:5	1-48
КП+дибазол	10	314 (176÷59)	600	1:60	12-72
ЕП+дибазол	200	546,3 (444÷672)	1000	1:5	12-48
Л+дибазол	100	362,5 (231÷569)	800	1:8	12-24

Таблиця 2 – Вплив IPAC на гостру токсичність антигіпертензивних препаратів з різними механізмами дії в дослідах на щурах

Досліджувані препарати, умови дослідів	Параметри гострої токсичності		
	LD <sub>50</sub> , мг/кг	Широта токсичної дії	Термін загибелі, год
Клофелін	200	1:1,3	0,25-24
КП+клофелін	250	1:1,25	1-24
ЕП+клофелін	300	1:1,2	2-48
Л+клофелін	300	1:1,2	24-48
Анаприлін	100	1:1,3	1-48
КП+анаприлін	100	1:1,3	1-24
ЕП+анаприлін	150	1:1,5	1-12
Л+анаприлін	200	1:1,3	1-48
Верапаміл	75	1:1,5	0,5
КП+верапаміл	150	1:1,5	1-24
ЕП+верапаміл	100	1:1,3	1-24
Л+верапаміл	100	1:1,3	1-24
Дибазол	600	1:1,5	0,5-1
КП+дибазол	400	1:2	1-12
ЕП+дибазол	800	1:1,3	0,5-24
Л+дибазол	600	1:1,5	2

ВИСНОВКИ. 1. Каптоприл (5 мг/кг), еналаприл (5 мг/кг), лозартан (10 мг/кг) при попередньому одноразовому внутрішньошлунковому введенні не замінюють основних токсикометричних параметрів клофеліну, анаприліну, верапамілу й дибазолу в умовах гострого досліді.

2. Вивчені IPAC в указаних умовах подовжують виживання тварин після гострого отруєн-

ня, особливо це закономірно в досліді з клофеліном, верапамілом й дибазолом.

3. Комбіноване застосування IPAC з вивченими препаратами треба вважати доцільним не тільки на підставі односпрямованої фармакологічної дії (зниження АТ), але й завдяки властивому їм антистресовому ефекту, про що може свідчити їх модулююча дія на термін загибелі тварин.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Л.: Гос. изд-во мед. лит., 1963. – 152 с.  
 2. Власенко М.А., Кочуєва М.М., Литовченко О.Ю. та ін. Вплив лікування інгібіторами ангіотензинперетворюючого ферменту та антагоністами кальцію на стан діастолічної функції лівого шлуночка серця у хворих на артеріальну гіпертензію різного генезу // Клінічна фармація. – 2002. – 6, № 4. – С. 17-19.  
 3. Жуков К.В. Использование физиотенза в комплексном лечении больных с кризовым течением гипертонической болезни // IV Всеукраинская научно-практическая конференция "Новое в клинической фармакологии и фармакотерапии заболеваний внутренних органов". – Х., 2002. – С. 155-156.  
 4. Санецкий И.В. Токсикометрия. – М., 1980. – С. 56-57.  
 5. Сидоренко Б.А., Преображенский Д.В., Сопалева Ю.В. Лозартан – первый представитель нового класса гипотензивных препаратов // Кардиология. – 1996. – № 1. – С. 84-89.  
 6. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів // Методичні рекомендації. – К., 2001. – С. 84-90.

7. Стец Р.В., Лящук С.Н., Крайдашенко О.В. Использование эналаприла в комбинированной терапии стенокардии напряжения у лиц пожилого и старческого возраста // IV Всеукраинская научно-практическая конференция "Новое в клинической фармакологии и фармакотерапии заболеваний внутренних органов". – Х., 2002. – С. 58-59.  
 8. Сырочая А.О. Гипотензивное действие ингибиторов ренин-ангиотензиновой системы при эмоциональном стрессе в эксперименте // Мат. науч.-практич. конференции "Лекарство человеку". Х., 2002. – 7, № 1. – С. 364-367.  
 9. Французова С.Б., Плиска О.І. Ренін-ангіотензинова система та її місце у патогенезі і лікуванні захворювань серцево-судинної системи // Ліки. – 2000. – № 3-4. – С. 61-65.  
 10. Целуйко В.И., Шустваль Н.Ф., Колиушко Г.И., Киношенко К.Ю. и др. Использование эналаприла в комплексной терапии больных острым инфарктом миокарда // IV Всеукраинская науч.-практич. конференция "Новое в клинической фармакологии и фармакотерапии заболеваний внутренних органов". – Х., 2002. – С. 65-66.  
 11. Шелест А.Н., Барзова Е.Ю., Шушляпин О.И.

и др. Влияние ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента на гуморальные факторы у больных стенокардией // IV Всеукраинская науч.-практич. конференция "Новое в клинической фармакологии и фармакотерапии заболеваний внутренних органов". – Х., 2002. – С. 69-70.

12. Ansari M.N., Tutar A., Teerlink I.R. et al. ACE

inhibitor and beta-blocker use in CHF out patients are we translating clinical trials into practice [abstr] // Ibid. – 1999. – **100.18**, suppl. 1. – P. 28-34.

13. Eichhor E.J., Bristow M.R. Medical therapy can improve the biologic properties of the chronically failing heart: a new era in the treatment of heart failure // Circulat. – 1996. – **94**. – P. 2285-2296.

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ РЕНИН-АНГИОТЕНЗИНОВОЙ СИСТЕМЫ НА ОСТРУЮ ТОКСИЧНОСТЬ АНТИГИПЕРТЕНЗИВНЫХ СРЕДСТВ С РАЗЛИЧНЫМИ МЕХАНИЗМАМИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

**А.О. Сырова**

ХАРЬКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ,  
ХАРЬКОВСКОЕ МЕДИЦИНСКОЕ УЧИЛИЩЕ № 1

### Резюме

Показано, что ингибиторы ренин-ангиотензиновой системы (ИРАС) – каптоприл (5 мг/кг), эналаприл (5 мг/кг) и лозартан (10 мг/кг) – в опытах на мышах и крысах, не оказывая влияния на основные параметры острой токсичности клофелина, анаприлина, верапамила и дибазола, удлиняют продолжительность жизни большинства подопытных животных. Отмеченный эффект оценивается как проявление антистрессового действия ИРАС и указывает на уместное использование изученных сочетаний в комбинированном лечении гипертонической болезни.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ингибиторы ренин-ангиотензиновой системы, каптоприл, эналаприл, лозартан, острая токсичность, эмоциональный стресс.

## THE INFLUENCE OF INHIBITORS OF RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM ON ACUTE TOXICITY OF ANTIHYPERTENSIVE MEANS WITH DIFFERENT MECHANISMS OF PHARMACOLOGICAL ACTION

**H.O. Syrova**

KHARKIV STATE MEDICAL UNIVERSITY  
KHARKIV MEDICAL SCHOOL № 1

### Summary

It was shown that the inhibitors of renin-angiotensin system (IRAS) captopril (5 mg/kg), enalapril (5 mg/kg) and losartan (10 mg/kg) do not express the influence on the main parameters of acute toxicity of clofelin, anaprilin, verapamil and dibazol in experiments on rats and mice, lengthen the life duration of most experimental animals. Recorded effect is estimated as manifestation of antistress action of IRAS and points to the opportune application of investigated combinations in the combined treatment of hypertension.

KEY WORDS: inhibitors of renin-angiotensin system, captopril, enalapril, losartan, acute toxicity, emotional stress.

Отримано 10.09.2003 р.

Адреса для листування: Г.О. Сырова, вул. Пушкінська, 42, кв. 64, Харків, 61057, Україна.

## КИСНЕВОЗВ'ЯЗУВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ГЕМОГЛОБІНУ ЗА УМОВ ІШЕМІЧНОЇ ХВОРОБИ СЕРЦЯ

Діка Абдуллах Абдулгані  
ЛЬВІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. І. ФРАНКА

*Вивчення кисневозв'язувальних властивостей гемоглобіну за умов розвинутих ішемічних станів стає дедалі актуальнішим і зумовлене необхідністю глибокого розуміння механізмів формування параметрів кисневого режиму організму, компенсаторних зсувів у системі транспорту газів, спрямованих на адекватне постачання кисню дихаючим тканинам.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** ішемічна хвороба серця, оксид азоту, нітрати, нітриди, гемоглобін, кисень.

ВСТУП. Відомо, що основною причиною смерті та втрати працездатності людей є серцево-судинні захворювання. У структурі загальної летальності вони становлять 46 %, з яких 50 % припадає на ішемічну хворобу серця ІХС.

З огляду на можливість участі NO, як універсального регулятора функціональних систем організму, в активації катаболічних процесів патогенезу й адаптації до змін у системі метаболізму, що виникають протягом ІХС, проведено оцінювання утворення цього ліпофільного радикала, досліджуючи вміст його стабільного метаболіту – нітрит-іона ( $\text{NO}_2^-$ ).

NO синтезується з L-аргініну трьома основними ізоформами NO-синтази: двома конститутивними – нейтрональною (nNOS) та ендотеліальною (eNOS) і однією індукційною (iNOS). Конститутивні ізоформи є  $\text{Ca}^{2+}$ -залежними і синтезують NO в порівняно невеликій кількості протягом декількох секунд після надходження будь-якого стимулу, що викликає підвищення концентрації кальцію в клітині. До таких стимулів відносять ацетилхолін, брадикінін, ангіотензін II, субстанцію P, кальцієві іонофори, а також ендогенні речовини, які утворюються при агрегації тромбоцитів у безпосередній близькості від ендотеліальної клітини, наприклад тромбін, АТФ і серотонін. Найбільш важливим фізіологічним стимулом для активації конститутивної NOS є зміна концентрації  $\text{O}_2$  і напруги зсуву, тобто зміщення крові по відносно ендотеліальних клітин.

NO синтезується з L-аргініну в присутності ряду кофакторів і  $\text{O}_2$ . Кінцевими продуктами

© Діка Абдуллах Абдулгані, 2003.

цієї реакції є одна молекула L-цитруліну і один радикал NO [3]. Синтезований в ендотелії судин NO дифундує в сусідні гладеньком'язові клітини і стимулює там розчинну гуанілатциклазу [4]. Це призводить до підвищення в клітині рівня цГМФ і активації цГМФ-залежної протеїнкінази (G-кінази). Концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  в гладеньком'язових клітинах знижується, в результаті чого відбуваються розслаблення гладенького м'яза і вазодилатація.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктами досліджень були: кров здорових донорів віком від 20 до 57 років (всього 58 осіб); кров хворих на ІХС віком від 40 до 83 років з різним ступенем важкості захворювання (67); сеча здорових донорів, у якій визначали концентрацію нітрит-іонів; сеча хворих на ІХС, у якій визначали концентрацію нітрит-іонів. Обстежено 28 донорів з ІХС віком від 38 до 78 років (середній вік –  $(58 \pm 2)$  роки), яких госпіталізували в кардіологічне відділення. Сечу брали натщесерце до проходження курсу лікування.

Концентрацію нітритів у слині і сечі хворих та здорових донорів визначали, використовуючи реакцію Гріса (1879) в модифікації Bratton (1939), Rider & Mellon (1946), Barnes & Folkhard (1951) [6]. Киснево-дисоціаційні властивості гемоглобіну (Hb) виявляли спектрофотометричним методом.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Представлені в таблиці 1 результати свідчать про те, що, порівняно з нормою, за вмістом нітрит-іонів у біологічних рідинах можна виділити три

групи хворих. До 1-ї групи входили хворі, для яких був характерний низький рівень нітрит-іонів, а відношення кількості  $\text{NO}_2^-$  в слині й сечі складало 2,27. У 2-й групі даний показник зменшувався до 1,64, як і в 3-й (в цій групі відмічаємо вміст  $\text{NO}_2^-$ , більший за норму). В контрольній групі показник слина/сеча дорівнював 2,74.

Відомо, що NO безпосередньо виявляє здатність регулювати спорідненість Hb з  $\text{O}_2$  [7]. Тому нами проведено дослідження кисневоди-соціаційних кривих (КДК) Hb в людей з ІХС (у трьох групах: нормотоніків, гіпертоніків, гіпотоніків). Результати досліджень представлено на рисунку 1. За спорідненістю Hb з  $\text{O}_2$  можна виділити три групи хворих на ІХС: з високою спорідненістю з  $\text{O}_2$  ( $p50=(24,0\pm 1,0)$  мм рт. ст.), проміжною ( $p50=(26,6\pm 0,9)$  мм рт. ст.) та низькою ( $p50=(28,0\pm 0,7)$  мм рт. ст.). Цей показник корелює із вмістом нітрит-іона в біологічних рідинах.

Аналіз КДК, зображених на рисунку 1, свідчить про те, що Hb у досліджуваних групах людей, хворих на ІХС, з різним артеріальним тиском має неоднозначний характер щодо спорідненості з  $\text{O}_2$  та розташування в координатах  $p\text{O}_2$  (x). Зменшення  $p50$  Hb у гіпотоніків, порівняно з нормотоніками і гіпертоніками, у бік низьких  $p\text{O}_2$  свідчить про більшу спорідненість дихального гемопротейну з  $\text{O}_2$ , а отже, і про сповільнення дисоціації комплексу "Hb -  $\text{O}_2$ ", погіршення постачання  $\text{O}_2$  у дихаючі тканини. Вхід КДК Hb у гіпотоніків у середній ділянці верхньої інфлексії вказує на те, що віддача  $\text{O}_2$  на венозному кінці капіляра менш ефективна, ніж Hb нормотоніків і гіпертоніків. При  $p\text{O}_2$  40 мм Hg Hb у гіпертоніків віддає тканинам 20 %  $\text{O}_2$ , тоді як у гіпотоніків - лише 12 %. Традиційно вважають, що посилення спорідненості Hb з  $\text{O}_2$  погіршує постачання останнього у тканини. Проте, як свідчать дані літератури останніх років, лівосторонній зсув КДК є важливим фактором підтримки про-оксидно-антиоксидної рівноваги в організмі. Показано, що між утворенням продуктів ПОЛ і спорідненістю Hb з  $\text{O}_2$  існує міцний зв'язок [1]. Зростання спорідненості Hb з  $\text{O}_2$  зумовлює зменшення основних показників ПОЛ [5]. Зсув

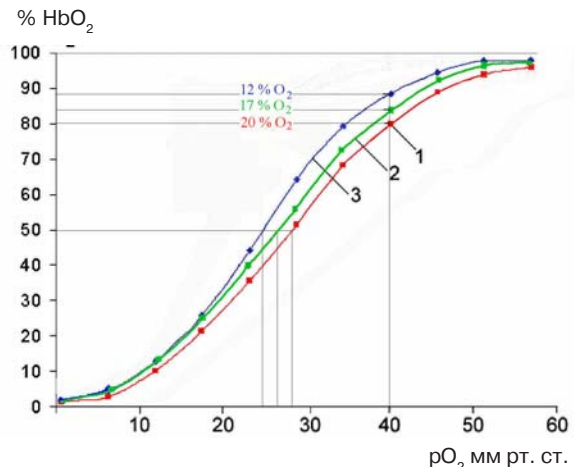


Рис. 1. Криві оксигенації Hb хворих на ІХС: 1 – гіпертоніків; 2 – нормотоніків; 3 – гіпотоніків.

КДК вправо супроводжується активацією вільнорадикального окиснення ліпідів, послабленням механізмів антиоксидного захисту.

Необхідно мати на увазі, що вміст  $\text{O}_2$  у тканинах за умов глибокої ішемії залишається досить значним, перевищуючи критичний рівень, що є передумовою для активації при цьому ПОЛ [2]. Навіть у зоні ішемічного ураження можна виявити як повністю аноксичні, безкисневі ділянки, так і нормально оксигеновані клітини, що зумовлює виникнення локальної "мозаїчності" "відносної гіпероксії" у тканинах. Показано, що при операції на відкритому серці у хворих на ІХС спостерігаються відносно високі значення  $p\text{O}_2$  у тканині, близькі до відповідних величин у артеріальній крові. Для організму характерна періодична нестача  $\text{O}_2$  або його надлишок, що призводить до виникнення неоднорідності кисневого забезпечення. У реальних умовах організму має місце змішана, транзиторна гіпоксія, протягом якої ішемія змінюється покращанням перфузії і оксигенації, що сприяє активації процесів ПОЛ. При високій спорідненості Hb з  $\text{O}_2$  ці процеси гальмуються, оскільки обмежується постачання кисню у ланцюги вільнорадикальних процесів.

Отже, за умов функціонування механізмів, що забезпечують системну вазоконстрикцію-вазодилатацію, користь лівостороннього зсуву КДК, збільшення спорідненості Hb з  $\text{O}_2$  є очевидною.

Таблиця 1 – Вміст нітрит-аніонів в біологічних рідинах людей з ІХС

Групи хворих на ІХС	Концентрація $\text{NO}_2^-$ , нмоль/мл		Слина/сеча
	Слина	Сеча	
Здорові донори	102,92±11,82	37,56±2,57	2,74
Гіпертоніки	32,14±2,18*	14,13±0,81*	2,27
Нормотоніки	42,90±4,61*	26,20±3,70*	1,64
Гіпотоніки	126,34±12,35*	76,83±5,38*	1,64

Примітка. \* – різниця достовірна порівняно з контролем ( $p<0,05$ ).

**ВИСНОВКИ.** 1. За спорідненістю Hb з O<sub>2</sub> можна виділити три групи хворих на ІХС: з високою спорідненістю з O<sub>2</sub> (p50=(24,0±1,0) мм рт. ст.), проміжною (p50=(26,6±0,9) мм рт. ст.) та низькою (p50=(28,0±0,7) мм рт. ст.).

2. При pO<sub>2</sub> 40 мм рт. ст. Hb у гіпертоніків віддає тканинам 20 % O<sub>2</sub>, а в гіпотоніків – лише 12 %.

3. Показано, що, порівняно з нормою, за вмістом нітрит-іонів у біологічних рідинах (сеча та слині) можна виділити три групи хворих на ІХС. До перших двох груп входять хворі, в яких вміст нітрит-іонів нижчий за норму, до 3-ї – пацієнти, в яких вміст нітрит-іонів вищий за норму.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Борисюк М.В., Зинчук В.В., Корнейчик В.Н. Взаимоотношения средства гемоглобина к кислороду и перекисного окисления липидов при лихорадке // Бюлл. эксперим. биол. и мед. – 1994. – **114**, № 7. – С. 27-30.

2. Борисюк М.В., Корнейчик В.Н., Рожко А.В., Янкелевич Ю.Д. Гемический компонент системы транспорта кислорода в регуляции процессов перекисного окисления липидов // Система транспорта кислорода. – Гродно, 1989. – С. 6-13.

3. Ванин А.Ф., Кубрина Л.М., Маленкова И.В., Мордвинов П.И. L-аргинин – эндогенный источник оксида азота в тканях животных // Биохимия. – 1991. – **56**, № 5. – С. 1935-1939.

4. Ванин А.Ф., Манухина А.В., Меерсон Ф.З.

Усиление синтеза оксида азота в стенке аорты при экспериментальном инфаркте миокарда // Бюлл. экспим. биол. и мед. – 1993. – № 8. – С. 142-144.

5. Гавриш А.С., Сергиенко О.В., Иващенко Т.И., Порадун Е.Н. Структурно-функциональное состояние тромбоцитов при хронической ишемической болезни сердца // Клинич. мед. – 1993. – **71**, № 5. – С. 38-44.

6. Griess reagent system (Technical bulletin № 229). Promega Corporation: Madison (WI). – 2000. – 4 p.

7. Kon K., Maeda N., Shiga T. Effect of nitric oxide on the oxygen transport of human erythrocytes // J. Toxicol. Environ. Health. – 1977. – **2**, № 5. – P. 1109-1113.

## КИСЛОРОДОСВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА ГЕМОГЛОБИНА В УСЛОВИЯХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ СЕРЦА

**Дика Абдуллах Абдулгани**

ЛЬВОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. И. ФРАНКА

#### Резюме

*Изучение кислородосвязывающих свойств гемоглобина в условиях развитых ишемических состояний ставится все более активным и обусловлено необходимостью глубокого понимания механизмов формирования параметров режима организма, компенсаторных сдвигов в системе транспорта газов, направленных на адекватное снабжение кислородом дышащих тканей.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ишемическая болезнь сердца, оксид азота, нитраты, гемоглобин, кислород.

## OXYGEN-BINDING PROPERTIES OF HEMOGLOBIN AT ISCHEMIC HEART DISEASE

**Dica Abdullakh Abdulgani**

Lviv STATE UNIVERSITY BY I. FRANKO

#### Summary

*The study of oxygen-binding properties of hemoglobin under the conditions of developed ischemic states becomes more and more active and it is caused by the necessity of deep understanding of mechanisms of formation of the oxygen regimen parameters, compensatory deteriorations in the system of gases transporting which are directed to the adequate supply of oxygen to the respiratory tissues.*

**KEY WORDS:** ischemic heart disease, nitric oxide, nitrates, nitrites, hemoglobin, oxygen.

Отримано 19.11.2003 р.

**Адреса для листування:** Дика Абдуллах Абдулгані, Львівський державний університет ім. І. Франка, Україна.

УДК 615:54.057:547.583.5:661.8...9

СИНТЕЗ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ МЕТАЛОКОМПЛЕКСІВ N-ФЕНІЛАНТРАНІЛОВИХ КИСЛОТ

С.Г. Ісаєв, О.А. Бризицький, О.М. Свечнікова  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Здійснено синтез мідних та алюмінієвих комплексів 3-нітро-, 3,5-динітро- та 3,5-дихлор-N-фенілантранілових кислот через стадію утворення натрієвих або калієвих солей відповідних кислот. Будову та чистоту металокомплексів підтверджено даними елементного, ІЧ-спектрального та хроматографічного аналізу, якісними реакціями. Встановлено, що синтезовані речовини проявляють протизапальну, анальгетичну, нейролептичну, жовчогінну та бактеріостатичну активність. За класифікацією К.К. Сидорова, мідні та алюмінієві комплекси N-фенілантранілових кислот при внутрішньочеревному та внутрішньошлунковому введенні належать до класу малотоксичних речовин.


КЛЮЧОВІ СЛОВА: синтез, N-фенілантранілові кислоти, мідні та алюмінієві комплекси, фармакологічна активність.


ВСТУП. Проведені раніше дослідження [1, 2, 3, 5-11] свідчать про різнобічну біологічну активність заміщених N-фенілантранілових кислот. Але поряд із позитивними якостями дані речовини мають істотний недолік: вони проявляють гемато-, нефро-, кардіотоксичну та ульцерогенну побічні дії. Вивчення даних літератури [10] дозволяє зробити висновок, що вказаного вище недоліку, характерного для N-фенілантранілових кислот (N-ФАК), можна позбутись шляхом створення металокомплексів на їх основі.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Металокомплекс N-ФАК (рис. 1) синтезовано на кафедрах фармацевтичної (доц. С.Г. Ісаєв, сполуки X-XXII) та аналітичної (асп. О.А. Бризицький, сполуки I-IX) хімії Національного фармацевтичного університету. Вихідні N-ФАК одержано у лабораторних умовах за модифікованою нами реакцією Ульмана [6, 12, 13], а потім на їх основі синтезовано мідні та алюмінієві комплекси при взаємодії калієвих солей відповідних кислот з міді сульфатом та алюмінію хлоридом. Будову металокомплексів (I-XXII) (рис. 1) підтверджено даними елементного аналізу (автоматичний аналізатор M-185 фірми "Hewlett Packard"),

© С.Г. Ісаєв – к.фарм.н., О.А. Бризицький, О.М. Свечнікова – д.хым.н., проф., 2003.

ІЧ-спектроскопії (спектрофотометр "Specord-M 80") та методом тонкошарової хроматографії на пластинках "Silufol UV-254". Дані елементного аналізу відповідають розрахованим. Інтерпретацію ІЧ-спектрів сполук (I-XXII) здійснено порівняно з модельними сполуками-вихідними N-ФАК та їх калієвими солями [6, 8, 9]. Відомо, що величина  $\Delta\nu = \sqrt{\nu_{\text{C}(\text{O}^-)_2}^{\text{as}} - \nu_{\text{C}(\text{O}^-)_2}^{\text{s}}}$  є мірою асиметрії зв'язку між металом і киснем. У молекулах калієвих або натрієвих солей N-ФАК

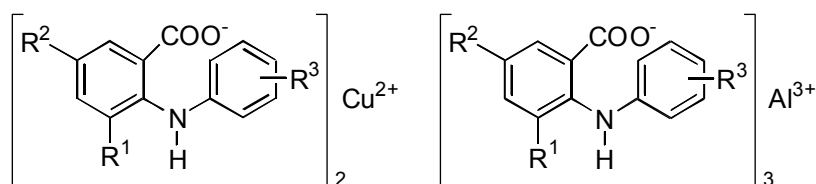
(іонний тип зв'язку) група  симетрична

на відміну від групи  кислот, що знахо-

дить своє відображення в ІЧ-спектрах калієвих солей [7] у вигляді зміщення смуги вбирання карбоксилантіонів у низькочастотну ділянку спектра, а симетричних коливань – у високо-частотну, що є природним наслідком солеутворення. Величина  $\Delta\nu$  становить 180-205  $\text{cm}^{-1}$ . В ІЧ-спектрах металокомплексів (I-XXII) вона зменшується до 155-165  $\text{cm}^{-1}$ , що наочно свідчить про вищу симетрію зв'язків і є одним із аргументів утворення комплексу.

Для виявлення протизапальної активності у нових синтезованих сполуках досліджували





I – IX = R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = NO<sub>2</sub>;  
X – XV = R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = Cl;

XVI – XIX = R<sup>1</sup> = NO<sub>2</sub>, R<sup>2</sup> = H;  
XX – XXII = R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = NO<sub>2</sub>;

I – R<sup>3</sup> = 2',4' – (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;  
II – R<sup>3</sup> = 2',5' – (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;  
III – R<sup>3</sup> = 4' – OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>;  
IV – R<sup>3</sup> = 2' – NO<sub>2</sub>;  
V – R<sup>3</sup> = 3' – NO<sub>2</sub>;  
VI – R<sup>3</sup> = 4' – NO<sub>2</sub>;  
VII – R<sup>3</sup> = 2' – Cl;  
VIII – R<sup>3</sup> = 4' – Cl;

IX – R<sup>3</sup> = 4' – N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;  
X – R<sup>3</sup> = 2',4' – (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;  
XI – R<sup>3</sup> = 2' – OCH<sub>3</sub>;  
XII – R<sup>3</sup> = 3' – Br;  
XIII – R<sup>3</sup> = 2' – Cl;  
XIV – R<sup>3</sup> = 2' – NO<sub>2</sub>;  
XV – R<sup>3</sup> = 2',6' – Cl<sub>2</sub>, 4' – NO<sub>2</sub>;

XVI – R<sup>3</sup> = H  
XVII – R<sup>3</sup> = 4' – OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>;  
XVIII – R<sup>3</sup> = 2' – Cl;  
XIX – R<sup>3</sup> = 2' – NO<sub>2</sub>;  
XX – R<sup>3</sup> = 2',5' – (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>;  
XXI – R<sup>3</sup> = 4' – OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>;  
XXII – R<sup>3</sup> = 4' – OC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>;

Рис. 1. Мідні та алюмінієві комплекси 3-нітро-, 3,5-динітро- та 3,5-дихлор-N-фенілантранілових кислот.

їх здатність пригнічувати розвиток набряку при гострому запаленні, яке викликали субплантарним введенням 1 % розчину карагеніну в лапку миші [4]. Досліджувані металокомплекси вводили перорально у дозах 10, 20, 25 мг/кг маси тіла тварини. Препаратами порівняння були вольтарен та мефенамова кислота.

Аналгетичну дію вивчали на білих щурах. Показником аналгетичного ефекту був час (с), протягом якого тварина витримувала тепловий опік шкіри хвоста при температурі 100 °С. Зазначений час реєстрували автоматично [4]. Вивчали аналгетичну активність у дозі 20 мг/кг при внутрішньошлунковому введенні.

Дослідження жовчогінної активності проводили за методом М.П. Скакуна та А.М. Олейник [4]. Сполуки (I-X, XII, XIV, XXI) вводили у дванадцятипалу кишку в дозі 150 мг/кг у вигляді зависі з твіном-80 після першої години вивчення швидкості секреції жовчі. Швидкість секреції жовчі виражали у мг/хв на 100 г маси і порівнювали з показником швидкості секреції жовчі в інтактних щурів.

Бактеріостатичну активність синтезованих сполук вивчали *in vitro* за методикою двократних серійних розведень [4] у рідкому живильному середовищі.

Вивчення нейролептичної дії сполук проводили за методикою [4] на білих безпородних щурах масою 150-190 г у дозі 0,1 LD<sub>50</sub> (внутрішньочеревно). Нейролептичну активність синтезованих речовин порівнювали з аміназином.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Серед металокомплексів 3-нітро-, 3,5-динітро- та 3,5-дихлор-N-ФАК кислот найбільшу протизапальну активність проявляють сполуки (III, VII, VIII,

XV, XVIII, XX, XXI), їх дія знаходиться на рівні мефенамової кислоти. Активність металокомплексів збільшується пропорційно дозі (табл. 1). Мідні комплекси 3,5-динітро-N-ФАК (IV, VI, VII, VIII) та алюмінієвий комплекс (XXI) цієї ж кислоти також виявляють помірний аналгетичний ефект. Враховуючи, що антраль (алюмінієвий комплекс мефенамової кислоти) має гепатопротекторні властивості, синтезовані металокомплекси досліджували на проявлення ними жовчогінної та гепатопротекторної активності. З 13 вивчених речовин тільки у 5 є холеретичні властивості (I, VII, IX, XII, XIV), але гепатопротекторної дії у них не виявлено.

Також встановлено, що мідні комплекси 3,5-динітро-N-ФАК (II, IV, V, VI, VII) та алюмінієві комплекси 3-нітро-N-ФАК (XVI, XVIII, XIX) потенціюють дію субнаротичних доз барбітуратів на рівні аміназину.

Бактеріостатична активність металокомплексів N-ФАК відносно грампозитивних та грамотрибутивних мікроорганізмів перебуває у межах 31,2-500 мкг/мл.

За класифікацією К.К. Сидорова, синтезовані металокомплекси належать до малотоксичних сполук (табл. 1).

**ВИСНОВКИ.** 1. З метою пошуку біологічно активних речовин здійснено синтез і встановлено будову мідних та алюмінієвих комплексів 3-нітро-, та 3,5-динітро- і 3,5-дихлор-N-фенілантранілових кислот.

2. У ході біологічних досліджень визначено, що металокомплекси N-фенілантранілових кислот виявляють виражену протизапальну, аналгетичну, жовчогінну, нейролептичну та слабку бактеріостатичну активність.

Таблиця 1 – Біологічна активність та гостра токсичність металокомплексів N-фенілантранілових кислоти

Сполуки	Протизапальна, % у дозі			Анальгетична, % у дозі 20 мг/кг	Взаємодія з барбітуратами, % у дозі 0,1 LD <sub>50</sub>	Жовчогінна, % у дозі 150 мг/кг	LD <sub>50</sub> , мг/кг*	Бактеріостатична, МПК, мкг/мл			
	10 мг/кг	20 мг/кг	25 мг/кг					Золотистий стафілокок	Сінна паличка	Кишкова паличка	Синьогійна паличка
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Мідні комплекси 3,5-динітро-М-фенілантранілових кислот											
I	21,3	-	29,6	16,2	109,0±9,1	43,4	350,0±9,4 >2000	125	250	125	125
II	12,8	-	22,6	18,4	134,0±10,3	30,2	308,4±6,6 >2500	125	250	125	250
III	29,6	-	35,3	29,7	88,2±5,2	11,6	298,2±7,3 >2000	125	250	125	250
IV	0	-	14,3	44,2	129,4±9,7	0	154,3±10,9	62,5	125	31,2	62,5
V	0	-	18,1	39,4	132,3±9,9	0	164,2±10,9	62,5	125	31,2	125
VI	0	-	20,6	56,1	130,4±10,3	0	140±9,7	62,5	125	62,5	125
VII	11,4	-	33,6	44,1	146,2±5,8	40,6	388,2±8,8	125	125	125	250
VIII	22,6	-	39,1	40,9	104,0±6,1	26,1	406,0±1,4	125	250	125	250
IX	0	-	28,7	36,3	90,0±4,8	39,6	450,0±12,4 >2500	125	250	125	125
Мідні комплекси 3,5-дихлор-М-фенілантранілових кислот											
X	0	-	5,52	-	-	15,0	-	-	-	-	-
XI	17,1	-	28,3	-	-	-	-	-	-	-	-
XII	U	-	0	0	-	35,9	-	125	62,5	62,5	125
XIII	12,3	-	29,6	-	-	-	-	125	125	-	125
XIV	19,1	-	28,3	-	-	35,9	-	-	-	-	-
XV	21,4	-	35,3	21,3	-	-	- >2000	125	62,5	62,5	62,5
Алюмінієві комплекси 3-нітро- та 3,5-динітро-М-фенілантранілових кислот											
XVI	-	12,1	-	-	151,9±1,5	-	234,0±8,1	62,5	250	125	125
XVII	-	30,0	-	-	-	-	346,0±8,0	250	250	250	500
XVIII	-	36,5	-	-	150,5±5,1	-	163,0±11,6 >2000	62,5	125	125	125
XIX	-	0	-	-	139,0±3,0	-	150,0±8,6	62,5	62,5	125	125
XX	-	-	33,4	35,1	-	-	- >2000	125	125	62,5	250
XXI	-	-	30,2	45,2	-	5,1	- >2000	250	250	250	250
XXII	-	-	21,2	13,7	-	-	- >2000	125	250	125	250
Вольтарен (DE <sub>50</sub> )	37,5			-	-	-	80,0 363	-	-	-	-
Анальгін (DE <sub>50</sub> )	-			55,0	-	-	- 1197	-	-	-	-
Аміназін	-			-	134,9±5,4	-	51	-	-	-	-
Оксафенамід	-			-	-	59,0	- 4000	-	-	-	-
Мефенамова кислота у дозі 100 мг/кг	30,0			-	-	-	128 620	-	-	-	-
Етакридину лактат	-			-	-	-	21	31,2	15,6	31,2	62,5

Примітка. \* – числівник: LD<sub>50</sub> визначено при внутрішньочеревному введенні; знаменник: LD<sub>50</sub> визначено при внутрішньошлунковому введенні.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Бризицький О.А., Свєчнікова О.М., Ісаєв С.Г. та ін. Дослідження біологічної дії металокомплексів нітрозаміщених N-фенілантранілових кислот // Мед. хімія. – 2001. – 3, № 4. – С. 44-47.
2. Брунь Л.В., Зупанець І.А., Ісаєв С.Г. та ін. Експериментальне дослідження взаємозв'язку протизапальних та репаративних властивостей N-фенілантранілових кислот та похідних глюкозаміну // Фізіоло-

гічно активні речовини. – 2002. – № 2 (34). – С. 65-69.

3. Даниленко В.С., Чернорштан К.О., Кузьменко І.Й. та ін. Дифторант – новий фторвмісний нестероїдний протизапальний препарат для дерматології та отоларингології // Наукові основи розробки лікарських препаратів: Матеріали Наукової сесії Відділення хімії НАН України. – Харків, 1998. – С. 230-240.

4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.

5. Ісаєв С.Г., Зупанець І.А., Павлій О.І. Синтез, будова та біологічна активність Д-(+)-глюкозамонієвих солей 3,5-дихлор-N-фенілантранілових кислот // Фармац. журн. – 2001. – № 2. – С. 53-57.

6. Ісаєв С.Г., Зупанець І.А., Павлій О.О., Брунь Л.В. Синтез нітро-N-фенілантранілових кислот у твердій фазі та їх біологічна активність // Вісник фармації. – 2001. – № 3 (27). – С. 44-45.

7. Ісаєв С.Г., Катречко Т.А., Друговіна В.В. та ін. Калієві солі 3-нітро-N-фенілантранілових кислот, їх синтез та біологічна активність // Лекарства человека. – 2002. – 17, № 1. – С. 177-181.

8. Ісаєв С.Г., Павлій О.І., Зупанець І.А., Яременко В.Д. Синтез, будова та протизапальна актив-

ність Д-(+)-глюкозамідів 3-нітро-N-фенілантранілових кислот // Фармац. журн. – 2001. – № 1. – С. 86-89.

9. Ісаєв С.Г. Получение, строение и биологическая активность замещенных 3,5-динитро-N-фенилантранилиловой кислоты и 5,7-динитроакридонов-9 // Лекарства – человеку. – 2000. – 12, № 1. – С. 54-58.

10. Крисс Е.Е., Волченкова И.Н., Григорьева А.С. и др. Координационные соединения в медицине. – К.: Наук. думка, 1986. – 216 с.

11. Павлій О.О., Брунь Л.В., Ісаєв, С.Г., Зупанець І.А. Д-(+)-глюкозиламонієві солі N-фенілантранілових кислот, їх синтез та біологічна активність // Мед. хімія. – 2002. – 4, № 3. – С. 81-83.

12. Пат. 33114А Україна, МПК С 07 С 205/06 С 07 С 229/58. Спосіб одержання заміщених 3-,4-, 5-,6-нітро-2-N-фенілантранілових кислот / Ісаєв С.Г., Павлій О.І., Зупанець І.А. та ін. (Україна). – Заявл. 01.12.98; Опубл. 19.02.2001, Бюл. № 4. – 3 с.

13. Удосконалений спосіб синтезу нітрозаміщених N-фенілантранілових кислот у водному середовищі з використанням гетерогенного каталізатора: Інформ. лист № 43-2003 / Ісаєв С.Г., Павлій О.О., Бризицький О.А. та ін. – К., 2003. – Вип. 2 з проблеми "Фармація" – 2 с.

## СИНТЕЗ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ N-ФЕНИЛАНТРАНИЛОВЫХ КИСЛОТ

С.Г. Исаев, А.А. Бризицкий, Е.Н. Свечникова  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

### Резюме

Осуществлен синтез медных и алюминиевых комплексов 3-нитро-, 3,5-динитро- и 3,5-дихлор-N-фенилантранилиловых кислот через стадию образования натриевых или калиевых солей соответствующих кислот. Строение и чистоту металлокомплексов подтверждено данными элементного, ИК-спектрального и хроматографического анализа, качественными реакциями. Установлено, что синтезированные вещества проявляют противовоспалительную, анальгетическую, нейролептическую, желчегонную и бактериостатическую активность. По классификации К.К. Сидорова, медные и алюминиевые комплексы N-фенилантранилиловых кислот при внутрибрюшном и внутривентриальном введении относят к классу малотоксичных веществ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: синтез, N-фенилантраниливые кислоты, медные и алюминиевые комплексы, фармакологическая активность.

## SYNTHESIS AND PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF METAL COMPLEXES OF N-PHENYLANTHRANILIC ACIDS

S.G. Isayev, O.A. Bryzitsky, O.M. Sviechnikova  
NATIONAL PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, KHARKIV

### Summary

The synthesis of copper and aluminium complexes of 3-nitro-, 3,5-dinitro- and 3,5-dichlor-N-phenylanthranilic acids through the stage of formation of sodium and potassium salts of the appropriate acids is carried out. The structure and clearance of metal complexes is confirmed by the data of element, IR-spectral and chromatographic analysis, qualitative reactions. It is established, that the synthesized substances have antiinflammatory, analgetic, neuroleptic, cholagogic and bacteriostatic activity. Copper and aluminium complexes of N-phenylanthranilic acids by K.K. Sydorov's classification belong to a class of slightly toxic substances at intraperitoneal and intragastric introduction.

KEY WORDS: synthesis, N-phenylanthranilic acids, copper and aluminium complexes, pharmacological activity.

Отримано 21.10.2003 р.

Адреса для листування: О.А. Бризицький, кафедра аналітичної хімії, Національний фармацевтичний університет, вул. Блюхера, 4, Харків, 61146, Україна.

## ТРИПСИНОПОДІБНІ ПРОТЕАЗИ КРОВІ ЛЮДИНИ – ОСНОВА ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ПРОТИВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ

**В.А. Дівоча, В.М. Михальчук**  
ОДЕСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

*Еритроцитарна маса, сироватка і плазма донорської крові людини містять велику кількість трипсиноподібної протеази. Найбільше її в плазмі, особливо 4 групи крові.*

*Триразові заморожування і розморожування еритроцитарної маси з подольшим центрифугуванням не впливали на збільшення вмісту трипсиноподібної протеази.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** протеази, противірусні препарати, гемаглютиніни, гамма-глобулін, альбумін, імуноглобулін.

ВСТУП. Незважаючи на широкі наукові програми, присвячені грипу, і прийняті в багатьох країнах світу, успіхи в лікуванні цього захворювання досить обмежені. Проблеми терапії і досі актуальні, оскільки методи специфічної профілактики та імунотерапії грипу недостатньо ефективні через виражену варіабельність вірусів хвороби. Арсенал засобів специфічної хімотерапії грипу обмежений амантадином і його аналогами. Однак препарати даної групи не принесли великих успіхів, тому що мали лише м'який профілактичний і терапевтичний ефекти та діяли не на всі штами, а тільки на вірус грипу А. Один з поверхневих глікопротеїдів вірусу грипу гемаглютинін, відповідальний за ранні етапи (адсорбцію і проникнення) взаємодії вірусу з клітиною, існує в двох формах: у вигляді нерозщепленого поліпептиду гемаглютиніну (НА) з молекулярною масою ~75000 D і в розщепленій формі, що складається з двох поліпептидів НА1 (~50000 D) і НА2 (~25000 D), з'єднаних дисульфідним зв'язком. Розщеплення НА на НА1 і НА2 має важливе значення в біології вірусу грипу, оскільки необхідне для повної інфекційності віріонів. Розщеплення вірусного гемаглютиніну здійснюється протеазами клітини-господаря [11]. У більш патогенних штамів НА більш чутливий до протеаз [10, 13, 14]. З цих даних випливає, що протеолітична активація віріонів

© В.А. Дівоча, В.М. Михальчук, 2003.

є одним із ключових механізмів у розвитку грипозної інфекції. Інгібітори протеаз хімічного походження блокують даний процес і є ефективними інгібіторами розвитку грипозної інфекції [1, 5, 6], але вони токсичні для клітини-господаря, тому їх мало застосовують у клініках. У ході своїх досліджень ми одержали позитивний ефект при використанні інгібітора трипсиноподібних протеаз, отриманих із клітин здорових легких мишей [4]. Щоб перейти до застосування інгібітора трипсиноподібних протеаз для лікування вірусних інфекцій у людей, ми вирішили перевірити наявність серинових протеаз і їхніх інгібіторів у відходах альбумінового і гамма-глобулінового виробництва.

Метою наших досліджень була перевірка наявності серинових (трипсиноподібних) протеаз у крові людини, препаратах з донорської крові людини і фракціях одержання альбуміну і гамма-глобуліну промисловим способом.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** У роботі використовували: донорську кров тридцяти чоловік; плазму людини чотирьох груп крові; фракції очищення й одержання альбуміну і гамма-глобуліну; інтерферон, імуноглобулін людський; герпетичну, гонококову і туляремійну вакцини.

Консервовану еритроцитарну масу тридцяти донорів отримували з відділення реанімації

другої міської клінічної лікарні м. Одеси. Еритроцитну масу з простроченим терміном придатності (після 21 доби) одержували з Одеської обласної станції переливання крові. Інтерферон лейкоцитарний людський – серії 751,468 і 754, термін придатності – до 10.2000 р.; імуноглобулін людський плацентарний донорський, Київ, "Биофарм", 10 %, серії 59-798, термін придатності – до 07.2000 р. Плазму людини чотирьох груп крові та фракції очищення альбуміну і гамма-глобуліну двох серій отримували з обласної станції переливання крові.

Одну половину еритроцитарної маси консервованої людської крові піддавали триразовому заморожуванню і відтаненню та центрифугуванню при 7000 об/хв для розриву еритроцитів і більшого виходу ферментів трипсиноподібної протеази в супернатант. Другу частину використовували у вихідному стані, тобто не піддавали ніяким процедурам. Фракції очищення альбуміну і гамма-глобуліну розчиняли в 0,01 М фосфатному буфері і ставили в холодильник на 18 год при температурі +4 °С, надалі центрифугували при 7000 об/хв і в роботі застосовували супернатант. В усіх перерахованих вище препаратах перевіряли наявність трипсиноподібної протеази за методом [2] і загального білка за методом [12].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Для одержання інгібітора трипсиноподібних протеаз з відходів сироваткового виробництва треба було визначити наявність протеаз у всіх препаратах крові, використовуваних для внутрішньом'язового введення і на всіх етапах отримання гамма-глобуліну й альбуміну.

Як показали дослідження, у сироватці і плазмі донорської крові визначається протеазна активність (рис. 1), найбільша вона в донорів, що мають четверту групу крові. Донорів із третьою групою крові з 30 чоловік не було жодного. Еритроцитарна маса донорської крові містила протеази в 1,5 раза більше, ніж її було в сироватці крові. В еритроцитарній масі донорської крові четвертої групи протеазна активність була в 2 раза вища, ніж у сироватці крові цієї ж групи. Одну частину еритроцитарної маси донорської крові піддали триразовому заморожуванню і відтаненню для розриву еритроцитів і більшого виходу ферменту і надосадової рідин. Другу частину залишили у вихідному стані. Повторні заморожування і відтанення не впливали на збільшення вмісту трипсиноподібної протеази в еритроцитарній масі донорської крові. Рівень загального білка у препаратах еритроцитарної маси був у 2 рази вищим порівняно з даним білком, що визна-

чався у сироватці й плазмі крові. Комерційні препарати імуноглобуліну, інтерферону, що виготовлені з крові людини, також проявляли протеазну активність (рис. 2). У препараті сухої плазми крові, що зберігалася кілька років у холодильнику, також знайдено сліди протеазної активності. При вивченні донорської крові людини, залежно від терміну її забору, виявлено, що протеазна активність зберігалася на одному рівні незалежно від моменту забору крові. Донорська кров через 21 день після забору вже не використовується для переливання хворим і йде на утилізацію. Протеазна активність у донорській крові через 22 доби перебуває на тому ж рівні, що й у перші дні після забору.

Таким чином, у всіх препаратах донорської крові людини виявлено трипсиноподібну протеазу. Високими були її показники і в простроченій крові, що йде на утилізацію.

Для вирішення питання щодо одержання інгібітора трипсиноподібної протеази як противірусного препарату ми вирішили використовувати промислові відходи сироваткового виробництва. Одержанням гамма-глобуліну й альбуміну з крові людини в нас займається обласна станція переливання крові. Зі станції переливання крові ми взяли фракції гамма-глобуліну й альбуміну, виділених методом Кона з донорської крові. На першому етапі з плазми крові виділяють фракцію II+III і фібриноген, який викидають. Дану фракцію використовують для виділення та очищення імуноглобуліну й альбуміну. Ми одержали центрифугат і осад фракції II+III. На рисунку 2 (1-ша колонка) показано, що ця фракція містить трипсиноподібну протеазу на високому рівні, особливо осад (рис. 2 – 2 колонка), що використовується надалі для виділення гамма-глобуліну. Надосадова рідина, що йде на викид, містить значну кількість трипсиноподібної протеази. Відмитий осад як проміжну стадію використовують для виділення протромбіну. На цій стадії випадає осад, що містить велику кількість альфа-, бета-глобулінів і ліпоїдів. Як показали дослідження, в ньому найвищі показники протеазної активності (рис. 2 – 3-тя колонка). Центрифугат цієї стадії використовують для осадження гамма-глобуліну. В комерційному імуноглобуліні, закупленому нами в аптеках міста (3 серії), також виявлено протеазу, що має досить високі показники (рис. 2 – 6-та колонка). Це свідчить про те, що одержуваний гамма-глобулін промисловим способом недостатньо очищений. Промисловий спосіб гарантує 97 % чистоти препарату, але це ще не говорить про його гомогенний стан. 3 % можуть містити не

тільки протеази, але, очевидно, і інші ферменти, у тому числі інгібітори протеаз.

Таким чином, контроль препаратів за МРТУ № 8 від 04.10.65 р. явно застарів.

Одержання альбуміну: після осадження гамма-глобуліну в осад йде чистий імуноглобулін, а центрифугат використовується для виділення альбуміну. На рисунку 2 (4-та колонка) показано, що ця фракція піддається фільтруванню для одержання чистого альбуміну. Після фільтрування вона втрачає велику кількість ферменту протеази (рис. 2 – 5-та колонка). Ферменти, що осіли при фільтруванні на паперові фільтри, надалі викидають.

Таким чином, на всіх етапах одержання гамма-глобуліну й альбуміну фракції, що йдуть на викид і утилізацію, містять велику кількість трипсиноподібної протеази і їх надалі можна використовувати для виділення трипсиноподібної протеази.

Одержання противірусних препаратів украй важливе для охорони здоров'я. Наявні в арсеналі медпрацівників ремантадин і його аналоги дуже м'яко діють при грипі А і в основному використовуються як профілактичні препарати.

Трипсиноподібна протеаза відіграє ключову роль у розвитку патологічного процесу в організмі. Вона розщеплює зовнішній білок вірусу грипу гемаглютинін на дві субодиниці, тільки після цього вірус проникає в клітину і починає розмножуватися. У ході експериментальних досліджень нами встановлено, що клітинний інгібітор може її блокувати, тоді вірусна інфекція у тварин не розмножується і вони залишаються живі, навіть після зараження їх смертельною дозою вірусу. Тому метою таких досліджень стала перевірка відходів

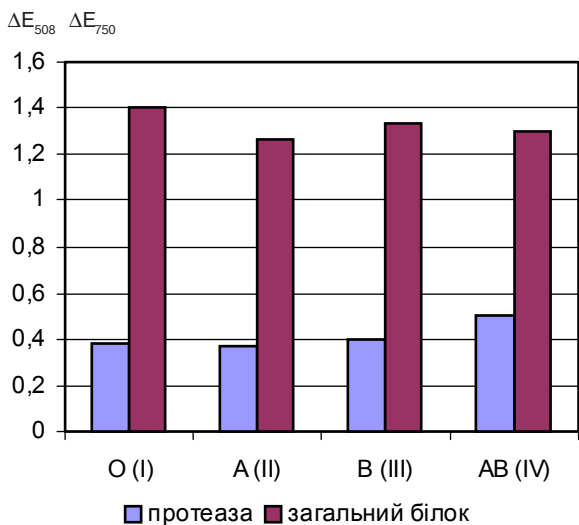


Рис. 1. Наявність трипсиноподібної протеази в плазмі крові здорової людини по групах крові.

сироваткового виробництва, одержання альбумінів і гамма-глобулінів на наявність у них серинових ферментів і їхніх інгібіторів.

Як показали наші дослідження, у всіх препаратах крові людини, тобто в еритроцитарній масі, плазмі й сироватці, ми виявили велику кількість трипсиноподібної протеази. Інгібітор протеази не було перевірено через відсутність хімічних реактивів для проведення досліджень.

Консервована еритроцитарна маса через 21 день після забору крові в донора йде на утилізацію. За нашими даними, у цих препаратах трипсиноподібна протеаза зберігається на високому рівні, і її можна використовувати для виділення серинових протеаз. На першому етапі одержання гамма-глобуліну й альбуміну з фракції II+III, за Коном, відокремлюється фібриноген. У ці відходи входить фактор X, що, за даними японських учених [9], гомологічній трипсиноподібній протеазі, яка нарізує гемаглютинін вірусу грипу на єдиній аргеніновій ділянці. Серинова протеаза трипсиноподібного типу і фактор X не тільки структурно, але і функціонально гомологічні один одному.

На другому етапі одержання гамма-глобуліну йде на утилізацію осад, що містить протромбін, велику кількість альфа-, бета-глобулінів і ліпоїдів. За результатами наших досліджень, цей осад містить найвищі показ-

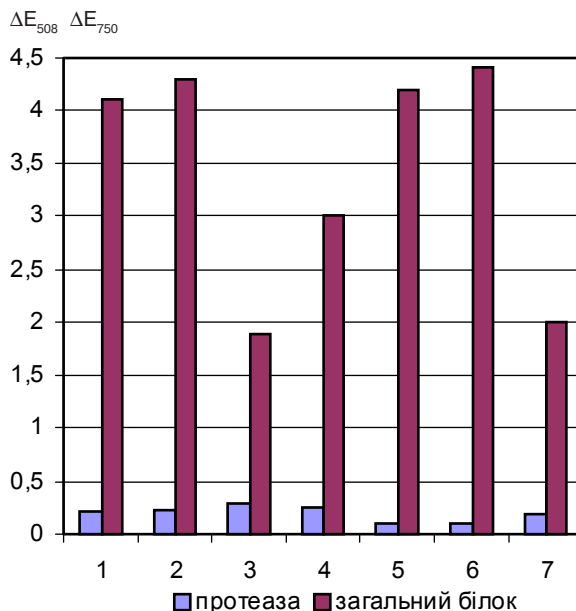


Рис. 2. Наявність трипсиноподібної протеази у фракціях одержання людського альбуміну і гамма-глобуліну та в імуноглобуліні й інтерфероні людському.

1. Стадія I – фракція II+III. 2. Стадія I – осад фракції II+III. 3. Стадія II – осад протромбіну альфа-глобуліну і ліпоїдів. 4. Стадія IV – осад. 5. Стадія V – фільтрат центрифугату № 3 (чистий альбумін). 6. Імуноглобулін людський. 7. Інтерферон людський.

ники трипсиноподібної активності. Вони підтверджені й роботами Львівського НДІ гематології і переливання крові [3]. Метод афінної хроматографії є найбільш ефективним при одержанні високоочищених препаратів тромбіно-серинової протеази плазми крові. У зону альфа-глобулінів входить і  $\alpha_1$ -антрисиптин [8]. Основним інгібітором серинових протеаз плазми крові людини є  $\alpha_1$ -антрисиптин або  $\alpha_1$ -інгібітор протеаз [7].

На третьому етапі одержання гамма-глобулінів іде на утилізацію осад, що містить профібринолізин (плазміноген), з якого можна виділити плазмін (фібринолізин) – протеолітичний фермент (трипсиноподібну протеазу).

На четвертому етапі одержання гамма-глобуліну, коли відбувається фільтрація центрифугату № 3 для отримання чистого альбуміну, на паперових фільтрах залишається велика кількість трипсиноподібної протеази, що йде на утилізацію.

Таким чином, трипсиноподібну протеазу й, очевидно, її інгібітори можна одержати з від-

ходів виробництва альбуміну і гамма-глобулінів, з донорської крові людини, що дозволить повніше використовувати білки крові людини, підвищити економічну доцільність фракціонування, збільшити номенклатуру препаратів крові, що призведе до зниження собівартості їхнього виробництва.

**ВИСНОВКИ.** 1. Величина протеазної активності в еритроцитарній масі не залежить від терміну забору крові у донора.

2. Комерційні препарати імуноглобулін людський, інтерферон людський, містять трипсиноподібну протеазу, тобто їх очищення не достатнє. Визначення протеазної активності в комерційних препаратах може бути маркером чистоти препарату.

3. Відходи промислового виробництва гамма-глобуліну й альбуміну з донорської крові людини можна застосовувати для одержання серинових протеаз, що дозволить збільшити номенклатуру препаратів крові та знизити собівартість їх виробництва.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Букринская А.Г., Кицак В.Я., Мойснаді С.А., Архелов С.А. Подавление репродукции ротавируса SA-11 ингибиторами протеаз в культуре клеток // *Вопр. вирусологии.* – 1987. – № 1. – С. 71-74.

2. Веремеенко К.Н. Ферменты в отоларингологии / Под ред. К.Н. Веремеенко. – К.: Здоровье, 1980. – С. 147-149.

3. Гайда А.В., Монастырский В.А., Мачеровский Ю.В. Хроматография тромбина на модифицированных кремнеземах: роль матрицы Снейсера и величины рН // *Биотехнология.* – 5, № 4. – С. 449-454.

4. Дівоча В.А., Вовчук С.В., Адамовська В.Г. Вивчення дії клінічного інгібітора на розвиток вірусу грипу // 36. "Актуальні проблеми мікробіології, епідеміології, паразитології та профілактики інфекційних хвороб". – 1992. – С. 146-147.

5. Жирнов О.П., Овчаренко А.В. Новый подход к лечению гриппа: блокирование протолитической активации вируса // *Вопр. вирусологии.* – 1985. – № 4. – С. 450-456.

6. Лоцицкий В.П., Федчук А.С., Пузис Л.Е. и др. Участие системы протеолиза в реализации вирулентности вируса гриппа и развитии инфекционного

процесса; Противовирусное действие ингибиторов протеаз // *Вопр. вирусологии.* – 1987. – № 4. – С. 413-419.

7. Подарьяе С.М., Лецжне М.Н., Маурицас М.М., Плаичюие Р.Р. // *Иммуноаффимная очистка  $\alpha$ -ингибитора протеаз из плазмы крови человека* // *Вопр. мед. химии.* – 1992. – 5. – С. 96-99.

8. Фром А.А., Скобелев Л. И., Русанов В.М., Никитенко А.А. Белки плазмы крови и их функционирование в производстве препаратов крови. – М., 1974. – С. 5-44.

9. Binn Goton, Tomohiko Odasawara, Tetsuya Tojoda, Woel M. Inonencio, Michinari Hamaguchi and Joshiyuki nadai // *An endoprotease homologous to the blood doting factor X as a determinant of viral tropism in chick embryo. The EMBO Journal.* – 1990. – 9, № 2. – P. 4189-4195.

10. Bosch F., Orlich M., Klenk H-D., Rott R. // *The structure of the hemagglutinin? A determinant for the pathogenity of influenza viruses* // *Virology.* – 1979. – № 95. – P. 197-207.

11. Klenk H-D, Rott R., Orlich V. Further studies of the action of influenza virus by proteolytic cleavage of the hemagglutinin // *J. Gen. Virol.* – 1990. – № 36. – P. 151-161.

12. Lowry O.H. Protein measurement with the Folin reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**. – P. 265-275.

13. Rott R., Reinacher G.L., Klenk H-D // Cleavability of hemagglutinin determines spread of avian influenza viruses in the chorioallantoic membrane of chicken embryo // Arch. Virol. – 1980. – № 65. – P. 123-133.

14. Vallbracht A., Schattissek C., Flehming B., Gerth H-S // Recombination of influenza. A strain with F0M1 plague virus can change pneumotropism for mice to a generalized-infection with involvement of the central nervous system // Virology. – 1980. – № 107. – P. 542-560.

## ТРИПСИНОПОДОБНЫЕ ПРОТЕАЗЫ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА – ОСНОВА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

**В.А. Дивоча, В.М. Михальчук**  
ОДЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

### Резюме

*Эритроцитарная масса, сыворотка и плазма донорской крови человека содержит большое количество трипсиноподобной протеазы. Больше всего ее находится в плазме, особенно 4 группы крови.*

*Трехкратное замораживание и размораживание эритроцитарной массы с последующим центрифугированием не влияло на увеличение содержания трипсиноподобной протеазы.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** протеазы, противовирусные препараты, гемагглютинины, гамма-глобулин, альбумин, иммуноглобулин.

## TRYPsin-SIMILAR PROTEASES OF HUMAN BLOOD SERUM IS THE BASIS FOR OBTAINING ANTI-VIRAL REMEDIES

**B.A. Divocha, V.M. Mykhalchuk**  
ODESA STATE MEDICAL UNIVERSITY

### Summary

*Erythrocytic mass, serum and plasm of human donor blood contain a great quantity of trypsin-similar protease. Its largest quantity is in plasm, especially of the 4-th blood group.*

*Three-time freezing and unfreezing of erythrocytic mass with the further centrifugation didn't have an influence upon the increasing of trypsin-similar protease contents.*

**KEY WORDS:** proteases, anti-viral remedies, hemagglutinines, gamma-globulin, albumin, immunoglobulin.

Отримано 09.04.2003 р.

**Адреса для листування:** В.М. Михальчук, Одеський державний медичний університет, пров. Валіховський, 2, Одеса, 65001, Україна.



УДК 615.015.4

**БІОХІМІЧНІ АСПЕКТИ ДІЇ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ.****I. ВПЛИВ НА МІЖ- І ВНУТРІШНЬОКЛІТИННУ СИГНАЛІЗАЦІЮ****Я.І. Гонський, Т.П. Максимчук<sup>1</sup>***ТЕРНОПІЛЬСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ІМ. І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО  
ІВАНО-ФРАНКІВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ<sup>1</sup>*

*У роботі зроблено спробу узагальнення численних даних про механізми дії лікарських засобів на молекулярному рівні. Основну увагу зосереджено на молекулах-мішенях для лікарських засобів: рецепторах і компонентах пострецепторних систем трансдукції сигналів. Показано значення фундаментальних досліджень для цілеспрямованого створення нових ефективних і вибірково діючих лікарських засобів.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** лікарські засоби, механізми дії, молекули-мішені.

Ефективна фармакологічна корекція порушень обміну речовин, внутрішньоклітинних та нервово-гуморальних механізмів регуляції, що лежать в основі розвитку більшості патологічних процесів, потребує розкриття молекулярних механізмів дії лікарських засобів (ЛЗ), вивчення залежності "структура – активність" з метою створення нових високоефективних і вибірково ЛЗ. На молекулярному рівні комплекс змін в організмі під впливом ЛЗ, перш за все механізми первинної фармакологічної реакції, вивчає погранична галузь біохімії та фармакології – біохімічна фармакологія [12, 14]. Початковим етапом вивчення механізмів дії ЛЗ на молекулярному рівні є виявлення і дослідження молекулярних структур (мішеней чи рецепторів), з якими взаємодіє ЛЗ. Ідея про рецепторний механізм дії ЛЗ була висунута в працях Ерліха і Ленглі на початку ХХ століття [1]. Одночасно концепцію про рецепторні молекули інтенсивно розробляли у біохімії та фізіології стосовно механізмів регуляторної дії гормонів, нейромедіаторів та інших ендогенних сигнальних молекул (СМ) [2-4, 11].

Саме рецептори ендогенних СМ є мішенями для ЛЗ, які за результатом взаємодії з рецепторами поділяють на агоністи (міметичні речовини) та антагоністи (блокуючі або літичні речовини). Як ЛЗ-агоністи використовують власне самі ендогенні СМ (нейромедіатори, гормони та гормоноподібні речовини, цитокіни, фактори росту тощо) та їх чисельні синтетичні

аналоги. Ендогенні біологічно активні речовини (СМ) застосовують як ЛЗ у фізіологічних дозах при замісній та патогенетичній терапії і у значно вищих за фізіологічні при фармакодинамічній терапії [6, 12, 14].

Дію ЛЗ-агоністів чи антагоністів вважають вибірковою, якщо вони взаємодіють тільки з функціонально однозначними рецепторами і не впливають на інші рецептори. Проте загальноприйнятим є твердження, що абсолютної вибіркової дії ЛЗ практично не існує [14]. Деякі ЛЗ можуть бути агоністом одного рецептора й антагоністом іншого.

За останні десятиріччя виділено і детально охарактеризовано рецептори більшості ендогенних СМ [9, 16, 17]. Зараз ведеться цілеспрямований синтез ЛЗ, комплементарних лігандозв'язувальним центрам конкретних рецепторних молекул [13]. Так, синтезовано та впроваджено у клінічну практику ЛЗ, які вибірково взаємодіють з певними підтипами рецепторів СМ (ацетилхоліну, катехоламінів, серотоніну, гістаміну, ГАМК тощо) [6, 12, 13].

Численні дослідження присвячено вивченню пострецепторних систем передачі (трансдукції) сигналів гормонів, нейромедіаторів, цитокінів та ЛЗ, що імітують чи блокують внутрішньоклітинні ефекти ендогенних СМ [2-4, 7, 16, 17]. Відомі декілька типів рецепторів, що розрізняються місцем локалізації в клітині та механізмами передачі сигналу на ефекторні системи клітини (табл. 1).

За локалізацією рецептори СМ поділяються на: а) поверхневі – трансмембранні білки

© Я.І. Гонський – д.мед.н., проф., Т.П. Максимчук – к.мед.н., 2003.

плазматичної мембрани клітин; б) внутрішньоклітинні – цитозольні, ядерні, мітохондріальні. Водорозчинні СМ, їх аналоги – агоністи та антагоністи зв'язуються з рецепторами на клітинній мембрані, а ліпофільні сполуки дифундують через плазматичну мембрану і взаємодіють з внутрішньоклітинними рецепторами. Винятком є ліпідорозчинні простагландини, тромбосани і лейкотрієни (ейкозаноїдні гормони), які зв'язуються з рецепторами клітинної поверхні.

За механізмом трансмембранної передачі сигналу поверхневі рецептори поділяються на декілька типів (табл. 1). Рецептори для ряду нейромедiatorів є трансмембранними білками, що функціонують як іонні канали (іонотропні рецептори). Зв'язування лігандів-агоністів змінює конформацію рецептора, що зумовлює відкриття іонного каналу. Збільшення трансмембранного потоку певних іонів призводить до зміни електричного потенціалу клітинної мембрани (де- чи гіперполяризації), виникнення збуджувального чи гальмівного постсинаптичного потенціалу. Найбільш вивчено іонотропний рецептор – це нікотиновий холінорецептор. Зв'язування ацетилхоліну та Н-холіноміметиків прямої дії з сайтом на позаклітинному домені  $\alpha$ -субодиниці пентамерної молекули рецептора ( $2\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) призводить до відкриття центрального трансмембранного іонного каналу, через який іони натрію проникають із міжклітинної рідини в клітину. Іонотропні рецептори одночасно є ефекторними

молекулами, тому цей сигнальний механізм є дуже швидкий: інтервал часу між зв'язуванням агоніста з іонотропним рецептором і клітинною реакцією іноді складає мілісекунди. Цим він відрізняється від інших механізмів передачі зовнішніх сигналів, які потребують секунд, хвилин чи навіть годин [2, 16].

Поверхневі рецептори другого типу спряжені з G-білками (білками-перемикачами), які здатні зв'язувати і гідролізувати ГТФ (проявляють ГТФазну активність) та розміщені на внутрішній поверхні плазматичної мембрани. Зв'язування ліганду змінює конформацію рецептора, що зумовлює активацію G-білка. Останній змінює функцію ефекторної молекули (ферменту, іонного каналу). Ефекторні ферменти, активовані G-білками, каталізують реакцію синтезу специфічних вторинних посередників (месенджерів). Дифузія вторинних посередників від плазматичної мембрани в цитозоль забезпечує поширення сигналу до певних ферментів чи білків, які реалізують відповідь клітини на зовнішній сигнал. Родина G-білків включає ряд членів, які зумовлюють активацію або інгібування ефекторних ферментів двох головних сигнальних шляхів – аденілатциклазного і  $Ca^{2+}$ -фосфоінозитидного, а також модулюють проникність іонних каналів [3, 4, 16, 17].  $G_s$ -білки активують трансмембранну аденілатциклазу (АЦ), яка каталізує реакцію синтезу з АТФ вторинного посередника цАМФ. Останній здійснює більшість своїх

Таблиця 1 – Типи рецепторів сигнальних молекул

Характеристика рецепторів	Приклади рецепторів
<i>I. Рецептори плазматичної мембрани клітин (поверхневі)</i> Іонотропні рецептори, що відкривають чи закривають іонні канали в клітинній мембрані	Н-холінорецептор, глутаматні – NMDA, AMPA, КА, серотоніновий – 5-НТ <sub>3</sub> , пуринові – P <sub>2x</sub> , P <sub>2z</sub> , ГАМК <sub>A</sub> , гліциновий
Рецептори, спряжені з G-білками, які: 1) стимулюють аденілатциклазну сигнальну систему 2) інгібують аденілатциклазну сигнальну систему 3) стимулюють фосфоінозитидну сигнальну систему	$\beta_1$ - і $\beta_2$ -адренорецептори, дофамінові – D <sub>1</sub> і D <sub>5</sub> , серотонінові – 5-НТ <sub>4</sub> , 5-НТ <sub>6</sub> , 5-НТ <sub>7</sub> , аденозинові – A <sub>2A</sub> , A <sub>2B</sub> , вазопресиніновий – V <sub>2</sub> , глюкагоновий – GR <sub>2</sub> , гістаміновий – H <sub>2</sub> , АКТГ, ТПГ, ФСГ, ЛГ, МСГ, паратгормону, кальцитоніну, простагландину E <sub>2</sub> , простацикліну M <sub>2</sub> - і M <sub>3</sub> -холінорецептори, $\alpha_2$ -адренорецептор, дофамінові D <sub>2</sub> , D <sub>3</sub> , D <sub>4</sub> , серотонінові – 5-НТ <sub>1A,B,D,E,F</sub> , глутаматні – m Glu-R <sub>2,3,4,6,7,8</sub> , ГАМК <sub>B</sub> , аденозиновий – A <sub>1</sub> , ангіотензиновий – AT <sub>1</sub> , соматостатинінові, опіоїдні – $\mu, \kappa, \delta$ , брадикініновий – B <sub>1</sub>
Рецептори з ферментативною активністю: 1) тирозинової протеїнкінази 2) серинової протеїнкінази 3) гуанілатциклази	Інсуліну, факторів росту (EGF, PDGF, FGF, NGF тощо) TGFB Атріального натрійуретичного фактора (ANF)
Рецептори спряжені з тирозинними протеїнкіназами	Еритропоетину, інтерферонів, ряду цитокінів
<i>II. Внутрішньоклітинні рецептори, що регулюють експресію генів</i>	Стероїдних і тиреоїдних гормонів, вітаміну D, ретиноевої кислоти

ефектів завдяки активації цАМФ-залежних протеїнкіназ. G-білки, навпаки, інгібують активність АЦ, що призводить до зниження внутрішньоклітинного рівня цАМФ. G<sub>q/o</sub>-білки активують асоційований з мембраною фермент фосфоліпазу С, яка каталізує реакцію гідролізу фосфоліпідного компонента плазматичної мембрани – фосфатиділінозитол-4,5-дифосфату (ФІФ<sub>2</sub>) з утворенням двох молекул, що виконують функцію вторинного посередника, – інозитол-1,4,5-трифосфату (ІФ<sub>3</sub>) і діацилгліцеролу (ДАГ). Ліпофільний ДАГ залишається зв'язаним з мембраною, де активує протеїнкіназу С. Розчинний у воді ІФ<sub>3</sub> дифундує в цитоплазму, де зв'язується з білком Ca<sup>2+</sup>-каналу мембрани ER, зумовлюючи відкриття каналу і вихід іонів Ca<sup>2+</sup> з ER у цитозоль. Підвищена концентрація іонів Ca<sup>2+</sup> в цитозолі сприяє зв'язуванню Ca<sup>2+</sup> з рядом кальцієзв'язувальних білків (кальмодулін, тропонін С, легкі ланцюги міозину, S-100 тощо), зумовлюючи їх активацію. Ще більший ряд білків, у тому числі ферментів протеїнкіназ, активуються комплексом "Ca<sup>2+</sup> – кальмодулін".

Отже, вторинні посередники (цАМФ, ДАГ, Ca<sup>2+</sup>), що утворюються в клітині у відповідь на зв'язування СМ з поверхневими рецепторами, спряженими з G-білками, активують різні набори ферментів протеїнкіназ (цАМФ-залежні протеїнкінази А, фосфоліпід- і Ca<sup>2+</sup>-залежні протеїнкінази С, Ca<sup>2+</sup>-кальмодулінозалежні протеїнкінази). Активовані протеїнкінази, у свою чергу, каталізують реакції фосфорилування великої кількості різних білків, у тому числі ферментів, які спільно опосередковують специфічну клітинну відповідь [2-4, 11].

Наступна група рецепторів плазматичної мембрани клітин володіє ферментативною активністю [7, 16, 17]. Ці трансмембранні білки містять позаклітинний домен, який зв'язує ліганди, і цитоплазматичний домен з ферментативною активністю, з'єднані трансмембранним гідрофобним сегментом. Рецептори інсуліну і поліпептидних факторів росту (EGF, PDGF, FGF, NGF тощо) є тирозиновими протеїнкіназами (RTK – рецепторні тирозинкінази), які після активації внаслідок приєднання СМ каталізують реакцію фосфорилування тирозинових залишків цитоплазматичного домену самого рецептора (автофосфорилування) та ряду інших білків. Автофосфорилування RTK збільшує протеїнкіназну активність каталітичного домену та її тривалість. Крім того, фосфорильовані залишки тирозину є місцями для приєднання до RTK адаптерних білків (або докінг-білків), необхідних для пострецепторної передачі сигналу. З RTK можуть зв'язуватись різні докінг-білки, які, формуючи білкові комплекси, включають різні сигнальні шляхи. Зокре-

ма, з інсуліновим рецептором зв'язуються білки IRS-1 і IRS-2 (IRS-субстрат рецептора інсуліну), Gab-1, Shc. Через IRS-1 активується фосфатиділінозитол-3-кіназний сигнальний шлях, який бере участь в інсулінозалежному захопленні клітинами глюкози та активації її метаболізму, в індукованих факторами росту та цитокінами мітогенезі, диференціації, хемотаксисі клітин, змінах цитоскелета. Адаптерний докінг-білок Shc передає сигнал від RTK до внутрішньоклітинного білка Ras, подібного до  $\alpha$ -субодиниці G-білків. Активованій Ras-білок далі активує так званий MAP-кіназний каскад або шлях (каскад ферментів протеїнкіназ, які послідовно каталізують фосфорилування залишків серину і треоніну білків-субстратів). Термінальні MAP-кінази можуть переміщатись в ядро і фосфорилувати різні білки, у тому числі фактори транскрипції, які регулюють експресію специфічних генів, важливих для проліферації і диференціації клітин.

Деякі рецептори-протеїнкінази каталізують фосфорилування в білках-субстратах не залишків тирозину, а залишків серину і треоніну. Такими є рецептори трансформуючого фактора росту (TGF $\beta$ ) та членів його родини (морфогенетичних речовин). А рецептор атріального натрійуретичного фактора (ANF) містить цитоплазматичний домен з гуанілатциклазною активністю. Зв'язування ANF з позаклітинним доменом рецептора активує каталітичний домен, що зумовлює синтез вторинного посередника цГМФ. Останній регулює активність специфічних протеїнкіназ, які забезпечують відповідь клітин-мішеней на ANF (стимуляцію діурезу, регуляцію тону судин і об'єму крові).

Рецептори ліпофільних гормонів (кортикостероїдів, статевих гормонів, тиреоїдних гормонів, активних форм вітаміну Д, ретиноевої кислоти), здатних дифундувати через плазматичну мембрану клітини, розміщені в цитоплазмі та ядрі [2-4, 11, 16, 17]. Цитозольні білки-рецептори кортикостероїдів при відсутності гормону зв'язані з білком теплового шоку (hsp90), який попереджує перехід рецептора в активну конформацію. Приєднання гормонів чи їх синтетичних аналогів до лігандозв'язувального домену викликає відділення молекули hsp90, перехід рецептора у функціонально активний стан і транслокацію гормонорецепторного комплексу в ядро. ДНК-зв'язувальний домен рецептора з'єднується зі специфічними ділянками ДНК (ГЧЕ – гормоночутливими ділянками, response elements), розташованими перед геном, експресію якого регулюють. У результаті індукується транскрипція генів, що містять у регуляторних ділянках відповідні ГЧЕ, а далі синтез набору білків, у тому числі фер-

ментів, що реалізують біологічні ефекти гормону. Первинний ефект стероїдних гормонів полягає у прямій індукції декількох генів. Проте білкові продукти цих генів можуть активувати інші гени, зумовлюючи синтез мРНК і білків, характерних для вторинної, пізнішої відповіді клітини-мішені на гормональний сигнал. Крім контролю за процесом транскрипції, комплекси рецептора з стероїдним гормоном можуть впливати на стабільність специфічних мРНК, селекцію їх для трансляції рибосомами.

Рецептори тиреоїдних гормонів (TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2, TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2) і ретиноевої кислоти (РКР і РХР декількох субтипів), що входять до родини факторів транскрипції, локалізовані в ядрі [16, 17]. Ретиноїдні рецептори при відсутності ліганду є репресорами транскрипції ретиноліндуцибельних генів, а в присутності ліганду – активаторами транскрипції. Поряд з цим, у складі гетеродимерів ретиноїдні рецептори РХР функціонують як корецептори інших ядерних рецепторів (тиреоїдних гормонів, вітаміну D, фактора проліферації пероксидом) і так званих "сирітських" рецепторів, для яких природні ліганди поки що не ідентифіковано. Тому 9-цис-ретиноева кислота – природний ліганд РХР-рецепторів, її аналоги володіють широкою біологічною активністю тканинносPECIFICного характеру. Завдяки інгібуванню активності фактора транскрипції AP-1 (Jun/Fos) ретиноїди проявляють антипроліферативну дію.

Дія стероїдних і тиреоїдних гормонів, їх аналогів і антагоністів виявляється через певний час (від 30 хв до декількох годин), потрібний для синтезу мРНК і відповідних білків. Ефект цих ЛЗ може продовжуватись протягом декількох годин чи днів (для тиреоїдних гормонів – навіть тижнів). Істотна тривалість ефекту зумовлюється відносно повільним періодом розпаду більшості ферментів і білків, які можуть залишатися активними протягом годин і днів після синтезу.

ЛЗ-агоністи (ендогенні СМ та їх синтетичні аналоги), зв'язуючись з рецептором, викликають такі зміни конформації рецепторних молекул, які ініціюють трансдукцію хімічного сигналу до внутрішньоклітинних структур і біомолекул, що реалізують фармакологічний ефект [2, 14]. Отже, агоністи споріднені з рецептором та володіють внутрішньою активністю. Якщо синтетичні агоністи зумовлюють максимальний ефект, їх називають повними агоністами. Неповні (часткові) агоністи, зв'язуючись зі всіма молекулами рецептора, викликають менш виражену дію, ніж повні агоністи. Точний молекулярний механізм, що пояснює неповну відповідь на часткові агоністи, не відомий. Антагоністи, зв'язуючись з рецепторами, не спричиняють їх стимуляції, тобто не індукують передачу сигналу до ефекторних

структур клітини. Отже, внутрішня активність в антагоністів відсутня (дорівнює нулю). Але деякі антагоністи здатні до часткової активації рецептора, тобто фактично є частковими агоністами. Ефекти антагоністів зумовлюються блокадою дії на рецептори ендogenous СМ чи екogenous ЛЗ-агоністів. Антагоністи поділяються на конкурентні та неконкурентні (незворотні). Перші взаємодіють з сайтами рецептора, з якими зв'язуються молекули агоніста. Збільшення концентрації конкурентного антагоніста прогресивно пригнічує реакцію на агоніст, аж до повного інгібування. І навпаки, підвищуючи концентрацію агоніста, можна повністю подолати ефект конкурентного антагоніста. Хімічні зв'язки між молекулами рецептора і агоніста чи конкурентного антагоніста не ковалентні й слабкі (іонні, водневі, дипольні, гідрофобні). Дія агоністів і конкурентних антагоністів продовжується, поки речовина зв'язана з рецептором. Після дисоціації комплексу "ліганд – рецептор" в одних випадках дія автоматично припиняється. Проте часто дія агоніста може продовжуватись і після дисоціації комплексу, оскільки частина молекул системи трансдукції сигналу ще перебуває в активованому стані. Деякі антагоністи зв'язуються з рецепторами незворотно чи майже незворотно, що є наслідком утворення між молекулами ліганду і рецептора ковалентних зв'язків. Тривалість дії незворотних антагоністів великою мірою залежить від швидкості обороту рецептора і припиняється тільки після синтезу нових молекул рецептора.

Сформульовано поняття про зворотні агоністи рецепторів [13]. Вони взаємодіють з рецепторами алостерично, тобто поза центром зв'язування СМ-агоніста, і навіть при відсутності агоністів зумовлюють протилежні їм ефекти, тоді як антагоністи тільки попереджують дію агоністів. Показано, що деякі антагоністи дофамінових рецепторів, адренорецепторів і ГАМКА-рецепторів проявляють властивості зворотних агоністів.

Мішенню дії ряду ЛЗ є не молекули рецепторів ендogenous СМ, а пострецепторні компоненти сигнальних шляхів (систем трансдукції сигналів на ефекторні молекули клітин) [13]. Серед них найбільша група інгібіторів ФДЕ (фосфодіестерази), ферменту, який каталізує реакцію інактивації вторинного посередника цАМФ перетворенням його в АМФ [3, 4]. Отже, інгібітори ФДЕ зумовлюють підвищення рівня в клітинах цАМФ і, відповідно, посилення цАМФ-залежних процесів. Виявлено родину ізоферментів ФДЕ, що відрізняються тканинною і субклітинною локалізацією, способами регуляції, субстратною специфічністю, чутливістю до інгібіторів. Тому інгібітори ФДЕ володіють широким спектром фармакологічної

активності. До них відносять добре відомі метилксантини (кофеїн, теофілін і його похідні, дипрофілін, пентоксифілін), а також препарати різної структури (апресин, папаверин, кавінтон, курантил, етимізол тощо) [6, 12, 14]. Деякі інгібітори ФДЕ водночас є блокаторами аденосинових рецепторів.

Іони літію впливають на обмін фосфоінозитидів, зокрема інгібують фермент інозитолмонофосфатазу, що призводить до зменшення синтезу попередника вторинних месенджерів ФІ-сигнальної системи. Імовірно, цей ефект іонів літію опосередковує антипсихотичну дію їх при маніакально-депресивних станах [10].

Широкий спектр фармакологічної активності (антиангінальна, антигіпертензивна, протиаритмічна, антиагрегантна) характерний для антагоністів кальцію – блокаторів потенціалокерованих  $Ca^{2+}$ -каналів плазматичної мембрани L-типу, що пригнічують трансмембранний потік у клітини іонів  $Ca^{2+}$ -вторинного посередника в регуляції різноманітних процесів [2-4, 12, 14]. Блокатором каналів T-типу є мібефрадил, який розширює коронарні й периферичні судини і використовується як антиангінальний і гіпотензивний засіб. Спазмолітичний засіб дантролен є специфічним блокатором кальцієвих каналів СР скелетних м'язів.

Перспективними мішенями для створення ЛЗ є різноманітні протеїнкінази, як рецепторні (інсуліну, факторів росту), так і внутрішньоклітинні, що функціонують у різних сигнальних шляхах, опосередковують ефекти вторинних посередників [10, 13]. Зокрема, останнім часом досліджено в експериментах протипухлинну активність великої кількості інгібіторів тирозинкіназ-рецепторів факторів росту, фосфатидилінозитолкіназ, протеїнкіназ С, МАП-кіназ, активаторів тирозинфосфатаз, блокаторів зв'язування з рецепторними протеїнкіназами адаптерних білків, а багато інгібіторів зв'язування факторів росту з RTK уже пройшли клінічні дослідження і показали себе досить ефективними при деяких видах пухлин [5].

Ряд важливих ЛР діє шляхом утворення локального міжклітинного і внутрішньоклітинного месенджера оксиду азоту або імітації його ефектів [13, 15]. Ендогенний синтез NO відбувається в різних клітинах із амінокислоти аргініну і  $O_2$  під дією NO-синтази. Синтезований NO, що є газоподібною ліпофільною частинкою, легко дифундує із клітин у міжклітинний простір і без участі рецепторів проникає у сусідні клітини. Основною молекулою-мішенню для NO є цитоплазматична форма гуанілатциклази (ГЦ), яка каталізує реакцію синтезу цГМФ із ГТФ (інші мішені – залізовмісні білки, тілові білки, пептиди тощо). Цитоплазматична ГЦ, на відміну від мембранної форми – частини рецеп-

тора натрійуретичного атріального фактора, містить молекулу гему. Зв'язування NO з гемом зумовлює зміну конформації ГЦ і стимулює її каталітичну активність. Найбільше відомі такі функції NO: 1) вазодилатація (ендотеліальний фактор розслаблення); 2) нейромедіатор чи нейромодулятор; 3) інгібітор адгезії та агрегації тромбоцитів; 4) участь в імунному захисті (медіатор цитотоксичності); 5) регуляція транспорту кисню еритроцитами; 6) індуктор апоптозу [8].

ЛЗ донорами NO є органічні нітрати (нітрогліцерин тощо), нітропрусид натрію, сидноніміни (молсидомін) [15]. З органічних нітратів NO вивільняється неферментативним і ферментативним шляхами. За першим способом нітрати спочатку взаємодіють з тіоловими сполуками (цистеїн, глутатіон, білки з SH-групами) з утворенням проміжних сполук S-нітрозотіолів, які є фізіологічними еквівалентами NO, здатними безпосередньо активувати ГЦ або шляхом вивільнення NO при розпаді. Процес відбувається у плазмі крові і стінці судин. Ферментативне перетворення органічних нітратів в NO каталізує глутатіон-S-трансфераза в клітинах судинної стінки, печінки та інших тканин. При застосуванні органічних нітратів більше 2 тижнів може розвинути перехресна резистентність до них, що, ймовірно, є наслідком пригнічення синтезу ендогенного NO за механізмом негативного зворотного зв'язку: NO зв'язується з гем-тіоловим центром NO-синтази і блокує її активність. Іншою причиною може бути зменшення вмісту тіолових сполук. Нітропрусид натрію і молсидомін за хімічною структурою не належать до органічних нітратів і здатні безпосередньо вивільняти NO.

Крім ЛЗ-донорів NO, перспективним є пошук їх серед речовин, що різними способами можуть змінювати концентрацію ендогенного NO (активаторів та інгібіторів різних ізоферментів NO-синтази, індукторів і репресорів синтезу індукцибельної форми NO-синтази, активаторів та інгібіторів аргінази, яка гідролізує аргінін – попередник NO, перехоплювачів NO, що є вільним радикалом). Природними індукторами синтезу індукцибельної NO-синтази є бактеріальні ліпополісахариди, інтерферон IFN $\gamma$ , ряд цитокінів. Імовірно, їх імуностимулювальна дія частково зумовлюється підвищенням синтезу NO-цитотоксичного ефектора антиінфекційного захисту. У відповідь на індукцію в імункомпетентних клітинах зростають синтез індукцибельної NO-синтази і продукція NO [8].

Таким чином, фундаментальні дослідження ендогенних СМ (нейротрансмітерів, гормонів, факторів росту, цитокінів тощо), їх рецепторів та шляхів трансдукції сигналів до ефекторних систем клітин відіграють вирішальну роль у створенні нових ефективних ЛЗ.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Альберт А. Избирательная токсичность. Физико-химические основы терапии: Пер. с англ. В 2 т. – М.: Медицина, 1989. – 1. – 400 с.; 2. – 432 с.
2. Ганонг В.Ф. Физиология людини: Пер. з англ. – Львів: БаК, 2002. – 784 с.
3. Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини: Підручник. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. – 744 с.
4. Губський Ю.І. Біологічна хімія: Підручник. – Київ – Тернопіль: Укрмедкнига, 2000. – 508 с.
5. Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., Соловьев Ю.М. и др. Исследование механизмов передачи митогенных сигналов факторов роста – основа создания новых противоопухолевых препаратов в клинике детской онкологии // Вопр. онкол. – 2000. – 46, № 4. – С. 385-394.
6. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. – Харьков: Торгсинг, 1997. – 1. – 560 с.; 2. – 592 с.
7. Панков Ю.А. Новые системы проведения сигналов в механизмах гормональной регуляции // Пробл. эндокр. – 2000. – 46, № 2. – С. 3-8.
8. Серая И.П., Нарциссов Я.Р. Современные представления о биологической роли оксида азота // Успехи совр. биол. – 2002. – 122, № 3. – С. 249-258.
9. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. Рецепторы физиологически активных веществ. – М.: Медицина, 1987. – 400 с.
10. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. Рецепторы: от теории к практике // Фармакол. и токсикол. – 1990. – 53, № 2. – С. 4-8.
11. Ткачук В.А. Введение в молекулярную эндокринологию: Учеб. пособие. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. – 256 с.
12. Фармакологія: Підручник / За ред. І.С. Чекаман. – К.: Вища школа, 2001. – 598 с.
13. Харкевич Д.А. Основные направления создания новых лекарственных средств // Экспер. и клин. фармакол. – 2003. – 66, № 3. – С. 74-79.
14. Харкевич Д.А. Фармакология: Учебник. – М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. – 664 с.
15. Шимановский Н.Л., Гуревич К.С. Роль оксида азота в механизмах действия лекарственных веществ // Междунар. мед. журн. – 2000. – 6, № 1. – С. 104-107.
16. Lodish H., Berk A., Zipursky S.L. et al. Molecular cell biology. – San Francisco: W.H. Freeman, 2000. – 4 th. ed. – 350 p.
17. Molecular endocrinology / Ed. by B.D. Weintraub. – N.Y.: Raven Press, 1994. – 250 p.

## БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ. I. ВЛИЯНИЕ НА МЕЖ- И ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ СИГНАЛИЗАЦИЮ

Я.И. Гонский, Т.П. Максимчук<sup>1</sup>

ТЕРНОПОЛЬСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ИМ. И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО  
ИВАНО-ФРАНКОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ<sup>1</sup>

### Резюме

В работе сделана попытка обобщения многочисленных данных о механизмах действия лекарственных средств на молекулярном уровне. Главное внимание сосредоточено на молекулах-мишенях для лекарственных средств: рецепторах и компонентах пострецепторных систем трансдукции сигналов. Показано значение фундаментальных исследований для целенаправленного создания новых эффективных и избирательно действующих лекарственных средств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лекарственные средства, механизмы действия, молекулы-мишени.

## BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE DRUGS ACTION. I. EFFECTS ON INTER- AND INTRACELLULAR SIGNALLING

Ya.I. Honsky, T.P. Maksymchuk<sup>1</sup>

TERNOPIL STATE MEDICAL ACADEMY BY I.YA. HORBACHEVSKY  
IVANO-FRANKIVSK STATE MEDICAL ACADEMY<sup>1</sup>

### Summary

In this article the attempt was made to summarize a significant amount of data regarding mechanisms of drugs action on the molecular level. The main focus is made on target molecules for drugs: receptors and components of postreceptor signalling pathways. It shows the significance of fundamental investigations for purposeful creation of new effective and selective-acting drugs.

KEY WORDS: drugs, mechanisms of action, target molecules.

Отримано 02.09.2003 р.

Адреса для листування: Я.І. Гонський, Тернопільська державна медична академія ім. І.Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.