

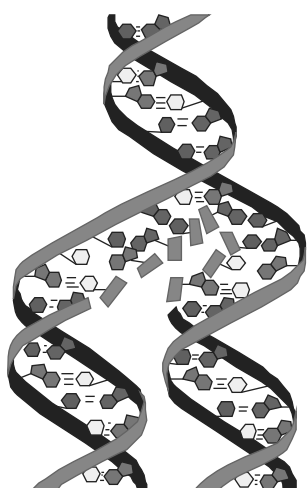
Академія медичних наук України

Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

МЕДИЧНА ХІМІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ



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

MEDICAL CHEMISTRY

SCIENTIFIC JOURNAL

2 TOM 10
2008

- ❖ *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 KB № 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) 43-49-56
(0352) 52-80-09

Fax: (0352) 52-41-83
<http://www.tdmu.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

І ДЄАІ АЄЇІ ² АІ НЄ²АЄАІ І В

Биць Н., Самойленко А., Іванішевич М., Генінгаузен Л.,
Еренрайх Х., Дробот Л., Сірен А-Л. (Київ; Вюрцбург,
Бетесда, Геттінген, Німеччина) РОЛЬ
ФУНКЦІОНАЛЬНОГО STAT5 В НЕЙРОНАХ

5

Великий М.М., Сибірна Н.О., Кучмеровська Т.М.,
Бурда В.А., Донченко Г.В. (Київ, Львів) ОСОБЛИВОСТІ
ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ ЕРИТРОНУ ЩУРІВ
ЗА СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДІАБЕТУ: ЕФЕКТ
НІКОТИНАМІДУ

11

Задоріна О.В., Парамонова Г.І., Ягупова А.С.,
Губський Ю.І. (Київ) ОКСИГЕНАЗНІ РЕАКЦІЇ В
МІКРОСОМАЛЬНІЙ ФРАКЦІЇ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ
ЗА УМОВ НІТРИТНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ТА КОРЕКЦІЇ
ВІТАМІНАМИ-АНТИОКСИДАНТАМИ

17

Герич О.Х., Пентюк О.О. (Вінниця) ВПЛИВ ЦУКРОВОГО
ДІАБЕТУ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ
КОН'ЮГАЦІЙНОЇ ФАЗИ МЕТАБОЛІЗМУ
КСЕНОБІОТИКІВ У ЩУРІВ

23

Яковлева Л.В., Міщенко О.Я. (Харків) ОЦІНКА
КАРДІОПРОТЕКТОРНОЇ АКТИВНОСТІ НОВИХ
ЗАСОБІВ АДАПТОГЕННОЇ ДІЇ НА МОДЕЛІ АЛКОГОЛЬ-
ФУРАЗОЛІДОНОВОЇ КАРДІОМІОПАТІЇ

27

Романько М.Є., Ушкалов В.О. (Харків, Київ) АТФ-аза
ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН БАКТЕРІЙ В
ОЦІНЮВАННІ ЕФЕКТІВ СТРЕСУ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ

33

Локай Б.А., Пересацько І.Г., Макарова О.Є. (Тернопіль,
Харків) КОРЕКЦІЯ ЗМІН ВМІСТУ НІКОТИНАМІДНИХ
КОФЕРМЕНТІВ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ
УРАЖЕННЯ ТОКСИНАМИ БЛІДОЇ ПОГАНКИ

37

Андриїчук Т.Р., Ракша Н.Г., Лугова С.Л., Драган Л.П.,
Цудзевич Б.О. (Київ) ВПЛИВ РИБОКСИНУ НА
ВИЖИВАННЯ ТА МЕТАБОЛІЧНУ АКТИВНІСТЬ
ЛІМФОЦИТІВ ТИМУСА ЗА ПРОМЕНЕВОГО
УРАЖЕННЯ

41

Кисличенко В.С., Король В.В., Деркач Н.В.,
Адель Ахмад Халіл Абу Юсеф, Попик А.І. (Харків)
ФІТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ВИВЧЕННЯ
АДАПТОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ПЛОДІВ І КОРИ
SYRINGA VULGARIS L.

46

Набока О.І., Березнякова А.І. (Харків) ПОРУШЕННЯ
ВОДНО-ЕЛЕКТРОЛІТНОГО ОБМІНУ ЗА УМОВ
ГІПЕРГІДРАТАЦІЇ ОРГАНІЗМУ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ ПРИ
БАГАТОРАЗОВОМУ ВВЕДЕННІ КАРБОРЕНУ

50

Заїчко Н.В. (Вінниця) АСОЦІАЦІЯ СЕРЕДНЬОГО ОБ'ЄМУ
ТРОМБОЦИТІВ З РІВНЕМ ГОМОЦИСТЕЇНУ ТА
ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В КРОВІ ЩУРІВ
З ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ

54

Половкович С.В., Миколай О.Б., Марінцова Н.Г.,
Журахівська Л.Р., Губицька І.І., Болібрех Л.Д.,
Новіков В.П. (Львів) СИНТЕЗ НОВИХ АМІНОМІСНИХ
ПОХІДНИХ НА ОСНОВІ ХЛОРИСТОГО ЦІАНУРУ

59

Шанайда М.І., Лемішка І.А., Лукієнко О.В. (Тернопіль,
Харків) ФІТОХІМІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ГІСОПУ ЛІКАРСЬКОГО
З МЕТОЮ ВИКОРИСТАННЯ У ФАРМАЦІЇ

63

Contents

ORIGINAL INVESTIGATIONS

Byts N., Samoylenko A., Ivanishevych M., Hennighausen L.,
Ehrenreich H., Drobot L., Siren A-L. (Kyiv; Vjurtsburgh,
Betesda, Hettinhen) ROLE OF FUNCTIONAL STAT5 IN
NEURONS

Velyky M.M., Sybirna N.O., Kuchmerovska T.M.,
Burda V.A., Donchenko H.V. (Kyiv, Lviv) FUNCTIONAL
FEATURES OF RAT ERYTHRON SYSTEM
AT STREPTOZOTOCIN DIABETES: EFFECT
OF NICOTINAMIDE

Zadorina O.V., Paramonova H.I., Yagupova A.S.,
Hubsy Yu.I. (Kyiv) OXYGENASE REACTIONS IN
MYCROSOMAL FRACTION OF RAT HEPATOCYTES
UNDER NITRITE INTOXICATION AND CORRECTION
WITH VITAMINS-ANTIOXYDANTS

Herych O.Kh., Pentyuk O.O. (Vinnytsia) INFLUENCING
OF DIABETES ON THE ENZYMIC ACTIVITY
OF A CONJUGATIVE PHASE OF XENOBIOTICS
METABOLISM FOR RATS

Yakovleva L.V., Mishchenko O.Ya. (Kharkiv) ASSESSMENT
OF CARDIOPROTECTIVE ACTIVITY OF NEW
ADAPTOGENIC REMEDIES ON ALCOHOL-
FURASOLIDONUM CARDIOMYOPATHY MODEL

Romanko M.Ye., Ushkalov V.O. (Kharkiv, Kyiv) ATP-ase OF
BACTERIA PLASMATIC MEMBRANES IN EVALUATION
OF LYOPHILIZATION STRESS EFFECTS

Lokay B.A., Peresadko I.H., Makarova O.Ye. (Ternopil,
Kharkiv) CORRECTION OF CHANGES OF NICOTINAMIDE
COENZYMES IN THE RAT'S LIVER UNDER CONDITION
OF AMANITA PHALLOIDES POISONING

Andriychuk T.R., Raksha N.H., Luhova S.L., Drahan L.P.,
Tsudzevych B.O. (Kyiv) THE INFLUENCE OF RIBOXINE
ON VIABILITY AND METABOLIC ACTIVITY
OF THYMUS LYMPHOCYTES UNDER
IRRADIATION

Kyslychenko V.S., Korol V.V., Derkach N.V.,
Adel Achmad Halil Abu Yusef, Popyk A.I. (Kharkiv)
PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION AND STUDY
OF ADAPTOGENIC ACTIVITY OF SYRINGA VULGARIS
L. FRUIT AND BARK

Naboka O.I., Bereznyakova A.I. (Kharkiv) VIOLATIONS
OF AQUA-ELECTROLYTIC EXCHANGE UNDER
CONDITIONS OF ORGANISM HYPERHYDRATATION
AND THEIR CORRECTION AT MULTIPLE
INTRODUCTION OF KARBOREN

Zaichko N.V. (Vinnytsia) ASSOCIATION BETWEEN MEAN
PLATELET VOLUME AND BLOOD LEVEL
OF HOMOCYSTEINE AND HYDROGEN SULFIDE
IN RATS WITH HYPERHOMOCYSTEINEMIA

Polovkovych S.V., Mykoliv O.B., Marintsova N.H.,
Zhurakhivska L.R., Hubytska I.I., Bolibruch L.D.,
Novikov V.P. (Lviv) SYNTHESIS OF NEW AMINO-
CONTAINING DERIVATIVES ON THE BASIS OF
CYANUR CHLORIDE

Shanayda M.I., Lemishka I.A., Lukiyenko O.V. (Ternopil,
Kharkiv) PHYTOCHEMICAL STUDY OF HYSSOP WITH
THE PURPOSE OF USE IN PHARMACY

<i>Вороніна Л.М., Загайко А.Л., Кравченко Г.Б., Заїка С.В., Огай Ю.О.</i> (Харків, Ялта) ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ СУБСТАНЦІЙ, ОТРИМАНИХ З НАСІННЯ ВИНОГРАДУ РІЗНИХ СОРТІВ	67	<i>Voronina L.M., Zagayko A.L., Kravchenko H.B., Zaika S.V., Ohay Ju.O.</i> (Kharkiv, Yalta) COMPARATIVE ANALYSIS OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE SUBSTANCES OBTAINED FROM THE DIFFERENT KINDS OF VINE SEED
<i>Тюпка Т.І.</i> (Харків) УЛЬТРАСТРУКТУРА АЕРОГЕМАТИЧНОГО БАР'ЄРУ І ФОСФОЛІПІДНИЙ СКЛАД СУРФАКТАНТУ ПРИ ГОСТРОГІПОКСИЧНОМУ НАБРЯКУ ЛЕГЕНЬ	71	<i>Tyupka T.I.</i> (Kharkiv) ULTRASTRUCTURE OF AEROHEMATIC BARRIER AND PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF SURFATANT AT ACUTE HYPOXIC PULMONARY EDEMA
<i>Подплетня О.А.</i> (Дніпропетровськ) АНАЛЬГЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ ІНДОМЕТАЦИНУ В КОМБІНАЦІЇ З ТІОТРИАЗОЛІНОМ ПРИ АРТРОЗІ У ЩУРІВ	75	<i>Podplyetnya O.A.</i> (Dnipropetrovsk) ANALGESIC ACTIVITY OF INDOMETHACINE IN COMBINATION WITH THIOTRIAZOLINE AT ARTHROSIS IN RATS
<i>Романовська І.І., Шестеренко Ю.А., Севастьянов О.В., Топтіков В.А.</i> (Одеса) ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ ЧАСТКОВО ОЧИЩЕНОГО ПРЕПАРАТУ ТИРОЗИНАЗИ З ГРИБІВ <i>AGARICUS BISPORUS</i>	79	<i>Romanovska I.I., Shesterenko Yu.A., Sevastyanov O.V., Topnikov V.A.</i> (Odessa) INVESTIGATION OF PARTIALLY PURIFIED <i>AGARICUS BISPORUS</i> TYROSINASE PREPARATION COMPOSITION
<i>Звягінцева Т.В., Киричок Л.Т., Сирова Г.О., Трутаєв І.В., Миронченко С.І., Горбач Т.В., Горголь Н.І.</i> (Харків) ВИВЧЕННЯ ХРОНІЧНОЇ ТОКСИЧНОСТІ КОМБІНАЦІЇ 2,4-ДИХЛОРБЕНЗОЙНОЇ КИСЛОТИ, КОФЕЇНУ ТА КАРБАМАЗЕПІНУ	83	<i>Zvyahintseva T.V., Kyrychok L.T., Syrova H.O., Trutayev I.V., Myronchenko S.I., Horbach T.V., Horhol N.I.</i> (Kharkiv) RESEARCH OF CHRONIC TOXICITY OF COMBINATION OF 2,4-DICHLORBENZOIC ACID WITH CARBAMAZEPINUM AND COFFEINUM
<i>Шевцов І.І.</i> (Харків) ВПЛИВ ГЛЮКСИРЕНУ НА ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НЕФРИТУ ХЕЙМАНА В ЩУРІВ	87	<i>Shevtsov I.I.</i> (Kharkiv) INFLUENCE OF GLYOXIREN ON COURSE OF EXPERIMENTAL HAYMANN NEPHRITIS AT RATS
<i>Єлісеєва О.П., Черкас А.П., Камінський Д.В., Семен Х.О.</i> (Львів) ДОСЛІДЖЕННЯ КОРЕЛЯЦІЙНИХ ЗВ'ЯЗКІВ МІЖ ПАРАМЕТРАМИ АЕРОБНОГО МЕТАБОЛІЗМУ ТА ВАРІАБЕЛЬНОСТІ РИТМУ СЕРЦЯ У ХВОРИХ НА ПЕПТИЧНУ ВИРАЗКУ ДВАНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ: ЕФЕКТ ОЛІЇ З НАСІННЯ АМАРАНТУ	91	<i>Yeliseyeva O.P., Cherkas A.P., Kaminsky D.V., Semen Kh.O.</i> (Lviv) THE STUDY OF CORRELATIONS BETWEEN AEROBIC METABOLISM AND HEART RATE VARIABILITY IN DUODENAL PEPTIC ULCER PATIENTS: AN EFFECT OF AMARANTH OIL
<i>Георгіянц В.А., Бисага Є.І., Євтіфеева О.А., Гарна Н.В., Бурд Н.Б.</i> (Харків, Ужгород) ВАЛІДАЦІЯ ТИТРИМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ НАТРІЮ САЛІЦИЛАТУ В ЛІКАРСЬКІЙ ФОРМІ АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ	100	<i>Heorhiyants V.A., Bysaha Y.I., Yevtifeyeva O.A., Harna N.V., Burd N.B.</i> (Kharkiv, Uzhhorod) VALIDATION OF TITRIMETRIC METHOD OF THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF SODIUM SALICYLATE IN MEDICINAL FORM OF PHARMACY MANUFACTURING
БІЛІ ДІ ОЕ² І І А²АІ І ЕАІ І В		
BRIEF REPORTS		
<i>Малий В.В., Кічимасова Я.С., Хворост О.П.</i> (Харків) АМІНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД СИРОВИНИ ТА СУБСТАНЦІЙ ЯСЕНА ЗВИЧАЙНОГО	106	<i>Malyi V.V., Kichymasova Ya.S., Khvorost O.P.</i> (Kharkiv) AMINO ACID COMPOSITION OF RAW MATERIAL AND SUBSTANCES OF <i>FRAXINUS EXCELCIOR</i>
<i>Гончар О.О., Стешенко Н.Н.</i> (Київ) АНТИОКСИДАНТНІ ЕФЕКТИ ГЛУТАРГІНУ ЗА УМОВ ПЕРЕРИВЧАСТОЇ ТА ГОСТРОЇ ГІПОКСИЧНОЇ ГІПОКСІЇ	109	<i>Honchar O.O., Steshenko N.N.</i> (Kyiv) ANTIOXIDATIVE EFFECTS OF GLUTARGIN UNDER INTERMITTENT AND ACUTE HYPOXIA
<i>Швець В.М.</i> (Запоріжжя) АНАЕРОБНИЙ ГЛІКОЛІЗ У СЕРЦІ ДОРΟΣЛИХ І СТАРИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ	112	<i>Shvets V.M.</i> (Zaporizhyya) ANAEROBIC GLYCOLYSIS IN THE HEART OF ADULT AND OLD RATS DURING IMMOBILIZATION STRESS
<i>Березнякова А.І., Тіщенко І.Ю., Тацький О.Ф., Торянік Е.Л.</i> (Харків) АНАБОЛІЧНА ДІЯ ХІНОБОЛІНУ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИЙ МОДЕЛІ АЛІМЕНТАРНОЇ БІЛКОВОЇ ДІСТРОФІЇ	115	<i>Bereznyakova A.I., Tishchenko I.Yu., Tatsky A.F., Toryanik E.L.</i> (Kharkiv) ANABOLIC ACTION OF CHINOBOLIN ON EXPERIMENTAL MODEL OF ALIMENTARY PROTEIN DYSTROPHY
<i>Пісковацький Ю.Г., Вишнеvsька Л.І., Георгіянц В.А., Яковенко В.К., Хохлова К.О.</i> (Харків) РОЗРОБКА НОВОГО ПРЕПАРАТУ З КОМПОЗИЦІЇ ЛІКАРСЬКИХ ТРАВ	119	<i>Piskovatsky Yu.H., Vyshnevskaya L.I., Heorhiyants V.A., Yakovenko V.K., Khokhlova K.O.</i> (Kharkiv) CREATION OF NEW DRUG FROM MEDICINAL HERBS COMPOSITION
<i>Азаров О.С., Вербіловський Я.П., Волощук Н.І., Ільченко О.В.</i> (Вінниця) ВИЗНАЧЕННЯ НІМЕСУЛІДУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ	122	<i>Azarov O.S., Verbilovsky Ya.P., Voloshchuk N.I., Ilchenko O.V.</i> (Vinnytsia) DETERMINATION OF NIMESULIDE IN BLOOD SERUM BY METHOD OF HIGHLY-EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 577.218

РОЛЬ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО STAT5 В НЕЙРОНАХ

Н. Биць^{1,2}, А. Самойленко^{1,2}, М. Іванішевич¹,
Л. Генінгаузен³, Х. Еренрайх⁴, Л. Дробот², А-Л. Сірен¹
УНІВЕРСИТЕТ ВЮРЦБУРГА¹

ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ², КИЇВ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ДІАБЕТУ, НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я³, БЕТЕСДА
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МЕДИЦИНИ ІМ. МАКСА ПЛАНКА⁴, ГЕТТІНГЕН

Транскрипційні фактори Stat 5a і 5b (від англ. signal transducers and activators of transcription) активуються при дії нейропротекторних та нейротрофічних факторів росту, еритропоетину (ЕРО) і гормону росту (GH). Показано відмінність двох внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, індукованих ЕРО: перший захищає клітини від апоптозу, другий потрібний для здійснення нейротрофічних ефектів у первинних культурах нейронів, отриманих з гіпокампів мишей, в яких не експресується Stat5 (Stat5^{-/-}). ЕРО активує Akt з метою реалізації нейропротекторного впливу, але потребує активації Stat5 для здійснення нейротрофічних ефектів. Сигнальні шляхи, стимульовані GH в нейронах, перетинаються таким чином, що має місце послідовне стимулювання Stat5 та Akt.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: еритропоетин, гормон росту, глутамат, нейрит, Stat5a/b.

ВСТУП. Транскрипційні фактори – сигнальні трансдуктори й активатори транскрипції 5a і 5b (Stat5, від англ. signal transducers and activators of transcription) – активуються в нейронах і нервових стовбурових клітинах нейропротекторним і нейротрофічним фактором росту еритропоетином (ЕРО, від англ. erythropoietin) [1, 7, 10, 12, 16]. Вважалось, що протекторні ефекти ЕРО опосередковує Stat5, оскільки активація Stat5 в нейронах супроводжує антиапоптотичний ефект ЕРО [12, 16]. Щоб остаточно з'ясувати, чи дійсно Stat5 є необхідною ланкою в сигнальному шляху ЕРО, було досліджено нейропротекторну і нейротрофічну дію ЕРО в культурі клітин, отриманій з гіпокампу Stat5a/b-нокаутних (Stat5^{-/-}) мишей [2]. Беручи до уваги дані про важливу роль Stat5 у внутрішньоклітинній передачі регуляторних ефектів гормону росту (GH, від англ. growth hormone) [4, 5], досліджено також ефекти GH в нейронах з генотипом Stat5^{-/-}. У даній роботі продемонстровано розходження між двома сигнальними шляхами, що ініціюються. Один із цих шляхів опосередковує захист клітин від апоптозу, тоді

© Н. Биць, А. Самойленко, М. Іванішевич, Л. Генінгаузен, Х. Еренрайх, Л. Дробот, А-Л. Сірен, 2008.

як другий забезпечує нейротрофічну дію даного фактора. ЕРО запобігає клітинній смерті, викликаній глутаматом як в Stat5^{+/-}, так і в Stat5^{-/-}-нейронах. З іншого боку, GH ефективно захищає лише Stat5^{+/-}-клітини, не впливаючи на рівень смерті від глутамату в Stat5^{-/-}-нейронах. За присутності інгібітора фосфатидилінозитол-3'кінази (PI3K, від англ. phosphatidylinositol-3'kinase) LY294002 повністю зникає захисний ефект ЕРО в Stat5^{+/-} і Stat5^{-/-}-нейронах та зменшується протекторна дія GH в Stat5^{+/-}-нейронах. Обидва фактори (ЕРО і GH) стимулюють формування нейритів у Stat5^{+/-}-нейронах, не проявляючи трофічного ефекту на Stat5^{-/-}-клітини. На основі отриманих результатів зроблено висновок, що нейропротекторна дія ЕРО реалізується з участю сигнального шляху Akt, тоді як трофічний вплив GH потребує активації Stat5.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Усі експерименти були санкціонованими і проводились згідно з правилами локального Комітету з охорони і використання тварин. У ході їх виконання застосовували реагенти й ензими аналітичного ступеня чистоти таких фірм: rhEPO (Janssen-

Cilag, Neuss, Німеччина), rhGH (Immuno Tools, Friesoythe, Німеччина), інгібітор PI3K LY294002 (Biomol, Plymouth Meeting, PA, США), Na-сіль L-глутамінової кислоти (Sigma, Taufkirchen, Німеччина).

Тварини й аналіз генотипу. Ембріони мишей C57BL/6 з генотипом Stat5^{+/+} або Stat5^{-/-}, які використовували для отримання первинної культури нейронів, одержували з тварин дикого типу або гемізиготних відповідно. Покоління мишей Stat5-гемізиготне або дикого типу отримали при паруванні тварин з генотипом Stat5^{+/+}, що були люб'язно надані для роботи проф. Генінгаузенем (Bethesda, MD, США). Отримання покоління тварин з генотипом Stat5^{-/-} та його скринингування детально описано в роботі [2]. Аallel Stat5a/b дикого типу детектували як фрагмент розміром 450 п.н. за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з використанням праймерів 1 (5'-GAA AGC ATG AAA GGG TTG GAG-3') та 2 (5'-AGC AGC AAC CAG AGG ACT AC-3'), тоді як делетовану аallel Stat5a/b визначали як фрагмент розміром 500 п.н. за допомогою праймерів 2 і 3 (5'-CCC ATT ATC ACC TTC TTT ACA G-3'). Хоча ембріони з генотипом Stat5^{-/-} характеризувались блідістю і меншим розміром, генотип Stat5^{-/-} кожного плода, який використовували для отримання первинної культури нейронів, підтверджували ПЛР.

Первинна культура нейронів. Для аналізу виживання клітин DIV9 (на 9-й день *in vitro*) використовували первинні культури нейронів гіпокампу, ізольовані з ембріонів на 18-му дні розвитку (E18) з генотипом Stat5^{+/+} або Stat5^{-/-}. З цією метою гіпокампи подрібнювали і трипсинізували. Після механічного розтирання отриману суспензію клітин висівали на покривні скельця, вкриті полі-D-лізином, в 4-лункових планшетах при густині 13 000 клітин/см². Нейрони культивували в середовищі MEM/B27 (Invitrogen) з додаванням бікарбонату натрію, пірувату натрію, L-глутаміну, пеніциліну, стрептоміцину і глюкози у зволоженої атмосфері з 5 % CO₂ при 37 °C. Середовище не міняли до 9-го дня культивування. Для аналізу диференціювання клітини гіпокампу, ізольовані з ембріонів на 15-му дні розвитку (E15), висівали при низькій густині 6000 клітин/см² і культивували протягом 3-х днів.

Глутаматіндукована нейротоксичність. Первинні нейрони на 7-й день культивування *in vitro* (DIV7) стимулювали ЕРО або GH в діапазоні концентрацій 10⁻¹⁰–10⁻⁸ М. У деяких експериментах культури попередньо інкубували протягом 20 хв за присутності 30 мкМ LY294002 або самого розчинника (0,03 % DMSO). Через 16 год після додавання факторів

росту клітини піддавали дії глутамату (200 мкМ L-глутамінової кислоти) протягом 15 хв, після чого переводили в кондиціоноване середовище і культивували за присутності факторів росту протягом наступних 24 год. Смерть клітин на DIV9 визначали за відсутністю барвника трипанового синього.

Дослідження нейротрофічності. ЕРО, GH (обидва в концентрації 10⁻¹⁰–10⁻⁸ М) додавали прямо в середовище для культивування через 1 год після висівання нейронів (DIV0) і потім кожні 24 год. На 3-й день *in vitro* (DIV3, 72 год після висівання) культури імунозбарвлювали на β-тубулін III, маркер нейрональних вироснів. З цією метою культури фіксували і блокували 10 % сироваткою коня. Отримані препарати інкубували через ніч з антитілами до β-тубуліну III (Sigma, США) при 4 °C. Мічення проводили протягом 1 год при кімнатній температурі з використанням біотинільованих антимишачих IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, США). Імунні комплекси виявляли за допомогою набору реагентів ABC (Vector, США) для опосередкованого пероксидазою окиснення хромогену діамінобензидину (Sigma, США). 100-150 нейронів у восьми незалежних полях зору (з двох покривних скельць на експериментальну точку) фотографували за допомогою мікроскопа Axioptot 2 (Zeiss) із застосуванням об'єктива (x40). Для визначення ефекту факторів росту на виріст нейритів підраховували кількість вироснів на клітину.

Статистична обробка результатів. Отримані середні значення величин і стандартні похибки (M±m) порівнювали з використанням програмного забезпечення SPSS 12.0. Вірогідними вважали дані у разі p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У мишей з генотипом Stat5^{-/-} спостерігаються тяжка анемія, затримка росту, і більшість з них помирає перинатально [2]. Незважаючи на ці обставини, можна культивувати нейрони, ізольовані з гіпокампу ембріонів Stat5-нокаутних мишей на 18-му дні розвитку (E18). Встановлено, що рівень базальної клітинної смерті нейронів, виділених із Stat5^{-/-} і Stat5^{+/+} мишей, не відрізнявся при культивуванні до 9-го дня (9-й день *in vitro* (DIV9) ((5,7±0,8) %, n=17 і (4,1±0,5) %, n=18 відповідно)). Це спостереження вказує на те, що Stat5, так само, як і рецептор ЕРО [18] та Akt [15, 17], не є необхідним для базального виживання нейронів. На наступному етапі було проведено дослідження токсичного ефекту глутамату в Stat5^{-/-}-нейронах. Хоча глутамат є основним нейротрансмітером мозку ссавців, активація його рецепторів високими концен-

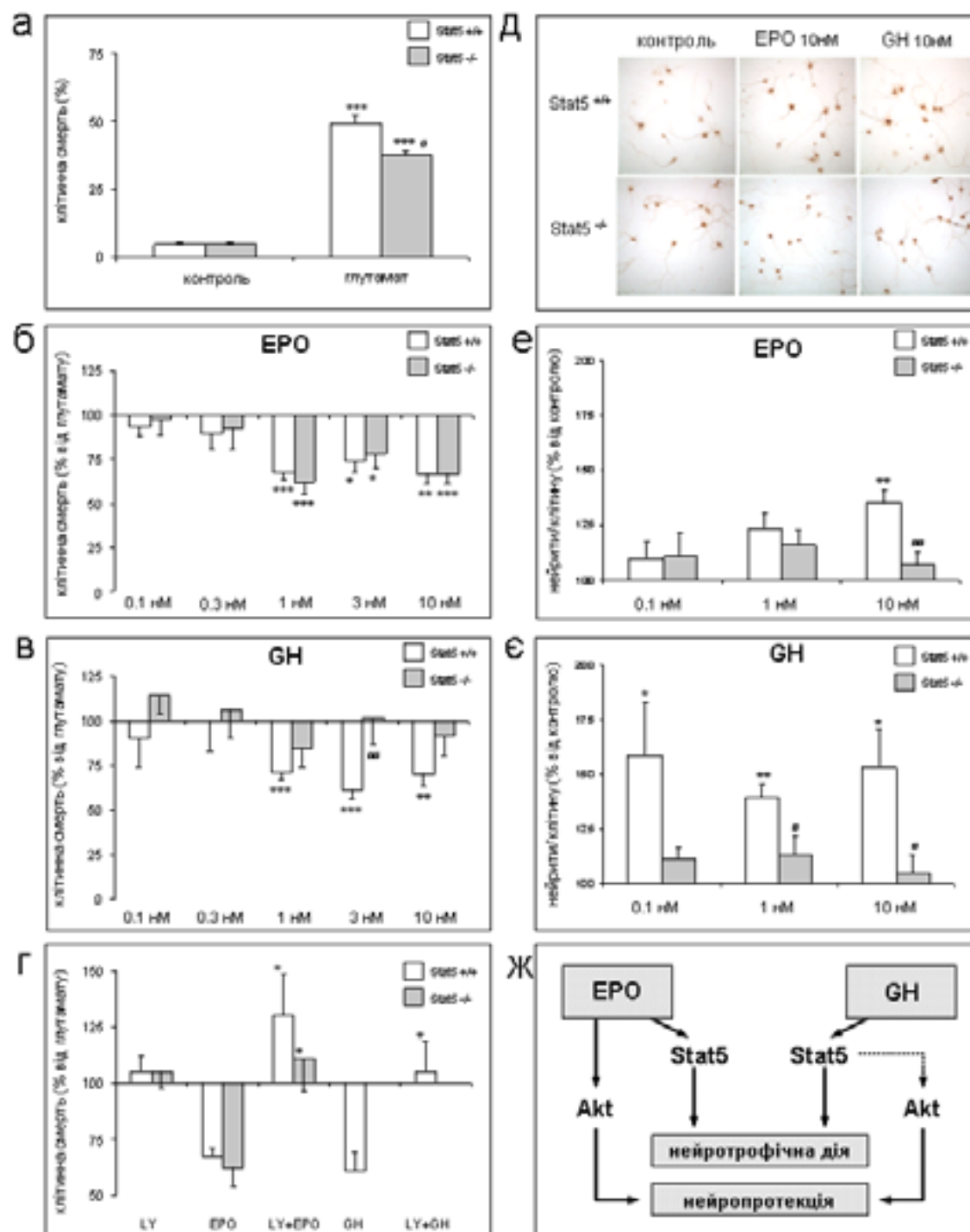


Рис.1. а – базальний рівень клітинної смерті та чутливість до глутамату в первинних культурах нейронів, ізолюваних з гіпокампів ембріонів мишей з генотипами Stat5^{+/+} та Stat5^{-/-} на 18-й день ембріонального розвитку (E18) та культивованих протягом 9 днів (DIV9) (n=13-15), *** – p<0,001 порівняно з розчинником, * – p<0,05 при порівнюванні Stat5^{-/-} з Stat5^{+/+}; б-в – ефекти EPO (n=5-11) та GH (n=4-8) на клітинну смерть, викликану дією глутамату, в первинній культурі Stat5^{+/+}- та Stat5^{-/-}-нейронів (E18, DIV9), рівень клітинної смерті, стимульованої дією глутамату, було взято за 100 %, * – p<0,05, ** – p<0,01 і *** – p<0,001 порівняно з розчинником, ** – p<0,01 при порівнюванні Stat5^{+/+} з Stat5^{-/-}; г – роль Akt у цитопротекторних властивостях EPO і GH оцінювали за допомогою інгібітора LY294002, рівень клітинної смерті, індукованої при дії глутамату, було взято за 100 %, використовували дози 10 нМ EPO та 3 нМ GH (n=3-8), * – p<0,05 порівняно з дією ростових факторів; д – імуноцитохімія первинних культур нейронів з гіпокампів Stat5^{+/+} і Stat5^{-/-} мишей з використанням антитіл до бета-тубуліну-III (DIV3, E15), масштаб – 50 μm; е-з – ефекти EPO (n=5) та GH (n=5-7) на кількість первинних нейритів на клітину в первинній культурі з гіпокампів мишей (DIV3, E15), рівень формування нейритів у контролі (за наявності розчинника) було взято за 100 %, * – p<0,05 і ** – p<0,01 порівняно з розчинником, # – p<0,05 і ## – p<0,01 при порівнюванні Stat5^{+/+} з Stat5^{-/-}; ж – запропонована модель механізмів нейропротекторної та нейротрофічної дій EPO і GH в первинній культурі гіпокампів миші. Усі дані представлено як середні значення величин ± стандартні похибки.

траціями глутамату призводить до масового надходження кальцію в клітину і клітинної смерті [3]. Чутливість до глутамату зростає з дозріванням нейронів [3]. У даній роботі йдеться про знижену чутливість гіпокампальних нейронів з генотипом Stat5^{-/-} до глутамату (рис. 1 а): (39±2) % мертвих клітин в Stat5^{-/-} (n=13) порівняно з (51±4) % мертвих клітин в Stat5^{+/+} (n=15) культурах (p<0,02). Оскільки активація Stat5 звичайно асоціюється з підвищеним виживанням клітин [10, 12, 16], безпосередня участь Stat5 у внутрішньоклітинній передачі токсичного ефекту глутамату є малоюмовірною. Підвищена стійкість нейронів до токсичних ефектів глутамату може вказувати на порушення в їх дозріванні за відсутності Stat5.

Щоб дослідити значення функціонального Stat5 для нейропротекторних і нейротрофічних ефектів EPO, проведено вивчення його здатності захищати нейрони від клітинної смерті, викликаній глутаматом, в культурах клітин, ізольованих з гіпокампів мишей з генотипами Stat5^{-/-} і Stat5^{+/+}. Стимулювали клітини EPO або GH протягом 16 год до додавання глутамату [8, 11]. EPO в концентраціях 1, 3 та 10 нМ знижував індуковану глутаматом клітинну смерть як в Stat5^{+/+}, так і в Stat5^{-/-}-нейронах (рис. 1 б). З іншого боку, GH у тих самих концентраціях [16] ефективно протектував Stat5^{+/+}-клітини від токсичності, викликаній глутаматом, не проявляючи при цьому ефекту в Stat5^{-/-}-нейронах (рис. 1 в).

Оскільки EPO однаково ефективно захищав як Stat5^{+/+}, так і Stat5^{-/-}-нейрони від смерті, індукованій глутаматом, надалі було досліджено можливу роль сигнального шляху PI3K/Akt [1, 12, 16] в передачі його антиапоптичного ефекту. Показано, що інгібітор PI3K, LY294002 (30 мкМ) повністю блокував фосфорилування Akt в культурах з генотипом Stat5^{+/+} через 16 год після його додавання. Водночас нижча концентрація LY294002 (10 мкМ) призводила лише до тимчасового інгібування активності Akt (дані не наведено). LY294002 (30 мкМ на DIV7) помірно підвищував рівень клітинної смерті нейронів на DIV9, хоча не призводив до подальшого зростання рівня смертності, викликаній глутаматом (рис. 1 г). Протекторний ефект EPO був повністю заблокований як в Stat5^{+/+}, так і в Stat5^{-/-}-нейронах за присутності LY294002 (див. рис. 1 г). LY294002 також послаблював нейропротекторну дію GH в нейронах з генотипом Stat5^{+/+} (див. рис. 1 г). Результати проведених досліджень свідчать про те, що сигнальний шлях Akt, проте не Stat5, є необхідним для нейропротекторного ефекту

EPO, тоді як одночасне залучення Stat5 і Akt забезпечує нейропротекторний вплив GH.

Надалі було досліджено здатність EPO та GH стимулювати формування нейритів у первинних культурах, ізольованих з гіпокампів ембріонів мишей з генотипами Stat5^{-/-} та Stat5^{+/+} на E15. Кількість первинних нейритів на клітину була вищою в нейронах з генотипом Stat5^{-/-} порівняно з нейронами з генотипом Stat5^{+/+} після 3 днів культивування (DIV3) (3,02±0,21, n=10 порівняно з 2,15±0,22, n=12, нейритів на клітину відповідно, p<0,01). Ці дані дають можливість зробити припущення, що відсутність Stat5 призводить до формування нейритів або безпосередньо, або за рахунок індукції експресії інших регуляторних трофічних факторів у нейронах, ізольованих на 15-й день ембріонального розвитку (E15). Додавання EPO в концентрації 10 нМ стимулювало формування нейритів у Stat5^{+/+}, але не в Stat5^{-/-}-клітинами (рис. 1 д, е). GH індукував ріст первинних нейритів у нейронах з генотипом Stat5^{+/+} при всіх досліджених концентраціях, тоді як в нейронах з генотипом Stat5^{-/-} жодного ефекту GH на формування нейритів не спостерігалось (рис. 1 д, е). Ці результати відповідають даним літератури про зменшення розміру головного мозку мишей, що не експресують рецептор до GH (GHR^{-/-}) [9]. Таким чином, Stat5 є необхідним для здійснення нейротрофічних ефектів як EPO, так і GH в первинних культурах нейронів гіпокампу. Проте не виключена можливість, що підвищена здатність формувати нейрити за відсутності стимулювання в нейронах з генотипом Stat5^{-/-} маскує ефекти EPO та GH. Імовірно, Stat5 відіграє роль в нейрональній пластичності також і в інших системах. Зокрема, нещодавно було показано, що при конститутивній активації Stat5 зумовлює зменшення кількості дефектів у формуванні аксонів, характерних для мотонейронів за спінальної м'язової атрофії [14].

ВИСНОВКИ. Нейротрофічний ефект EPO [6, 13] описано в нейрональних клітинах до того, як було відкрито його цитопротекторні та антиапоптотичні властивості [1, 8, 12, 16, 18]. У даній роботі показано розходження між двома сигнальними шляхами, індукованими EPO: перший забезпечує захист від клітинної смерті (Akt), другий необхідний для здійснення нейротрофічних ефектів (Stat5) (рис. 1 ж). Сигнальні шляхи Stat5 та Akt, стимульовані GH в нейронах, є однаково важливими для здійснення його як нейропротекторних, так і нейротрофічних ефектів (див. рис. 1 ж).

ЛІТЕРАТУРА

1. Brines M., Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2005. – **6**, № 6. – P. 484-494.
2. Cui Y. Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation // *Mol. Cell Biol.* – 2004. – **24**, № 18. – P. 8037-8047.
3. King A.E. Localization of glutamate receptors in developing cortical neurons in culture and relationship to susceptibility to excitotoxicity // *J. Comp. Neurol.* – 2006. – **498**, № 2. – P. 277-294.
4. Klover P., Henninghausen L. Postnatal body growth is dependent on the transcription factors signal transducers and activators of transcription 5a/b in muscle: a role for autocrine/paracrine insulin-like growth factor I // *Endocrinology.* – 2007. – **148**, № 4. – P. 1489-1497.
5. Kofoed E.M. Growth hormone insensitivity associated with a STAT5b mutation // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – **349**, № 12. – P. 1139-1147.
6. Konishi Y. Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on central cholinergic neurons in vitro and in vivo // *Brain Res.* – 1993. – **609**, № 1-2. – P. 29-35.
7. Liu J. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin // *Stroke.* – 2005. – **36**, № 6. – P. 1264-1269.
8. Morishita E. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death // *Neuroscience.* – 1997. – **76**, № 1. – P. 105-116.
9. Ransome M.I. Comparative analysis of CNS populations in knockout mice with altered growth hormone responsiveness // *Eur. J. Neurosci.* – 2004. – **19**, № 8. – P. 2069-2079.
10. Shingo T. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells // *J. Neurosci.* – 2001. – **21**, № 24. – P. 9733-9743.
11. Silva C. Growth hormone prevents human immunodeficiency virus-induced neuronal p53 expression // *Ann. Neurol.* – 2003. – **54**, № 5. – P. 605-614.
12. Siren A.L. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – **98**, № 7. – P. 4044-4049.
13. Tabira T. Neurotrophic effect of hematopoietic cytokines on cholinergic and other neurons in vitro // *Int. J. Dev. Neurosci.* – 1995. – **13**, № 3-4. – P. 241-252.
14. Ting C.H. Stat5 constitutive activation rescues defects in spinal muscular atrophy // *Hum. Mol. Genet.* – 2007. – **16**, № 5. – P. 499-514.
15. Tschopp O. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis // *Development.* – 2005. – **132**, № 13. – P. 2943-2954.
16. Um M., Lodish H.F. Antiapoptotic effects of erythropoietin in differentiated neuroblastoma SH-SY5Y cells require activation of both the STAT5 and AKT signaling pathways // *J. Biol. Chem.* – 2006. – **281**, № 9. – P. 5648-5656.
17. Yang Z.Z. Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development // *Mol. Cell Biol.* – 2005. – **25**, № 23. – P. 10407-10418.
18. Yu X. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development // *Development.* – 2002. – **129**, № 2. – P. 505-516.

РОЛЬ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО STAT5 В НЕЙРОНАХ

Н. Быць^{1,2}, А. Самойленко^{1,2}, М. Иванишевич¹,
Л. Хеннингаузен³, Х. Эренрайх⁴, Л. Дробот², А-Л. Сирен¹

УНИВЕРСИТЕТ ВЮРЦБУРГА¹

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. О.В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАИНЫ², КИЕВ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ДИАБЕТА, НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ³, БЕТЕСДА

ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ ИМ. МАКСА ПЛАНКА⁴, ГЕТТИНГЕН

Резюме

Транскрипционные факторы Stat 5a i 5b (от англ. *signal transducers and activators of transcription*) активируются под воздействием нейропротекторных и нейротрофических факторов роста, эритропоэтина (EPO) и гормона роста (GH). Показано отличие двух внутриклеточных сигнальных путей, индуцированных EPO: первый защищает клетки от апоптоза, второй необходим для осуществления нейротрофических эффектов в первичных культурах нейронов, полученных из гиппокампов мышей, в которых не экспрессируется Stat5 (Stat5^{-/-}). EPO активирует Akt с целью реализации нейропротекторного влияния,

но нуждается в активации Stat5 для обеспечения нейротрофических эффектов. Сигнальные пути, стимулированные GH в нейронах, пересекаются таким образом, что происходит последовательная стимуляция Stat5 и Akt.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритропоэтин, гормон роста, глутамат, нейрит, Stat5a/b.

ROLE OF FUNCTIONAL STAT5 IN NEURONS

**N. Byts^{1,2}, A. Samoilenko^{1,2}, M. Ivanishevych¹,
L. Hennighausen³, H. Ehrenreich⁴, L. Drobot², A-L. Siren¹**

WJURTSBURGH UNIVERSITY¹

INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY BY O.V. PALLADIN OF NAS OF UKRAINE², KYIV

NATIONAL INSTITUTE OF DIABETES, NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH CARE³, BETESDA

INSTITUTE OF EXPERIMENTAL MEDICINE BY MAX PLANK⁴, HETTINHEN

Summary

The transcription factors (signal transducer and activator of transcription 5a and 5b (Stat5) are activated by the neuroprotective and neurotrophic growth factors, erythropoietin (EPO) and growth hormone (GH). Here, a dissociation of the EPO-induced intracellular pathway for cell death protection from that needed for its neurotrophic activity in hippocampal neuronal cultures from Stat5a/b knockout (Stat5^{-/-}) mice is shown. EPO utilizes Akt to induce neuroprotection but requires Stat5 for its neurotrophic activity. The pathways, which mediate neuronal actions of GH, appear to be overlapping, both executing Stat5 and Akt signaling.

KEY WORDS: erythropoietin, growth hormone, glutamate, neurite, Stat5a/b.

Отримано 26.03.2008 р.

Адреса для листування: Н.В. Биць, лабораторія сигнальних механізмів клітини, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, Київ, 01601, Україна.

**Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua**

ОСОБЛИВОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ СИСТЕМИ ЕРИТРОНУ ЩУРІВ ЗА СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОГО ДІАБЕТУ: ЕФЕКТ НІКОТИНАМІДУ

М.М. Великий¹, Н.О. Сибірна², Т.М. Кучмеровська¹, В.А. Бурда², Г.В. Донченко¹
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ¹, КИЇВ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА²

Встановлено, що за експериментального стрептозотоцинового діабету зміни в системі еритроно проявляються посиленням еритропоезу та зростанням поліморфізму еритроцитарної популяції. Еритроцити периферичної крові стають більш чутливими до дії кислотного гемолітика, підвищуються спорідненість гемоглобіну з киснем, вміст глікозильованого гемоглобіну та 2,3-дифосфогліцерату. В еритроцитах активуються процеси вільнорадикальної пероксидації ліпідів, окисної модифікації протеїнів та знижується вміст відновленого глутатіону. Введення діабетичним тваринам нікотинамід, в основі біохімічного механізму дії якого лежить посилення біосинтезу NAD⁺ в тканинах, викликало нормалізацію киснево-транспортної функції еритроцитів, зумовлювало зменшення швидкості утворення продуктів ПОЛ та зростання вмісту відновленого глутатіону.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нікотинамід, стрептозотоциніндукований діабет, кислотний гемоліз еритроцитів, глікозильований гемоглобін, спорідненість гемоглобіну з киснем, 2,3-дифосфогліцерат, вільнорадикальні процеси.

ВСТУП. Цукровий діабет I типу характеризується комплексними гормонально-метаболічними порушеннями, в основі яких лежать генетична схильність, дія несприятливих чинників середовища та розвиток автоімунних процесів, що, власне, і зумовлюють деструкцію β -клітин підшлункової залози [9, 11]. Гіперглікемія як основний чинник патогенезу діабетичних ускладнень викликає структурні та функціональні зміни в тканинах, які проявляються розвитком ацидозу та тканинної гіпоксії. Основною ланкою забезпечення кисневотransпортних процесів організму є система еритроно периферичної крові. Порушення морфофункціональних, фізико-хімічних властивостей та біохімічних функцій еритроцитів лежать в основі змін спорідненості гемоглобіну з киснем, недостатнього постачання кисню та посилення гіпоксії периферичних тканин за цукрового діабету [1, 2]. Зростання інтенсивності вільнорадикальних процесів у клітинах тканин за гіперглікемії є одним з вагомих факторів патогенезу цукрового діабету [5, 7]. Пероксидне окиснення ліпідів та зміни структурної лабільності мембран еритроцитів можуть бути одним з провідних факторів, відповідальних за порушення їх кисневотransпортної функції.

© М.М. Великий, Н.О. Сибірна, Т.М. Кучмеровська, В.А. Бурда, Г.В. Донченко, 2008.

Метою даної роботи було дослідити особливості структури та кисневотransпортної функції еритроцитів периферичної крові за експериментального стрептозотоцинового діабету в щурів, а також нормалізуючий вплив нікотинамід на морфофункціональні властивості системи еритроно.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У дослідах використовували білих щурів-самців масою 150-180 г. Експериментальний цукровий діабет викликали шляхом одноразового внутрішньочеревиного введення стрептозотину фірми "Sigma" з розрахунку 7 мг на 100 г маси тіла (приготованого на 0,1 М цитратному буфері, рН=4,5). Розвиток цукрового діабету контролювали за зростанням рівня глюкози в крові, в експериментах використовували щурів, у яких через 4 тижні після індукції діабету рівень глюкози у крові становив $(16,5 \pm 1,9)$ ммоль на 1 л. Групі тварин з розвинутою гіперглікемією щодоби протягом 14 днів вводили внутрішньочеревино нікотинамід в дозі 200 мг на 1 кг маси тіла. Дослідження проводили відповідно до національних "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2001). Кров збирали натщесерце у пластикові силіконові пробірки з антикоагулянтном (3,8 % розчином цитрату натрію у співвідношенні

10:1). Визначали кількість еритроцитів, ретикулоцитів, швидкість дозрівання та добову продукцію ретикулоцитів [6]. Плазму видаляли, еритроцити відмивали фізіологічним розчином, фракціонували на різновікові популяції в градієнті щільності сахарози і визначали функціональний стан еритроцитів за їх стійкістю до дії кислотного гемолітика та неспецифічною проникністю мембран [2]. Дослідження поверхневої архітектури еритроцитів проводили методом скануючої електронної мікроскопії. У гемолізатах еритроцитів визначали вміст глікозильованого гемоглобіну, 2,3-дифосфогліцерату, дієнових кон'югат, ТБК-активних продуктів, відновленого глутатіону та продуктів окисної модифікації протеїнів, як описано раніше [2, 7]. Спорідненість гемоглобіну з киснем оцінювали за аналізом кривих дисоціації оксигемоглобіну [3].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Показано, що за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД) відбувалось збільшення вмісту ретикулоцитів периферичної крові (в 1,4 раза), їх добової продукції (в 1,3) та швидкості дозрівання (у 1,5 раза) порівняно з нормою. При аналізі цитологічних препаратів кісткового мозку виявлено зниження процентного вмісту поліхроматофільних (в 1,3 раза) та оксифільних (в 1,7 раза) нормоцитів, яке можна пояснити їх сповільненим дозріванням та швидкими темпами елімінації ретикулоцитів у русло крові. Отримані результати підтвердили на клітинному рівні механізм розвитку гіпоксії за стрептозотозинного діабету.

Результати досліджень поверхневої архітектури еритроцитів щурів у нормі, за умов ЕЦД та введення нікотинаміду свідчать про те, що в нормі пул еритроцитів представлений в основному двовігнутими дискоцитами до 97 %. Клітинна поверхня дискоцита у скануючому мікроскопі виглядала згладженою, без рельєфних утворів. Трансформовані форми еритроцитів зустрічались дуже рідко (менше 3 % від усієї кількості клітин), а їх наявність в периферичній крові була морфологічним проявом онтогенезу червоних кров'яних клітин. За ЕЦД спостерігались значні зміни поверхневої архітектури еритроцитів. На фоні зменшення (до $69,7 \pm 2,18$ %) чисельності популяції функціонально повноцінних двовігнутих дисків мало місце збільшення кількості трансформованих клітин, що перебували на різних стадіях дегенерації. Серед них траплялись еліпсоподібні клітини, клітини у вигляді плоского диска (дискоцити), дискоцити з виростами, гребенями (ехіноцити), куполо- (стомато-

цити) та дзвоноподібні еритроцити, а також дегенеративно змінені клітини, які важко піддаються класифікації. Введення діабетичним щурам нікотинаміду викликало суттєве зменшення кількості трансформованих клітин. Вміст функціонально повноцінних двовігнутих дисків зростав до $(91,4 \pm 3,12)$ % від загальної кількості.

Сукупність фізико-хімічних властивостей мембран еритроцитів зумовлювала їх стійкість до дії несприятливих факторів. Про функціональний стан плазматичної мембрани еритроцитів судили за їх стійкістю до кислотного гемолітика, а про неспецифічну проникність еритроцитів – за накопиченням в клітинах барвника метиленового синього. Лізис еритроцитів у кислотному середовищі відбувається за трьома стадіями: проникнення іонів водню крізь плазматичну мембрану, протонування гемоглобіну та осмотичне руйнування еритроцитів. Кінетика гемолітичної трансформації включає стадії набухання, сферуляції та лізису [2]. Тому показники стійкості еритроцитів широко використовують в експериментальній медицині з метою характеристики їх функціонального стану. За ЕЦД суттєво зростала швидкість лізису клітин, а тривалість максимуму гемолізу нефракціонованих еритроцитів периферичної крові зменшувалась на 38,3 % (з $4,7 \pm 0,2$ хв у контролі до $2,9 \pm 0,1$ хв в експерименті). Одночасно скорочувалась на 0,6 хв тривалість сферуляції (набування клітинами сферичного стану) – передгемолітичної форми еритроцитів (табл. 1).

Аналіз типових кислотних еритрограмм нефракціонованих еритроцитів (рис. 1) свідчить

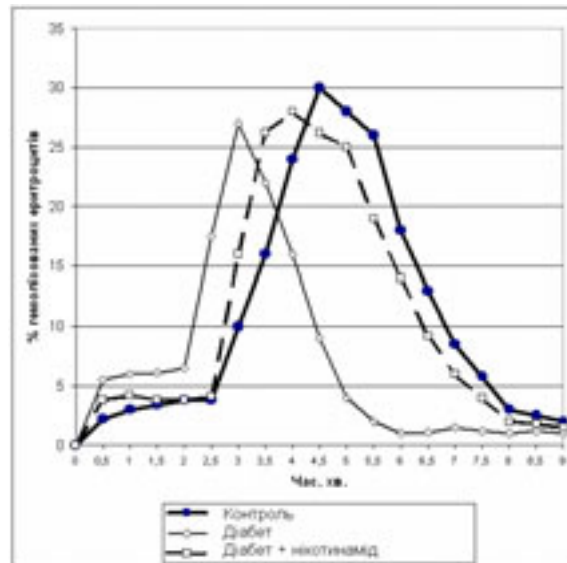


Рис. 1. Типові кислотні еритрограми нефракціонованих еритроцитів щурів у нормі, за стрептозотозинного діабету та введення нікотинаміду діабетичним щурам.

Таблиця 1 – Параметри кислотних еритрограм еритроцитів щурів за стрептозотоцинового діабету та введення їм нікотинамідом ($M \pm m$, $n=8-10$)

Показники	Умови дослідження		
	Контроль	Діабет	Діабет+нікотинамід
Нефракціоновані еритроцити			
Максимальний час гемолізу, хв	4,7±0,31	2,9±0,18*	4,2±0,23**
Тривалість сферуляції, хв	2,5±0,17	1,9±0,11*	2,3±0,17
Проникність еритроцитарної мембрани, %	61,8±4,28	80,3±5,76*	64,5±4,22**
Фракціоновані еритроцити			
Низькостійкі (старі), %	12,9±0,71	23,3±1,32*	16,5±1,13**
Середньостійкі (зрілі), %	52,5±3,43	58,7±4,14	53,7±3,92
Підвищеної стійкості, %	26,4±1,85	13,5±0,56*	22,9±1,73**
Високостійкі (молоді), %	8,2±0,33	4,5±0,19*	7,1±0,49**

Примітка. Тут і в таблицях 2, 3: * – зміни достовірні порівняно з контролем ($p < 0,05$); ** – зміни достовірні порівняно з діабетом ($p < 0,05$).

про посилене руйнування еритроцитів щурів за ЕЦД. Оскільки нефракціоновані еритроцити є сукупністю клітин різного ступеня зрілості й функціональної активності, окремі популяції істотно відрізняються між собою за стійкістю до кислотного гемолітика. Шляхом фракціонування еритроцитів контрольних щурів у градієнті густини сахарози нами було виділено чотири основні фракції: 12,9 % становили низькостійкі (умовна назва – старі), 52,5 % – середньостійкі (зрілі), 26,4% – підвищеної стійкості та 8,2 % – високостійкі (молоді) еритроцити. Розвиток цукрового діабету зумовлював перерозподіл фракційного складу популяцій клітин: майже вдвічі зростала кількість низькостійких еритроцитів за рахунок значного (на 48,9 %) зниження фракції еритроцитів підвищеної стійкості та високостійких (на 45,2 %). Саме низькостійкі (старі) еритроцити, які довгий час перебувають у руслі крові та зазнають більших пошкоджень, зумовлювали загальне скорочення часу гемолізу. Пошкодження еритроцитарної мембрани за ЕЦД підтверджувалось збільшенням на 30 % її загальної (неспецифічної) проникності для барвника – метиленового синього (див. табл. 1).

Тривала некомпенсована гіперглікемія за цукрового діабету зумовлює зростання рівня глікозильованого гемоглобіну, який разом з іншими факторами сприяє появі та розвитку гіпоксії, патогенетично пов'язаної з діабетичними мікроангіопатіями та нейропатіями [1, 3, 5]. Процес перебігає в периферичній крові протягом всього життя еритроцита як неензиматична посттрансляційна реакція глюкози з гемоглобіном, а отже, відображає глікемічний статус хворих на цукровий діабет. За ЕЦД в еритроцитах щурів виявлено значне (більш ніж у 2 рази) зростання вмісту глікозильованого гемоглобіну (табл. 2). Найвищий рівень глікозильованого гемоглобіну спостерігався у

фракції низькостійких (старих) еритроцитів, а найнижчий – у фракції високостійких (молодих). Оскільки процес глікозилювання є пропорційним тривалості контакту клітин з глюкозою, то старі еритроцити характеризуються вищим ступенем глікозилювання та, відповідно, більшим вмістом глікозильованого гемоглобіну.

Дослідження кисневотранспортної системи периферичної крові продемонстрували зміщення кисневої рівноваги гемоглобіну і зниження величини напівнасичення гемоглобіну киснем – P_{50} (див. табл. 2), що свідчило про зростання кисневого афінитету гемоглобіну, можливо, внаслідок суттєвого збільшення вмісту глікозильованого гемоглобіну. Підвищений кисневий афінитет HbA_{1c} безпосередньо пов'язаний із втратою чутливості до дії важливого внутрішньоеритроцитарного регулятора спорідненості гемоглобіну з киснем – 2,3-дифосфогліцерату (2,3-ДФГ). Молекула глюкози в процесі глікозилювання приєднується до NH_2 -групи β -ланцюга гемоглобіну, тобто саме до місця прикріплення 2,3-ДФГ, гемоглобін стає менш чутливим до дії цього алостеричного регулятора, і його спорідненість з киснем збільшується [2, 3]. Відомо, що підвищення в середовищі концентрації 2,3-ДФГ знижує спорідненість гемоглобіну з киснем і є механізмом адаптації організму до гіпоксії різного генезу, оскільки полегшується віддача кисню у тканинах. За ЕЦД вміст 2,3-ДФГ в еритроцитах збільшувався на 27 % (див. табл. 2), однак сумарний ефект взаємодії двох факторів, що модифікують структуру гемоглобіну – глікозилювання та підвищення концентрації 2,3-ДФГ, проявлявся зростанням спорідненості гемоглобіну з киснем. Механізм такого впливу ґрунтується на тому, що зв'язування 2,3-ДФГ є оборотним процесом, який покликаний швидко та ефективно змінювати спорідненість, тоді як глікозилювання зумовлює необоротну модифі-

Таблиця 2 – Напівнасичення гемоглобіну киснем та вміст модифікаторів спорідненості гемоглобіну з киснем в еритроцитах крові щурів за стрептозотоцинового діабету та введення їм нікотинаміду ($M \pm m$, $n=8-10$)

Показники	Умови досліджу		
	Контроль	Діабет	Діабет+нікотинамід
P_{50} , мм рт. ст.	26,6±2,11	19,2±1,60*	24,3±1,08**
P_{50} , кПа	3,2±0,10	2,2±0,14*	2,9±0,15**
2,3-Дифосфогліцерат, ммоль на 1 л еритроцитів	6,6±0,42	8,4±0,34*	5,9±0,37**
Глікозильований гемоглобін – HbA_{1c} , %	4,5±0,05	9,8±0,41*	5,1±0,28**

кацію гемоглобіну. Саме необоротність процесу глікозилювання призводить до зростання спорідненості гемоглобіну з киснем та зниженого надходження кисню в тканини за ЕЦД.

Вільнорадикальні процеси, що супроводжуються утворенням активних форм кисню і пероксидним окисненням біомолекул, постійно перебігають у тканинах, забезпечуючи їх оновлення та регуляцію клітинної активності. Порушення метаболічної рівноваги в бік збільшення генерації АФК і зменшення потужності систем антиоксидантного захисту (АОЗ) за цукрового діабету призводять до розвитку оксидативного стресу, що проявляється значною стимуляцією процесів пероксидації біомолекул та інгібуванням систем АОЗ [5, 7]. Про активацію пероксидного окиснення ліпідів у тканинах за ЕЦД свідчило значне підвищення вмісту проміжних та кінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів. Зокрема, вміст дієнових кон'югат в еритроцитах зростав у 2,3 рази, а вміст кінцевих молекулярних продуктів ліпопероксидації – ТБК-позитивних продуктів збільшувався на 87 %. Водночас в еритроцитах суттєво (на 46,8 %) зменшувався вміст відновленого глутатіону як одного з основних компонентів неензимної системи антиоксидантного захисту (табл. 3). Нагромадження активних форм кисню за ЕЦД зумовило вірогідне зростання вмісту нейтральних та основних 2,4-динітрофенілгідразонів, що віддзеркалювало утворення карбонільних груп у поліпептидних ланцюгах протеїнів. Під час окиснювальної модифікації протеїнів під впливом супероксид-

ного, гідроксильного та органічних радикалів атакувались переважно аміногрупи, які містились поряд з α -карбоним атомом у поліпептидному ланцюгу. ОН⁻-залежне відщеплення атома гідрогену від α -карбону та подальша взаємодія R-C⁻-радикала із супероксидним аніон-радикалом спричиняли утворення алкілпероксидних та алкоксильних радикалів. З утворенням останніх пов'язують можливість розщеплення пептидного зв'язку та подальшу протеолітичну фрагментацію протеїнових молекул, що має визначальне значення в апoptичній та некротичній загибелі клітин. Асоціація металів змінної валентності з молекулами протеїнів значно посилювала їх окиснювальну модифікацію, каталізовану металом. За таким механізмом здійснюється окиснювальна модифікація низки ензимів, зокрема ензимів антиоксидантного захисту – супероксиддисмутази, каталази та інших [4].

Введення діабетичним тваринам нікотинаміду зумовлювало підвищення стійкості еритроцитів до дії кислотного гемолітика, зменшувалась швидкість лізису клітин та зростав (на 45 %) час гемолізу. Одночасно знижувалась загальна проникність еритроцитарної мембрани (на 20,7 % порівняно з діабетичними тваринами) (див. табл. 1). Нормалізація розподілу різновікових популяцій еритроцитів під дією нікотинаміду викликала суттєве зменшення вмісту глікозильованого гемоглобіну (на 47,6 %) та 2,3-ДФГ (на 30 %). Внаслідок змін концентрації модифікаторів спостерігались зниження спорідненості гемоглобіну з киснем

Таблиця 3 – Вміст продуктів пероксидного окиснення ліпідів і окиснювальної модифікації протеїнів в еритроцитах крові щурів за стрептозотоцинового діабету та введення їм нікотинаміду ($M \pm m$, $n=8-10$)

Показники	Умови досліджу		
	Контроль	Діабет	Діабет+нікотинамід
Дієнові кон'югати, нмоль на 1 мг протеїну	14,3±0,71	33,2±1,59*	18,6±1,24**
ТБК-позитивні продукти, нмоль на 1 мг протеїну	8,4±0,58	15,7±0,81*	9,89±0,65**
Відновлений глутатіон, нмоль на 1 мг протеїну	4,7±0,23	2,5±0,24*	5,06±0,32**
Нейтральні 2,4-динітрофеніл-гідразони (λ 370 нм), мкмоль на 1 мг протеїну	0,55±0,04	1,11±0,07*	0,60±0,04**
Основні 2,4-динітрофеніл-гідразони (λ 430 нм), мкмоль на 1 мг протеїну	0,71±0,05	1,30±0,11*	0,79±0,05**

та зростання величини P_{50} (з 19,2 мм рт. ст. за діабету до 24,3 мм рт. ст. за введення нікотинаміду) (див. табл. 2).

Антиоксидантні властивості нікотинаміду та його здатність знижувати інтенсивність ПОЛ за цукрового діабету ґрунтуються на безпосередній взаємодії з гідропероксидами ліпідів з утворенням N-оксиду [7]. Виявлено, що введення нікотинаміду зумовлювало зменшення вмісту дієнових кон'югат (на 44 %), ТБК-позитивних продуктів (на 37,1 %) та підвищувало (на 101 %) вміст відновленого глутатіону в еритроцитах діабетичних щурів (див. табл. 3).

Механізм дії нікотинаміду як попередника в біосинтезі NAD^+ ґрунтується, перш за все, на його здатності змінювати окисно-відновний стан нікотинамідних коензимів (співвідношення $NAD^+/NADH$) в клітинах і, тим самим, забезпечувати узгодженість перебігу дегідрогеназних, оксидазних та пероксидазних процесів [5, 7]. Крім того, ADP-рибозу, що утворюється при розщепленні молекули NAD^+ , використовують як субстрат в реакціях полі-ADP-рибозилування протеїнів ядра з участю полі-ADP-рибозополімерази. Цей ензим служить тригером у системі ензиматичної репарації одно- та дволанцюгових розривів ДНК, спри-

чинених дією цитотоксичних та генотоксичних агентів [8]. Також відомо, що механізм дії нікотинаміду в β -клітинах підшлункової залози опосередковується cADP-рибозою, яка утворюється з NAD^+ , та є вторинним посередником внутрішньоклітинного вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулума, а отже, глюкозоіндукованої секреції інсуліну β -клітинами [10].

ВИСНОВКИ. 1. За експериментального стрептозотоцинового діабету зміни в системі еритроциту проявляються посиленням еритропоезу та зростанням поліморфізму еритроцитарної популяції.

2. Зменшується стійкість еритроцитів до дії кислотного гемолітика, зростають спорідненість гемоглобіну з киснем, вміст глікозильованого гемоглобіну та 2,3-дифосфогліцерату. В еритроцитах активуються процеси пероксидації ліпідів, окисної модифікації протеїнів та знижується вміст відновленого глутатіону.

3. Введення нікотинаміду діабетичним тваринам нормалізує кисневотранспортну функцію еритроцитів, зумовлює зниження швидкості утворення продуктів ПОЛ та зростання вмісту відновленого глутатіону.

ЛІТЕРАТУРА

1. Боднар Т.П., Шмаров Д.А., Козинець Г.И. Морфологический и биохимический анализ эритроцитов у больных с поздними сосудистыми осложнениями сахарного диабета // *Клин. лаб. диагностика.* – 2003. – № 8. – С. 37-40.
2. Великий М.М., Бурда В.А., Сергієчко О.О., Оліярник О.Д. Вплив нікотинаміду на стан киснево-транспортної системи периферичної крові при цукровому діабеті // *Ліки.* – 1997. – № 5. – С. 17-23.
3. Великий Н.Н., Бурда В.А., Обросова И.Г. и др. Корректирующий эффект никотинамида на процессы гликозилирования гемоглобина при стрептозотоциновом диабете у крыс // *Вопр. мед. хим.* – 1995. – **41**, вып. 1. – С. 36-38.
4. Дубініна О.Ю. Окислювальний стрес і окислювальна модифікація білків // *Мед. хімія.* – 2001. – **3**, № 2. – С. 5-12.
5. Козицький З.Я., Кучмеровська Т.М., Великий М.М. та ін. Оксидативний стрес за периферичної діабетичної нейропатії: ефект нікотинаміду та інгібіторів альдозоредуктази // *Мед. хімія.* – 2002. – **4**, № 3. – С. 11-16.
6. Сибірна Н.О., Великий М.М. Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові. Навчальний посібник. – Львів: ЛНУ, 1997. – 69 с.
7. Шиманський І.О., Кучмеровська Т.М., Донченко Г.В. та ін. Корекція нікотинамідом та нікотиніол-ГАМК оксидативного стресу за діабетичної нейропатії // *Укр.біохім. журн.* – 2002. – **74**, № 5. – С. 89-95.
8. Ame J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. The PARP superfamily // *Bioessays.* – 2004. – **26**, № 8. – P. 882-893.
9. Gale A.M. Molecular mechanisms of beta-cell destruction in IDDM. The role of nicotinamide // *Horm. Research.* – 1996. – **45**, № 1. – P. 40-43.
10. Guse A.H. Second messenger function and structure-activity relationship of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR) // *FEBS J.* – 2005. – **272**, № 18. – P. 4590-4597.
11. Hawa M.I., Beyan H., Buckley L.D., Leslie R.D. Impact of genetic and non-genetic factors in type 1 diabetes // *Am. J. Med. Genet.* – 2002. – **115**, № 1. – P. 8-17.

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИСТЕМЫ ЭРИТРОНА КРЫС ПРИ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВОМ ДИАБЕТЕ: ЭФФЕКТ НИКОТИНАМИДА

Н.Н. Великий¹, Н.А. Сибирная², Т.М. Кучмеровская¹, В.А. Бурда², Г.В. Донченко¹
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А.В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАИНЫ¹, КИЕВ
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ИВАНА ФРАНКА²

Резюме

Установлено, что при экспериментальном стрептозотоциновом диабете изменения в системе эритронов проявляются усилением эритропоэза и возрастанием полиморфизма эритроцитарной популяции. Эритроциты периферической крови становятся более чувствительными к действию кислотного гемолитика, повышаются сродство гемоглобина с кислородом, содержание гликозилированного гемоглобина и 2,3-дифосфоглицерата. В эритроцитах активируются процессы свободнорадикальной пероксидации липидов, окислительной модификации протеинов и снижается содержание восстановленного глутатиона. Введение диабетическим животным никотинамида, в основе биохимического механизма действия которого лежит усиление биосинтеза NAD^+ в тканях, вызывало нормализацию кислородтранспортной функции эритроцитов, обуславливало уменьшение скорости образования продуктов ПОЛ и возрастание содержания восстановленного глутатиона.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: никотинамид, стрептозотоциндуцированный диабет, кислотный гемолиз эритроцитов, гликозилированный гемоглобин, сродство гемоглобина с кислородом, 2,3-дифосфоглицерат, свободнорадикальные процессы.

FUNCTIONAL FEATURES OF RAT ERYTHRON SYSTEM AT STREPTOZOTOCIN DIABETES: EFFECT OF NICOTINAMIDE

M.M. Velyky¹, N.O. Sybirna², T.M. Kuchmerovska¹, V.A. Burda², H.V. Donchenko¹
INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY BY O.V. PALLADIN OF NAS OF UKRAINE¹, KYIV
LVIV NATIONAL UNIVERSITY BY IVAN FRANKO²

Summary

Streptozotocin-induced diabetes in rats was accompanied by increase of erythropoiesis and augmentation of polymorphism in erythrocyte population. Erythrocytes from peripheral blood were more sensitive to action of acidic hemolytics. Lowering of reduced glutathione content was accompanied by increase of free-radical lipid peroxidation processes and oxidative modification of proteins within erythrocytes. Treatment with nicotinamide, which is involved into NAD^+ biosynthesis, caused normalization of hemoglobin affinity to oxygen, decreased the rate of lipid peroxidation products formation and enhanced contents of reduced glutathione.

KEY WORDS: nicotinamide, streptozotocin-induced diabetes, acidic hemolysis of erythrocytes, glycosylated hemoglobin, affinity of hemoglobin to oxygen, 2,3-diphosphoglycerate, free-radical lipid peroxidation processes.

Отримано 28.03.2008 р.

Адреса для листування: М.М. Великий, Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, Київ-601, 01601, Україна.

УДК 577.152.199.2:616.36-018.1:615.9:546.173/.175:615.356

ОКСИГЕНАЗНІ РЕАКЦІЇ В МІКРОСОМАЛЬНІЙ ФРАКЦІЇ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ ЗА УМОВ НІТРИТНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ТА КОРЕКЦІЇ ВІТАМІНАМИ-АНТИОКСИДАНТАМИ

О.В. Задоріна, Г.І. Парамонова, А.С. Ягупова, Ю.І. Губський
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ
ІНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ

У результаті проведених досліджень встановлено, що за умов гострого та хронічного отруєння щурів нітритом натрію відбувається активація НАДФН-залежного, аскорбатзалежного та неініційованого пероксидного окиснення ліпідів (НЗП, АЗП та НІ ПОЛ відповідно) в мікросомальній фракції гепатоцитів. При цьому знижується активність мікросомальної амінопірин-N-деметилази, активність анілін-p-гідроксилази не змінюється. Введення щурам з метою профілактики гострого отруєння нітритом натрію α -токоферол-ацетату та аскорбінової кислоти приводить до нормалізації процесів пероксидації ліпідів та активності амінопірин-N-деметилази. Введення цих вітамінів для корекції хронічної нітритної інтоксикації сприяє частковій нормалізації даних процесів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нітрит натрію, печінка, мікросомальна фракція, амінопірин-N-деметилаза, анілін-p-гідроксилаза, пероксидне окиснення ліпідів, α -токоферол-ацетат, аскорбінова кислота.

ВСТУП. Серед найбільш розповсюджених забруднювачів навколишнього середовища азотомісні речовини, зокрема нітрати та нітрити, займають одне з провідних місць [2-5, 8, 10, 12, 14]. Внаслідок нераціонального використання азотних добрив, забруднення доквілля промисловими і побутовими відходами зростає вміст нітратів у питній воді та харчових продуктах [3, 10]. Нітрити відносять до основних азотомісних забруднювачів довкілля, які становлять реальну небезпеку для здоров'я людини. Першою мішенню для їх токсичної дії на організм є кров та печінка. Нітрит натрію – класичний метгемоглобіноутворювач [2, 10, 12]. За умов його дії на організм розвиваються метгемоглобінемія, гемічна гіпоксія та токсичний гепатоз. Згідно з дослідженнями *in vitro*, нітрит натрію взаємодіє з оксигемоглобіном і призводить до утворення активних радикалів: NO_2^{\cdot} , O_2^{\cdot} , $\cdot\text{OH}$, NO_2^{\cdot} [15]. Названі метаболіти – активні реагенти, які уражують біологічні системи, мають виражену цитотоксичну дію, ініціюють процеси пероксидації ліпідів. Токсична дія NaNO_2 може бути пов'язана з процесами радикального пошкодження білкових та клітинних

© О.В. Задоріна, Г.І. Парамонова, А.С. Ягупова, Ю.І. Губський, 2008.

структур у результаті реакцій пероксидації [12, 14]. Кінцевий продукт відновлення нітратів в організмі людини оксид азоту – універсальний регулятор метаболізму, який здатний окиснюватись до NO_3^- та еліминуватись нирками. Крім того, NO взаємодіє з білками та низькомолекулярними сполуками, які містять в активному центрі іони металів зі змінною валентністю [13]. Внаслідок цього відбувається інактивація багатьох ферментів, насамперед залізовмісних, що стає причиною розвитку гемічної та первинної тканинної гіпоксії, недостатності основних ферментів антиоксидантного захисту.

Метою даного дослідження було вивчення оксигеназних реакцій в мікросомальній фракції гепатоцитів щурів за умов дії на організм різних доз та різних способів введення NaNO_2 , а також корекції вітамінами-антиоксидантами.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на білих безпородних щурах-самцях масою 160-220 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Моделювали гостру нітритну інтоксикацію шляхом введення нітриту натрію (NaNO_2) в дозах 10 і 40 мг/кг маси тіла тварини підшкірно. В хронічному експерименті нітрит натрію вводили у вигляді води для пиття

в дозі 1 мг/мл протягом 2-х місяців. З метою вивчення можливостей корекції в хронічному експерименті за 5 днів до евтаназії тваринам вводили аскорбінову кислоту (5 мг/кг маси на добу підшкірно), фармакопейний α -токоферол-ацетат ($E_{\text{фарм.}}$) в дозі 50 мг/кг маси на добу per os. Група щурів, яким моделювали гостру нітритну інтоксикацію, з профілактичною метою отримувала фармакопейний α -токоферол-ацетат в дозі 50 мг/кг маси на добу per os протягом 5 днів перед отруєнням. Матеріал для дослідження забирали під легким ефірним наркозом через 50-60 хв після введення нітриту натрію на висоті метгемоглобіноутворення. Мікросомальну фракцію клітин печінки виділяли методом ультрацентрифугування [7]. Визначення НАДФН-залежного, аскорбатзалежного і неініційованого пероксидного окиснення ліпідів проводили за накопиченням малонового діальдегіду (МДА), який визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) [1] з деякими модифікаціями: депротейнізацію і зупинку реакції ПОЛ здійснювали шляхом додавання суміші 10 % трихлороцтової кислоти (ТХО) і 10^{-2} М ЕДТА [6]. Амінопірин-N-деметилазну та анілін-р-гідроксилазну активність мікросомальної фракції гепатоцитів визначали за методом [7]. Статистичну обробку одержаних даних проводили варіаційно-статистичним методом з використанням коефіцієнта "t" Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. З огляду на дані літератури про те, що нітрит натрію є генератором утворення активних форм кисню (АФК) [15], актуальним було вивчити розвиток вільнорадикальних процесів та активність ферментів монооксигеназної системи в мікросомальній фракції гепатоцитів щурів при нітритній інтоксикації. З даних літератури відомо, що нітрит натрію – класичний метгемоглобіноутворювач [8]. Для метгемоглобіноутворювача характерне окиснення двовалентного заліза ге-

моглобіну в тривалентне із втратою здатності до зворотного зв'язку з киснем і розвитком гемічної гіпоксії різного ступеня. У дослідженнях, проведених нами раніше, було показано, що введення щурам як внутрішньовенно, так і підшкірно NaNO_2 в дозі, більшій 15 мг/кг маси, приводило до різкого підвищення рівня метгемоглобіну в крові досліджуваних тварин порівняно з контрольною групою [12].

Результати проведених нами досліджень свідчать про те, що за умов введення NaNO_2 підшкірно в дозах 10 та 40 мг/кг маси щура (гострий дослід) відбувалась активація процесів пероксидного окиснення ліпідів у мікросомальній фракції гепатоцитів тварин (табл. 1).

Введення NaNO_2 підшкірно в дозі 10 мг/кг маси щура приводило до активації НАДФН-залежного ПОЛ в мікросомах печінки в 1,9 раза, аскорбатзалежного – в 1,6 раза, неініційованого – в 2,7 раза. Введення щурам NaNO_2 підшкірно в дозі 40 мг/кг маси щура зумовлювало активацію НАДФН-залежного ПОЛ в мікросомах печінки в 1,5 раза, аскорбатзалежного – в 1,5 раза, неініційованого – в 2,2 раза. За умов введення нітриту натрію в організм щурів у вигляді води для пиття в дозі 1 мг/мл протягом 2-х місяців (хронічний дослід) також відбувалась значна активація процесів пероксидації ліпідів у мікросомальній фракції клітин печінки (табл. 2). При цьому НАДФН-залежне ПОЛ в мікросомальній фракції клітин печінки активувалось в 4,6 раза, аскорбатзалежне – в 4,9 раза, неініційоване – в 5,3 раза порівняно з контролем.

Аналіз результатів проведених досліджень показав, що потрапляння в організм щурів нітриту натрію приводило до значної активації процесів пероксидації ліпідів у мікросомальній фракції гепатоцитів. Особливо інтенсивно активація ПОЛ відбувалась при надходженні нітриту натрію в організм щурів у вигляді води для пиття протягом 2-х місяців у дозі 1 мг/мл. Акти-

Таблиця 1 – Процеси пероксидації ліпідів у мікросомах печінки щурів за умов гострої нітритної інтоксикації та корекції вітамінами-антиоксидантами ($M \pm m$, $n=10-12$)

Група тварин, умови досліді	НЗП, мкмоль МДА/мг білка·30 хв	АЗП, мкмоль МДА/мг білка·30 хв	НІ ПОЛ, мкмоль МДА/мг білка·30 хв
1. Контроль	$0,67 \pm 0,02$	$0,73 \pm 0,24$	$0,15 \pm 0,03$
2. + NaNO_2 10 мг/кг підшкірно	$1,28 \pm 0,32^*$	$1,18 \pm 0,07^*$	$0,41 \pm 0,16^*$
3. + NaNO_2 40 мг/кг підшкірно	$0,98 \pm 0,11^*$	$1,13 \pm 0,09^*$	$0,33 \pm 0,08^*$
4. + NaNO_2 10 мг/кг підшкірно + α -токоферол-ацетат	$0,74 \pm 0,05^{**}$	$0,67 \pm 0,11^{**}$	$0,21 \pm 0,04^{**}$
5. + NaNO_2 40 мг/кг підшкірно + α -токоферол-ацетат	$0,59 \pm 0,22^{**}$	$0,73 \pm 0,24^{**}$	$0,15 \pm 0,03^{**}$

Примітка. Тут і в наступних таблицях: * – вірогідна різниця ($p < 0,05$) порівняно з контролем; ** – вірогідна різниця ($p < 0,05$) порівняно з групою отруєних тварин.

вацію процесів ПОЛ за умов введення нітриту натрію у різних дозах в гострих та хронічних дослідах показано в наших дослідженнях [12] та іншими вченими [14].

З метою корекції метаболічних порушень проводили антиоксидантну терапію вітамінами Е та С. За умов хронічного отруєння нітритом натрію вітаміни-антиоксиданти вводили за 5 днів до евтаназії тварин, при гострому отруєнні нітритом натрію вітамін Е вводили з профілактичною метою протягом 5 днів до отруєння.

Введення щурам фармакопейного α -токоферол-ацетату в дозі 50 мг/кг маси на добу per os протягом 5 днів перед гострим отруєнням нітритом натрію приводило до корекції процесів пероксидного окиснення ліпідів у мікросомальній фракції клітин печінки (див. табл. 1). При цьому відбувалось зниження до норми НАДФН-залежного, аскорбатзалежного та неініційованого ПОЛ у мікосомлах печінки. Введення щурам α -токоферол-ацетату в дозі 50 мг/кг маси на добу per os на тлі хронічної нітритної інтоксикації протягом 5 днів перед евтаназією тварин приводило до достовірного ($p < 0,05$) зниження НЗП в мікосомлах гепатоцитів на 58,5 % порівняно з групою отруєних щурів, але мала місце вірогідна ($p < 0,05$) відмінність від контрольної групи (див. табл. 2). АЗП в мікосомлах гепатоцитів за умов корекції α -токоферол-ацетатом достовірно ($p < 0,05$) зменшувалось до норми. НІ ПОЛ в мікосомлах гепатоцитів при цьому достовірно ($p < 0,05$) знижувалось на 28,8 % порівняно з групою отруєних тварин, але вірогідно відрізнялось від контрольної групи.

Введення щурам аскорбінової кислоти в дозі 5 мг/кг маси на добу підшкірно на тлі хронічної нітритної інтоксикації за 5 днів до евтаназії приводило до нормалізації НАДФН-залежного, аскорбатзалежного пероксидного окиснення ліпідів у мікросомальній фракції гепатоцитів, неініційоване ПОЛ за цих умов залишалось високим і достовірно ($p < 0,05$) відрізнялося від контрольної групи.

Основна роль в біотрансформації ксенобіотиків, до яких відносять і нітрити та нітрати, що застосовуються в народному і сільському господарстві, побуті, належить ферментам ендоплазматичного ретикула [7, 9, 11]. В результаті метаболізму ферментами монооксигеназної системи ксенобіотики набувають більшої полярності, що сприяє їх кон'югації та елімінації з організму [9, 11]. До хімічних сполук, механізм ушкоджувальної дії яких на біологічні мембрани пов'язаний зі стимуляцією процесів пероксидного окиснення ліпідів, відносять і нітрит натрію, що було показано в наших дослідженнях.

Зміни каталітичних характеристик, які спостерігаються при ліпопероксидному окисненні, можуть відбуватися як за рахунок змін фізико-хімічних властивостей ліпідного бішару або ануляричних ліпідів з наступною модифікацією конформації мембранозв'язаних білків, так і внаслідок порушень структури та властивостей білкових молекул. Ліпідна фаза не тільки формує певне гідрофобне оточення навколо білка, необхідне для підтримки нативної конформації ферменту, але і створює умови для певної рухомості білкової молекули в площині мембран, без якої неможливе виконання її специфічної функції.

Викликало цікавість вивчення стану детоксуючої системи ендоплазматичного ретикула печінки щурів при активації пероксидного окиснення мембранних ліпідів за умов нітритної інтоксикації та введення вітамінів-антиоксидантів.

Проведені дослідження показали, що за умов пероксидного ушкодження мембран гепатоцитів при нітритній інтоксикації порушувалась амінопірин-N-деметилазна активність мікосом печінки щурів (табл. 3, 4).

За умов введення нітриту натрію в дозі 10 мг/кг відбувалось статистично достовірне (на 40,0 % порівняно з контролем) зменшення амінопірин-N-деметилазної активності мікосом клітин печінки (див. табл. 3). Введення щурам нітриту натрію в дозі 40 мг/кг приводило

Таблиця 2 – Процеси пероксидації ліпідів у мікосомлах клітин печінки за умов хронічної нітритної інтоксикації та дії вітамінів-антиоксидантів ($M \pm m$, $n=10-12$)

Група тварин, умови дослідження	НЗП, мкмоль МДА/мг білка·30 хв	АЗП, мкмоль МДА/мг білка·30 хв	НІ ПОЛ, мкмоль МДА/мг білка·30 хв
1. Контроль	0,67±0,20	0,73±0,24	0,15±0,03
2. + NaNO ₂ пиття протягом 2-х міс. (1 мг/мл)	3,06±0,12*	3,61±0,12*	0,80±0,08*
3. + NaNO ₂ пиття протягом 2-х міс. (1 мг/мл) + α -токоферол-ацетат	1,27±0,19***	0,61±0,07**	0,57±0,02***
4. + NaNO ₂ пиття протягом 2-х міс. (1 мг/мл) + аскорбінова кислота	0,61±0,20**	0,50±0,11**	0,82±0,12*

Таблиця 3 – Амінопірин-N-деметилазна активність мікосом клітин печінки щурів за умов нітритної інтоксикації та корекції α -токоферол-ацетатом (нмоль ФА/г-тканини·хв), n=10-12

Контроль	+NaNO ₂ 10 мг/кг (гострий дослід)	+NaNO ₂ 40 мг/кг (гострий дослід)	+NaNO ₂ 10 мг/кг + α -токоферол-ацетат	+NaNO ₂ 40 мг/кг + α -токоферол-ацетат
168,4±16,1	101,1±15,6*	87,7±16,2*	143,5±8,3**	128,3±22,1**

Таблиця 4 – Амінопірин-N-деметилазна активність мікосом клітин печінки щурів за умов нітритної інтоксикації та дії вітамінів-антиоксидантів (нмоль ФА/г-тканини·хв), n=10-12

Контроль	+NaNO ₂ пиття протягом 2 міс. (1 мг/мл)	+NaNO ₂ пиття протягом 2 міс. (1 мг/мл) + α -токоферол-ацетат	+NaNO ₂ пиття протягом 2 міс. (1 мг/мл) + віт.С
168,4±16,1	66,7±3,1*	96,5±5,4**	236,2±35,9**

Таблиця 5 – Активність р-гідроксилювання аніліну за умов гострого та хронічного отруєння нітритом натрію, n=10-12

Контроль		+NaNO ₂ 10 мг/кг (гострий дослід)		+NaNO ₂ 40 мг/кг (гострий дослід)		+NaNO ₂ пиття протягом 2 міс. (1 мг/мл)	
нмоль ПАФ/ мг білка·хв	нмоль ФА/г тканини·хв	нмоль ПАФ/ мг білка·хв	нмоль ФА/г тканини·хв	нмоль ПАФ/ мг білка·хв	нмоль ФА/г тканини·хв	нмоль ПАФ/ мг білка·хв	нмоль ФА/г тканини·хв
0,045±0,005	2,67±0,31	0,035±0,008	2,25±0,28	0,040±0,006	2,3 6±0,34	0,034±0,004	2,28±0,32

до зниження амінопірин-N-деметилазної активності на 48,0 % порівняно з контролем. Введення щурам α -токоферол-ацетату в дозі 50 мг/кг маси на добу per os протягом 5 днів з профілактичною метою перед отруєнням нітритом натрію (10 мг/кг підшкірно) зумовлювало достовірне ($p < 0,05$) підвищення амінопірин-N-деметилазної активності мікосом печінки на 41,9 % порівняно з групою отруєних тварин, від контролю вона не відрізнялась.

Введення щурам α -токоферол-ацетату в дозі 50 мг/кг маси на добу per os протягом 5 днів перед отруєнням нітритом натрію (40 мг/кг підшкірно) також приводило до достовірного ($p < 0,05$) зростання амінопірин-N-деметилазної активності мікосом печінки на 46,3 % порівняно з групою отруєних тварин, від контролю не відрізнялась.

За умов введення в організм щурів нітриту натрію у вигляді води для пиття в дозі 1 мг/мл протягом 2-х місяців (хронічний дослід) також відбувалось значне зменшення активності амінопірин-N-деметилази мікосомальної фракції клітин печінки – на 60,4 % (див. табл. 4).

Введення щурам α -токоферол-ацетату в дозі 50 мг/кг маси на добу per os на тлі хронічної нітритної інтоксикації протягом 5 днів перед евтаназією тварин приводило до достовірного ($p < 0,05$) підвищення активності амінопірин-N-деметилази мікосомальної фракції клітин печінки на 44,7 % порівняно з групою отруєних тварин, але вона залишалась зниженою порівняно з контрольною групою. Введення щурам

аскорбінової кислоти в дозі 5 мг/кг маси на добу підшкірно за 5 днів до евтаназії зумовлювало зростання активності амінопірин-N-деметилази мікосомальної фракції клітин печінки в 3,5 раза порівняно з групою отруєних тварин, але вона відповідала контролю.

Зниження активності окиснювального N-гідроксилювання амінопіринину за умов нітритної гіпоксії, можливо, пов'язане з порушенням структури гідрофобних ділянок ліпідного бішару мембран ендоплазматичного ретикула гепатоцитів, які зв'язують субстрати 1-го типу. Вивчення анілін-р-гідроксилази показало, що активність цього ферменту при нітритній інтоксикації не змінювалась (табл. 5).

Результати дослідження свідчать про те, що внаслідок ліпопероксидного окиснення мембранних ліпідів за умов нітритної інтоксикації відбувалось зниження N-деметилазної активності мікосомальної фракції клітин печінки. Активність анілін-р-гідроксилази мікосомальної фракції клітин печінки при нітритній інтоксикації не змінювалась.

Введення щурам з метою профілактики гострого отруєння нітритом натрію вітамінів-антиоксидантів – α -токоферол-ацетату й аскорбінової кислоти – приводить до нормалізації амінопірин-N-деметилазної активності мікосом клітин печінки. Введення аскорбінової кислоти для корекції хронічної нітритної інтоксикації сприяє нормалізації активності амінопірин-N-деметилази, а введення α -токоферол-ацетату – частковій нормалізації.

ВИСНОВКИ. 1. За умов гострого (10 та 40 мг/кг маси щура) та хронічного отруєння щурів нітритом натрію (введення NaNO_2 у вигляді води для пиття в дозі 1 мг/мл протягом 2-х місяців) відбуваються активація НЗП, АЗП та НІ ПОЛ і зниження активності амінопірин-N-деметилази мікросомальної фракції клітин печінки. Активність анілін-p-гідроксилази не змінюється.

2. Введення щурам α -токоферол-ацетату в дозі 50 мг/кг маси на добу *per os* протягом 5 днів перед гострим отруєнням нітритом натрію з профілактичною метою приводить до корекції процесів ПОЛ та нормалізації амінопірин-N-деметилазної активності мікросом печінки.

3. Введення щурам α -токоферол-ацетату в дозі 50 мг/кг маси на добу *per os* на тлі хронічної нітритної інтоксикації протягом 5 днів перед евтаназією тварин приводить до нормалізації АЗП і зниження НЗП та НІ ПОЛ, які ще

достовірно відрізняються від контролю. При цьому відбувається достовірне підвищення активності амінопірин-N-деметилази мікросомальної фракції клітин печінки на 44,7 % порівняно з групою отруєних тварин, але вона залишається зниженою порівняно з контрольною групою. Активність анілін-p-гідроксилази не змінюється.

4. Введення щурам аскорбінової кислоти в дозі 5 мг/кг маси на добу підшкірно на тлі хронічної нітритної інтоксикації за 5 днів до евтаназії приводить до нормалізації НЗП, АЗП у мікросомальній фракції гепатоцитів. НІ ПОЛ за цих умов залишається високим і достовірно ($p < 0,05$) відрізняється від контрольної групи. Введення аскорбінової кислоти з метою корекції зумовлює підвищення активності амінопірин-N-деметилази мікросомальної фракції клітин печінки в 3,5 раза порівняно з групою отруєних тварин, і вона відповідає контролю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах: Монография. – М.: Наука, 1972. – 243 с.

2. Горішна О.В. Комплексна екологічна та медико-біологічна корекція метгемоглобінемії у дітей, які проживають на нітратнозабруднених територіях // Мед. хімія. – 2002. – 4, № 1. – С.77-79.

3. Грузева О.В. Стан забруднення довкілля в країнах Європи та Україні // Укр. науково-медичний молодіжний журн. – 2007. – № 1-2. – С. 36-40.

4. Губский Ю.И. Коррекция химического поражения печени. – К.: Здоров'я, 1989. – 168 с.

5. Губский Ю.И., Долго-Сабуров В.Б., Храпак В.В. Химические катастрофы и экология. – К.: Здоров'я, 1993. – 224 с.

6. Губський Ю.І., Дунаєв В.В., Беленічев І.Ф. та ін. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно-активних сполук при ініціюванні вільнорадикальних процесів у досліджах *in vitro* // Метод. рекомендації Держфармцентру МОЗ України. – К., 2002. – 26 с.

7. Карузина И.И., Арчаков А.И. Выделение микросомной фракции и характеристика ее окислительных систем // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 49-62.

8. Лужников Е.А., Костомарова Л.Г. Острые отравления: Руководство для врачей. – М.: Меди-

цина, 1989. – 432 с.

9. Лукиенко П.И., Бушма М.И. Биологическая роль монооксигеназ и пути управления их активностью // Вопр. мед. химии. – 1986. – № 5. – С. 14-19.

10. Опополь Н.И., Добрянская Е.В. Нитраты. – Кишинев, 1986. – 114 с.

11. Парамонова Г.И. Микросомальное окисление лекарственных веществ в печени при старении // Проблемы старения и долголетия. – 1991. – 1, № 2. – С. 192-203.

12. Поберезкина Н.Б., Задорина О.В., Андрищенко П.И., Хмелевский Ю.В. Роль процессов перекисного окисления и антиоксидантной защиты при нитритной гипоксии и ее коррекции витаминами // Укр. биохим. журн. – 1992. – 64, № 6. – С. 64-70.

13. Реутов В.П., Гоженко А.И., Насибуллин Б.А. и др. Анализ циклических процессов с участием оксида азота в организмах и молекулярного азота в биосфере с позиций голографического принципа и принципа цикличности. – Одесса, 2003. – 66 с.

14. Фіра Л.С., Гонський Я.І. Метаболічні порушення в організмі тварин, уражених нітритом натрію // Мед. хімія. – 2003. – 5, № 3. – С. 64-67.

15. Шугалей И.В., Лопатина Н.И., Целинский И.В. Особенности кинетики вырожденного разветвления цепей реакции окисления оксигемоглобина нитрит-ионом // Журн. общей химии. – 1989. – 59, № 7. – С.1624-1628.

ОКСИГЕНАЗНЫЕ РЕАКЦИИ В МИКРОСОМАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС В УСЛОВИЯХ НИТРИТНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И КОРРЕКЦИИ ВИТАМИНАМИ-АНТИОКСИДАНТАМИ

О.В. Задорина, Г.И. Парамонова, А.С. Ягупова, Ю.И. Губский
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ А.А. БОГОМОЛЬЦА
ИНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ

Резюме

В результате проведенных исследований показано, что в условиях острого и хронического отравления крыс нитритом натрия происходит активация НАДФН-зависимого, аскорбатзависимого и неиницированного пероксидного окисления липидов (НЗП, АЗП и НИ ПОЛ соответственно) в микросомальной фракции гепатоцитов. При этом снижается активность микросомальной аминопирин-N-деметилазы, активность анилин-p-гидроксилазы не изменяется. Введение крысам с целью профилактики острого отравления нитритом натрия α -токоферол-ацетата и аскорбиновой кислоты приводит к нормализации процессов пероксидации липидов и активности аминопирин-N-деметилазы. Введение этих витаминов для коррекции хронической нитритной интоксикации способствует частичной нормализации данных процессов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нитрит натрия, печень, микросомальная фракция, аминопирин-N-деметилаза, анилин-p-гидроксилаза, пероксидное окисление липидов, α -токоферол-ацетат, аскорбиновая кислота.

OXYGENASE REACTIONS IN MYCROSOMAL FRACTION OF RAT HEPATOCYTES UNDER NITRITE INTOXICATION AND CORRECTION WITH VITAMINS-ANTIOXYDANTS

O.V. Zadorina, H.I. Paramonova, A.S. Yagupova, Yu.I. Hubsy
NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY O.O. BOHOMOLETS
INSTITUTE OF GERONTOLOGY OF AMS OF UKRAINE

Summary

It has been shown that activation of NADPH-dependent, ascorbate-dependent and noninitiated lipid peroxidation in mycrosomal fraction of hepatocytes has place under acute and chronic poisoning of rats with sodium nitrite. Activity of mycrosomal aminopyrine-N-demethylase decreases, activity of aniline-p-hydroxylase does not change under these conditions. Injection of α -tocopherol acetate and ascorbic acid to rats for prophylactics of acute poisoning with sodium nitrite normalizes the processes of lipid peroxidation and activity of aminopyrine-N-demethylase. Injection of these vitamins for correction of chronic nitrite intoxication promotes to particular normalization of these processes.

KEY WORDS: sodium nitrite, liver, mycrosomal fraction, aminopyrine-N-demethylase, aniline-p-hydroxylase, lipid peroxidation, α -tocopherol acetate, ascorbic acid.

Отримано 4.03.2008 р.

Адреса для листування: Ю.І. Губський, Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, б-р Т. Шевченка, 13, Київ, 16001, Україна.

ВПЛИВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ НА АКТИВНІСТЬ ФЕРМЕНТІВ КОН'ЮГАЦІЙНОЇ ФАЗИ МЕТАБОЛІЗМУ КСЕНОБІОТИКІВ У ЩУРІВ

О.Х. Герич, О.О. Пентюк

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА

У печінці щурів зі стрептозотоциновим цукровим діабетом реєструються збільшення активності УДФ-глюкуронозилтрансферази, зниження активності α -, μ - та π -форм глутатіон-S-трансферази, фенолсульфотрансферази та N-ацетилтрансферази. Зростає вміст КоА, але зменшується рівень відновленого глутатіону. Зміни активності ферментів вірогідно корелюють з посиленням процесів глюконеогенезу, кетогенезу та ліполізу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: цукровий діабет, ксенобіотики, ферменти кон'югації.

ВСТУП. Цукровий діабет є поширеним захворюванням, що супроводжується різноманітними порушеннями обміну речовин та розвитком тяжких ускладнень, які потребують призначення численних лікарських засобів. Разом із тим, цукровий діабет може викликати суттєві зміни активності цитохром Р450-залежних монооксигеназ [2], фармакокінетики і токсичності лікарських засобів [5, 11]. Дані літератури щодо впливу цукрового діабету на кон'югаційну фазу метаболізму ксенобіотиків є суперечливими [6; 8], і на сьогодні невідомо, яким чином впливає дане захворювання на кон'югаційні реакції метаболізму ксенобіотиків.

Метою роботи було дослідження впливу стрептозотоцинового цукрового діабету на активність ферментів кон'югації ксенобіотиків з глюкуронатом, сульфатом, ацетатом та глутатіоном в печінці, нирках та легенях щурів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведені на 45 білих щурах-самцях. Цукровий діабет без кетоацидозу та з таким викликали шляхом внутрішньоочередового введення 45 та 70 мг/кг стрептозотину відповідно [7]. Через два тижні тварин з рівнем глюкози 12 ммоль/л брали для дослідження [1]. У контрольному досліді діабетогенну дію стрептозотину попереджували внутрішньоочередовим введенням нікотинаміду в дозі 230 мг/кг [12].

Щурів декапітували під легким ефірним наркозом та отримували субклітинні фракції печінки, нирок і легень. У мікросомах визначали: активність УДФ-глюкуронозилтрансферази (КФ 2.4.1.17) – за швидкістю кон'югації пара-нітрофенолу, глюкозо-6-фосфатази (КФ © О.Х. Герич, О.О. Пентюк, 2008.

3.1.3.9) – за вивільненням неорганічного фосфату. В постмітохондріальній фракції оцінювали: активність сульфотрансферази (КФ 2.8.2.1.) – за утворенням сульфоефіру бета-нафтолу, N-ацетилтрансферази (КФ 2.3.1.5) – за ацетилюванням пара-амінобензойної кислоти. Активність глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18) визначали із субстратами 1-хлор-2,4-динітробензолом (форми α , μ , π), етакриновою кислотою (форма π) та нітрогліцеролом (форма μ). Вміст КоА (КоА-SH та ацетил-КоА) оцінювали за ацетилюванням п-амінобензойної кислоти, а відновленого глутатіону (GSH) – в глутатіон-трансферазній реакції. Рівень кетонів тил, вільних жирних кислот, глюкози та глікогену визначали уніфікованими методами. Методи дослідження наведено в одній з наших робіт [3].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Моделювання цукрового діабету викликало значні зміни вуглеводного та ліпідного обміну, вираження яких залежало від тяжкості діабету (табл. 1). Наприклад, якщо введення щурам 45 мг/кг стрептозотину спричиняло зростання рівнів глюкози, жирних кислот та кетонів тил у крові в 2,5, 1,6 і 2,2 рази, а активності ферменту глюконеогенезу глюкозо-6-фосфатази в печінці – в 2 рази, то введення стрептозотину в дозі 70 мг/кг викликало зміни цих показників уже в 3,0, 2,5 та 6,0 та 3,0 рази відповідно. Введення нікотинаміду практично повністю попереджувало розвиток метаболічних змін, що доводить адекватність відтвореної нами моделі цукрового діабету.

Встановлено зростання на 18 та 29 % активності УДФ-глюкуронозилтрансферази в печінці, відповідно, у щурів з легким чи тяжким

цукровим діабетом (табл. 2). Активність фенолсульфотрансферази, навпаки, знижувалась, відповідно, на 26 та 37 %, а N-ацетилтрансферази – на 26 та 32 %. Сумарний вміст КоА в печінці збільшувався на 54 і 122 % відповідно до тяжкості діабету. Активність ізоферментів глутатіон-S-трансферази (субстрати ХДНБ, НГ, ЕК) зменшувалась на 23, 23 і 10 % у щурів з легким діабетом та на 28, 32 і 17 % у тварин з тяжким діабетом, а рівень відновленого глутатіону знижувався на 21 та 28 % відповідно. У нирках та легенях відбувалось залежне від дози

стрептозотоцину зменшення активності глутатіон-S-трансферази та вмісту відновленого глутатіону. Введення нікотинаміду майже повністю усувало зміни активності ферментів.

Як показав кореляційний аналіз (табл. 3), зміни активності ферментів кон'югації ксенобіотиків вірогідно корелювали з рівнем кетонів тіл, вільних жирних кислот та активністю глюкозо-6-фосфатази. Дещо меншою була їх залежність від рівня глюкози крові та глікогену печінки.

Отже, отримані нами результати свідчать про те, що цукровий діабет викликає зміни зви-

Таблиця 1 – Показники вуглеводного та ліпідного обміну в щурів з цукровим діабетом (M±m)

Показники	Контрольна група, n=11	Стрептозотонин		Нікотинамід+ стрептозотонин, n=10
		45 мг/кг, n=12	70 мг/кг, n=12	
Глюкоза крові, ммоль/л	6,02±0,28	14,9±0,69*	18,0±1,06*	6,90±0,36
Вільні жирні кислоти плазми крові, ммоль/л	0,62±0,06	0,99±0,08*	1,58±0,11*	0,77±0,04
Кетонів тіла плазми крові, ммоль/л	0,40±0,05	0,89±0,07*	2,40±0,23*	0,53±0,05
Глікоген печінки, мкмоль/г	161±11	102±8,4*	72±8,1*	134±10
Глюкозо-6-фосфатаза печінки, нмоль/хв/мг білка	0,41±0,03	0,83±0,05*	1,22±0,08*	0,50±0,03
Глюкозо-6-фосфатаза нирок, нмоль/хв/мг білка	0,23±0,02	0,42±0,03*	0,59±0,04*	0,26±0,02

Примітка. * – вірогідні відмінності щодо контролю.

Таблиця 2 – Активність ферментів кон'югації в печінці, нирках та легенях щурів з цукровим діабетом (M±m)

Показники	Контрольна група, n=11	Стрептозотонин		Нікотинамід+ стрептозотонин, n=10
		45 мг/кг, n=12	70 мг/кг, n=12	
Печінка				
УДФ-глюкуронозилтрансфераза, нмоль/хв/мг білка	2,73±0,17	3,22±0,14*	3,51±0,22*	2,98±0,17
Фенолсульфотрансфераза, нмоль/хв/мг білка	0,38±0,02	0,28±0,02*	0,24±0,02*	0,35±0,03
N-ацетилтрансфераза, нмоль/мг білка за 60 хв	0,31±0,03	0,23±0,02*	0,21±0,02*	0,28±0,02
Сумарний вміст КоА, нмоль/г печінки	339±24	523±33*	754±45*	398±55
Глутатіон-S-трансфераза, хлординіробензол, нмоль/хв/мг білка	303±28	234±11*	217±19*	308±21
Глутатіон-S-трансфераза, нітрогліцерин, нмоль/хв/мг білка	30,2±2,11	23,2±1,54*	20,6±1,36*	28,8±1,89
Глутатіон-S-трансфераза, етакринова кислота, нмоль/хв/мг білка	29,3±2,14	26,1±1,53	24,3±1,47	28,9±1,38
Відновлений глутатіон, мкмоль/г	7,07±0,32	5,55±0,29*	5,16±0,30*	6,75±0,33
Нирки				
Глутатіон-S-трансфераза, хлординіробензол, нмоль/хв/мг білка	89,5±6,59	70,5±4,28*	66,4±3,91*	85,5±5,75
Відновлений глутатіон, мкмоль/г	3,73±0,28	2,80±0,22*	2,43±0,14*	3,35±0,34
Легені				
Глутатіон-S-трансфераза, хлординіробензол, нмоль/хв/мг білка	49,7±3,93	39,8±2,92	37,5±2,26*	48,5±2,85
Відновлений глутатіон, мкмоль/г	3,11±0,30	2,28±0,15*	1,99±0,14*	2,97±0,33

Примітки: 1. Активність UDP-глюкуронозилтрансферази визначали в мікросомальній фракції печінки, інших ферментів – у постмітохондріальній фракції.

2. * – вірогідні відмінності щодо контролю.

Таблиця 3 – Кореляційний аналіз зв'язків процесів кон'югації ксенобіотиків з біохімічним статусом щурів з цукровим діабетом (n=40)

Показники	Глюкоза крові	Вільні жирні кислоти	Кетонів тіла	Глікоген печінки	Глюкозо-6-фосфатаза
Печінка					
УДФ-глюкуронозилтрансфераза	0,41	0,44	0,49*	-0,41	0,46*
Фенолсульфотрансфераза	-0,46*	-0,52*	-0,57*	0,53*	-0,49*
N-ацетилтрансфераза	-0,42	-0,53*	-0,47*	0,50	-0,45*
Сумарний вміст КоА	0,44	0,63*	0,61*	-0,60*	0,48*
Глутатіон-S-трансфераза, хлординітробензол	-0,41	-0,47*	-0,49*	0,45	-0,32
Глутатіон-S-трансфераза, нітрогліцерол	-0,46*	-0,48*	-0,47*	0,52*	-0,45
Глутатіон-S-трансфераза, етакринова кислота	-0,32	-0,36	-0,33	0,34	-0,27
Відновлений глутатіон	-0,46*	-0,52*	-0,51*	0,52*	-0,50*
Нирки					
Глутатіон-S-трансфераза, хлординітробензол	-0,46*	-0,48*	-0,50*	0,51*	-0,47*
Відновлений глутатіон	-0,45	-0,50*	-0,53*	0,53*	-0,47*
Легені					
Глутатіон-S-трансфераза, хлординітробензол	-0,40	-0,46*	-0,47*	0,46*	-0,47*
Відновлений глутатіон	-0,44	-0,50*	-0,52*	0,51*	-0,50*

Примітка. – вірогідні коефіцієнти кореляції.

чайних співвідношень між окремими реакціями кон'югації ксенобіотиків. Має місце посилення активності УДФ-глюкуронозилтрансферази при одночасному зниженні активності ферментів кон'югації з глутатіоном, ацетил-КоА та сульфатом. При цьому зміни з боку зазначених ферментів вірогідно корелюють з активацією процесів кетогенезу, глюконеогенезу та ліполізу.

Активация процесів кон'югації з глюкуроновою кислотою, на нашу думку, є наслідком накопичення УДФ-глюкози в результаті притаманного цукровому діабету посилення розпаду глікогену та активації глюконеогенезу [4]. Відомо, що саме доступність УДФ-глюкози є лімітуючою ланкою процесів глюкуронування ксенобіотиків [9]. Однак кон'югація з оцтовою кислотою виявилась пригніченою, незважаючи на збільшення загальної кількості КоА в печінці. Очевидно, в цьому випадку має місце конкуренція за ацетил-КоА між процесами утворення кетонів тіл та ацетилювання ксенобіотиків. Пригнічення реакцій кон'югації з глутатіоном та сульфатом, можливо, є наслідком зменшення доступності відновленого глутатіону чи коферменту сульфатації (ФАФС), синтез яких потребує АТФ, а енергопродукуюча функція мітохондрій при цукровому діабеті пригнічується [10].

ЛІТЕРАТУРА

1. Великий М.М., Бурда В.А., Біронт Н.В. та ін. Вплив нікотинаміду на активність ферментів антиоксидантного захисту при експериментальному діабеті // Укр. біохім. журн. – 1996. – 68, № 2. – С. 109-114.

Отримані нами дані свідчать про те, що цукровий діабет викликає залежний від його тяжкості перерозподіл активності кон'югуючих ферментів, що може мати клінічні наслідки. Зокрема, слід очікувати посилення токсичності та фармакологічної дії тих лікарських засобів чи промислових ксенобіотиків, метаболічна інактивація яких визначається процесами сульфатації, ацетилювання та глутатіонування, і, навпаки, можна передбачати послаблення дії ксенобіотиків, елімінація яких переважно визначається процесами глюкуронідації.

ВИСНОВКИ. 1. Стрептозотоциновий діабет викликає посилення активності УДФ-глюкуронозилтрансферази при одночасному зниженні активності фенолсульфотрансферази та N-ацетилтрансферази в печінці й множинних форм глутатіон-S-трансферази в печінці, нирках та легенях.

2. Зміни активності ферментів кон'югації найбільш тісно корелюють з індукованим цукровим діабетом, посиленням процесів кетогенезу, глюконеогенезу та ліполізу (зокрема, рівнем кетонів тіл, вільних жирних кислот та активністю глюкозо-6-фосфатази), меншою мірою – зі ступенем гіперглікемії та зниженням рівня глікогену.

2. Герич О.Х., Юрченко П.О. Монооксигеназні активності печінки щурів в умовах гіперглікемії та гіперкетонемії, індукованих уведенням стрептозотцину та дексаметазону // Буков. мед. вісн. – 2005. – 9, № 2. – С. 55-56.

3. Качула С.О., Пентюк О.О. Вплив голодування на ферментні системи метаболізму ксенобіотиків у щурів, біотрансформацію та токсичність ксенобіотиків субстратів СУР2Е1 // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 1. – С. 114-122.
4. Boden G. Gluconeogenesis and glycogenolysis in health and diabetes // J. Investig. Med. – 2004. – **52**, № 6. – P. 375-378.
5. Gawronska-Szklarz B., Musial D.H., Pawlik A., Paprota B. Effect of experimental diabetes on pharmacokinetic parameters of lidocaine and MEGX in rats // Pol. J. Pharmacol. – 2003. – **55**, № 4. – P. 619-624.
6. Fujita H., Haseyama T., Kayo T. et al. Increased expression of glutathione S-transferase in renal proximal tubules in the early stages of diabetes: a study of type-2 diabetes in the Akita mouse model // Exp. Nephrol. – 2001. – **9**, № 6. – P. 380-386.
7. Hicks K.K., Seifen E., Stimers J.R., Kennedy R.H. Diabetes with and without ketoacidosis on right atrial pacemaker rate and autonomic responsiveness // Am. J. Physiol. – 1997. – **273**, № 4 (Pt 2). – P. 1888-1893.
8. Pass G.J., Becker W., Kluge R. et al. Effect of hyperinsulinemia and type 2 diabetes-like hyperglycemia on expression of hepatic cytochrome p450 and glutathione s-transferase isoforms in a New Zealand obese-derived mouse backcross population. // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2002. – **302**, № 2. – P. 442-450.
9. Price V.F., Jollow D.J. Effect of glucose and gluconeogenic substrates on fasting-induced suppression of acetaminophen glucuronidation in the rat // Biochem. Pharmacol. – 1989. – **15**, № 38. – P. 289-297.
10. Stark R., Roden M. ESCI Award 2006. Mitochondrial function and endocrine diseases // Eur. J. Clin. Invest. – 2007. – **37**, № 4. – P. 236-248.
11. Watkins J.B., Sherman S.E. Long-term diabetes alters the hepatobiliary clearance of acetaminophen, bilirubin and digoxin // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1992. – **260**, № 3. – P. 1337-1343.
12. Wong K.K. Attenuation by nicotinamide of the streptozocin induced early hyperglycaemia in fasting rats // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1996. – **40**, № 3. – P. 515-520.

ВЛИЯНИЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ КОНЪЮГАЦИОННОЙ ФАЗЫ МЕТАБОЛИЗМА КСЕНОБИОТИКОВ У КРЫС

Е.Ф. Герич, А.А. Пентюк

ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ПИРОГОВА

Резюме

В печени крыс с стрептозотоциновым сахарным диабетом регистрируются увеличение активности УДФ-глюкуронозилтрансферазы, снижение активности α -, μ - и π -форм глутатион-S-трансферазы, фенолсульфотрансферазы и N-ацетилтрансферазы. Возрастает содержание КоА, но уменьшается уровень восстановленного глутатиона. Изменения активности ферментов достоверно коррелируют с усилением процессов глюконеогенеза, кетогенеза и липолиза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сахарный диабет, ксенобиотики, ферменты конъюгации.

INFLUENCING OF DIABETES ON THE ENZYMIC ACTIVITY OF A CONJUGATIVE PHASE OF XENOBIOTICS METABOLISM FOR RATS

O.Kh. Herych, O.O. Pentyuk

VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY M.I. PYROHOV

Summary

In the liver of rats with streptozotocin-induced diabetes the activity of UDP-glucuronosyl transferase increases, the activity of α -, μ - and π -forms of glutathione-S-transferases, phenolsulfotransferase and N-acetyltransferase decreases. Content of CoA increases but the level of reduced glutathione decreases. The changes of enzymatic activity correlate with activating of gluconeogenesis, ketogenesis and lipolysis processes.

KEY WORDS: diabetes, xenobiotics, enzymes of conjugation.

Отримано 10.04.2008 р.

Адреса для листування: О.Х. Герич, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна.

УДК 615.244.615.32

ОЦІНКА КАРДІОПРОТЕКТОРНОЇ АКТИВНОСТІ НОВИХ ЗАСОБІВ АДАПТОГЕННОЇ ДІЇ НА МОДЕЛІ АЛКОГОЛЬ-ФУРАЗОЛІДОНОВОЇ КАРДІОМІОПАТІЇ

Л.В. Яковлева, О.Я. Міщенко
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

На моделі алкоголь-фуразолідонової кардіоміопатії встановлено кардіопротекторну активність нових комбінованих адаптогенних засобів – фелентару та поллентару, що розроблені в НФаУ на основі продуктів бджільництва та бурштинової кислоти. Нові комбіновані засоби фелентар та поллентар, як і засіб порівняння янтавіт, нормалізували рівень ліпідів у сироватці крові, сприяли відновленню білоксинтетичних процесів, вуглеводного резерву міокарда та проявляли виражений гальмівний вплив на посилені процеси перекисного окиснення ліпідів. На відміну від засобу порівняння янтавіту, фелентар та поллентар підвищували активність антиоксидантного захисту органа, що свідчить про їх переваги над янтавітом.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: експериментальна кардіоміопатія, комбіновані засоби поллентар, фелентар, кардіопротекторна активність, янтавіт, екстракт елеутерококу.

ВСТУП. Серцево-судинна система зазнає значних навантажень в результаті впливу еко-токсикантів, несприятливих факторів та стресу, що реалізується через активацію симпатико-адреналової системи, характеризується зсувом неспецифічних адаптаційних механізмів, які забезпечують гомеостаз. Усе це може призводити до розвитку патологічних станів: ішемії, кардіоміопатії, артеріальної гіпертензії, інсультів і навіть смерті [5]. Серед дієвих засобів фармакологічної корекції таких станів суттєве місце займають препарати метаболічної дії, в тому числі енергетичні субстрати бурштинової кислоти, антиоксиданти природного походження та інші [11-14, 16].

Враховуючи це, було доцільним оцінити кардіопротекторні властивості нових комбінованих адаптогенних засобів, що розроблені в НФаУ на основі продуктів бджільництва та бурштинової кислоти: фелентару та поллентару.

Для цього була використана модель хронічного ушкодження міокарда, обумовленого поєднаною дією етанолу і фуразолідону. Відомо, що післяінтоксикаційне алкогольне ушкодження серця, яке має місце при синдромі вилучення з раціону щурів етанолу, відповідає картині формування алкогольної кардіоміопатії у людини [1, 6, 10]. Поєднання етанолу з фура-

© Л.В. Яковлева, О.Я. Міщенко, 2008.

золідонем призводить до посилення токсичної дії алкоголю і швидкого розвитку ушкодження міокарда за типом мікронекрозів [1, 4, 6]. Провідною ланкою патогенезу етанол-фуразолідонової кардіоміопатії виступає надмірна активація процесу вільнорадикального окиснення, що обумовлена порушенням метаболізму етанолу, який є сильним прооксидантом [4, 10, 13, 15].

Метою даної роботи було з'ясування кардіопротекторної дії нових засобів (табл. 1) – поллентару та фелентару на моделі хронічної етанол-фуразолідонової кардіоміопатії у щурів порівняно з біологічно активною добавкою янтавітом.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведені на нелінійних білих щурах-самцях з початковою масою 180-220 г. Усього було використано 106 тварин. Токсичні речовини – етанол у дозі 5 г/кг у вигляді 25 % розчину внутрішньошлунково, фуразолідон у дозі 100 мг/кг внутрішньоочеревинно – вводили 1 раз на день протягом 10 тижнів, 5 днів на тиждень [6]. Усі досліджувані засоби тварини отримували внутрішньошлунково за годину до введення токсикантів 1 раз на день протягом 10 тижнів. Дози нових комбінованих засобів (25 мг/кг) та біологічно активної добавки янтавіту (270 мг/кг) для щурів було розраховано відповідно до

середньодобової дози для людини з урахуванням коефіцієнта видової стійкості [9].

З метою визначення ступеня ушкоджувальної дії кардіотоксинів, а також вираженості протекторних властивостей досліджуваних препаратів щодобово вели спостереження за загальним станом щурів, щотижнево – за динамікою маси тіла і ступенем атаксії, яку визначали за такою бальною шкалою: 1 бал – слабкий ступінь; 2 бали – середній; 3 бали – високий; 4 – найвищий (тварини не спроможні зберігати позу).

На 1-й, 5-й і 10-й тижні від початку експерименту реєстрували зміни ЕКГ-показників у другому стандартному відведенні, використовуючи електрокардіограф ЕК1Т 03М.

На 10-му тижні експерименту визначали стан метаболічних процесів у міокарді: інтенсивність гліколітичних процесів – за вмістом пірувату та лактату [3, 8], інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканині міокарда – за рівнем ТБК-реактивів (ТБК-Р) і дієнових кон'югат (ДК) [2]. Активність ендогенної антиоксидантної системи (АОС) оцінювали за вмістом ВГ [2], вуглеводний резерв органа – за рівнем глікогену [8]. Вираження запально-дистрофічних процесів у міокарді тварин характеризували за активністю ферменту аспаратамінотрансферази (АсАТ), лактатдегідрогенази (ЛДГ) та її урестійкої частки, властивої ізоферменту серцевої фракції, з використанням, відповідно, тест-діагностикумів фірм "Lachema" та "BIO-LA-TEST". Для оцінки стану ПОЛ визначали вміст ТБК-Р, ДК вищеведеними методами ще й у сироватці крові. Роботу з щурами проводили відповідно до принципів Європейської конвенції із захисту лабораторних тварин, дотримуючись норм GLP. Результати обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента [7].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати досліджень представлено в таблицях 2-5.

Формування етанол-фуразолідонової кардіоміопатії у білих щурів з групи контрольної патології супроводжувалось погіршенням загального стану тварин, яке проявлялось зниженням апетиту, неохайністю, меншим приростом маси тіла порівняно з групою інтактного контролю (рис. 1).

Починаючи з 2-го тижня експерименту, в щурів з групи контрольної патології розвивалась атаксія, і на момент завершення досліджень вона досягала в середньому 2,3 бала (табл. 2).

Патологія міокарда, спричинена хронічним внутрішньошлунковим введенням етанолу та

внутрішньоочеревинними ін'єкціями фуразолідону, супроводжувалась розвитком дисбалансу ПОЛ/АОС. У групі нелікованих щурів як у тканині серця, так і в крові достовірно щодо аналогічних показників тварин з групи інтактного контролю підвищувався вміст ключових продуктів ліпопероксидації – ДК і ТБК-Р (табл. 3 та 4). У гомогенаті серця суттєво виснажувався пул ВГ (див. табл. 3). Підтвердженням розвитку запально-дистрофічних процесів, які мають місце при кардіоміопатії, є вірогідна гіпераспартаттрансаміназемія та вірогідне збільшення урестійкої частки ізоферменту серцевої фракції ЛДГ в сироватці крові (див. табл. 4). На тлі цього відбувалось порушення гліколітичних процесів у бік накопичення лактату, що свідчило про анаеробні умови даного процесу за умов розвинutoї гіпоксії. Підтвердженням цього було зростання коефіцієнта Л/П в 2,4 раза щодо його рівня у тварин інтактного контролю (див. табл. 3). Про виснаження анаболічних синтетичних процесів свідчив знижений у 4 рази вуглеводний резерв органа (рівень глікогену) та в 1,5 раза рівень білка в сироватці крові.

Порушення функції міокарда у щурів з групи контрольної патології відзначали вже після 1-го тижня експерименту, що найбільш виразно проявилось достовірним зростанням показника ішемії міокарда (зміщення сегмента ST від ізолінії). На 5-му та 10-му тижнях експерименту цей показник достовірно підвищувався (табл. 5), що підтверджує ускладнення гіпоксичного стану з часом.

Під впливом усіх досліджуваних засобів приріст маси тіла тварин за абсолютними значеннями був вищим щодо приросту маси тіла щурів з групи контрольної патології, проте це збільшення не вірогідне (див. рис. 1).

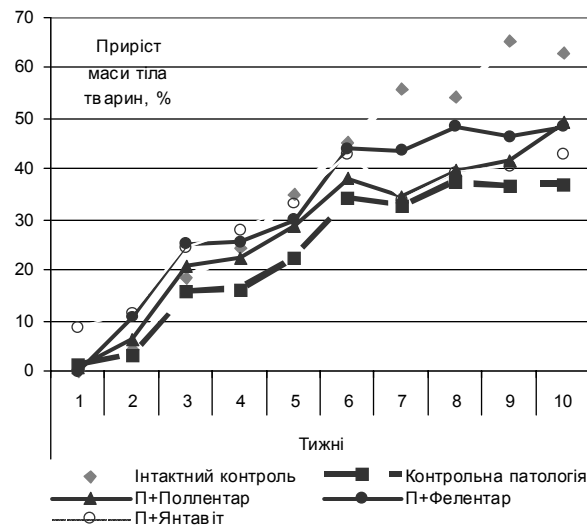


Рис. 1. Динаміка приросту маси тіла тварин на моделі етанол-фуразолідонової кардіоміопатії.

Таблиця 1 – Склад нових засобів адаптогенної дії

Субстанції	Досліджувані засоби	
	Поллентар	Фелентар
Фенольний гідрофобний препарат прополісу (ФГПП)	–	+
Квітковий пилок (КП)	+	+
Бурштинова кислота	+	+

Таблиця 2 – Вплив досліджуваних засобів на ступінь атаксії у білих щурів на моделі етанол-фуразолідонової кардіоміопатії, бали

Показники	Дослідні групи			
	Контрольна патологія, n=9	П+поллентар, n=9	П+фелентар, n=8	П+янтавіт, n=8
Вихідні дані	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
1 тиждень	0,087±0,05	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
2 тиждень	0,11±0,05	0,0±0,0**	0,0±0,0**	0,02±0,01**
3 тиждень	0,49±0,09	0,22±0,06**	0,26±0,05**	0,16±0,0**
4 тиждень	1,68±0,21	0,29±0,05**	0,54±0,15**	0,33±0,0**
5 тиждень	2,03±0,26	0,28±0,06**	0,25±0,07**	0,41±0,0**
6 тиждень	1,64±0,26	0,06±0,02**	0,27±0,08**	0,14±0,0**
7 тиждень	1,44±0,36	0,39±0,26**	0,15±0,07**	0,51±0,2**
8 тиждень	1,33±0,31	0,42±0,09**	0,63±0,11**	1,08±0,16
9 тиждень	1,58±0,18	0,58±0,07**	0,83±0,17**	0,91±0,24
10 тиждень	2,34±0,25	0,78±0,10**	0,74±0,17**	0,88±0,19

Примітка. ** – відхилення вірогідні щодо даних контрольної патології, $p \leq 0,05$; n – кількість тварин у групі.

Усі досліджувані засоби сприяли зниженню ступеня атаксії порівняно з групою тварин контрольної патології та практично не мали суттєвих відмінностей між собою (див. табл. 2).

Дослідження біохімічних показників дозволило встановити деяку відмінність вираженості кардіопротекторних властивостей досліджуваних засобів.

Усі засоби вірогідно знижували рівень АсАТ та відсоток кардіоспецифічної урестійкої частки ЛДГ в сироватці крові, що вказувало на їх здатність проявляти мембраностабілізуючу дію. Проте вираження їх впливу на рівень продуктів перекисної деградації мембран – ТБК-реактивів і ДК – в серці та сироватці крові різні.

Нові засоби в цілому сприяли гальмуванню аномального процесу вільнорадикального окиснення, різною мірою впливаючи на рівень ТБК-реактивів та ДК в гомогенаті серця (див. табл. 2). Поллентар вірогідно пригнічував утворення проміжних продуктів ПОЛ – ДК, але був менш впливовим щодо ТБК-реактивів. Антиоксидантна дія фелентару проявилась вірогідним пригніченням кінцевих продуктів ПОЛ – ТБК-Р та незначним зниженням ДК. Під дією поллентару та фелентару відбувалось і вірогідне підвищення активності антиоксидантної системи, що визначали за вмістом ВГ в гомогенаті серця. Обидва засоби виразно гальмували утворення обох продуктів ПОЛ в сироватці крові.

За гальмівним впливом на аномальні процеси ПОЛ в міокарді препарат порівняння янтавіт поступався новим засобам, проявляючи вказаний вірогідний ефект тільки в сироватці крові. При цьому активність антиоксидантної системи під впливом засобу порівняння була низькою, що свідчило про переваги зазначених нових комбінованих засобів фелентару і поллентару та їх більш багатогранний вплив як на процеси ПОЛ, так і на активність АОС. Це зумовлено дією біологічно активних речовин складових субстанцій даних засобів. Фенольні сполуки квіткового пилку та фенольного гідрофобного препарату прополісу спричиняють пряму антиоксидантну дію, а бурштинова кислота як регулятор енергетичного обміну забезпечує активність енергетичних процесів, певний рівень яких є необхідним для підтримки глутатіонзалежних антиоксидантних ферментів [16]. Цілком ймовірно, що янтавіт, який містить тільки бурштинову кислоту, за умов порушення мембранних процесів у результаті посилення ПОЛ, не здатний підтримувати високий рівень антиоксидантної системи.

Коригувальний вплив досліджуваних засобів на порушені гліколітичні процеси був різним. Під дією фелентару спостерігались вірогідне зниження рівня лактату та нормалізація коефіцієнта Л/П майже до рівня інтактного контролю, що свідчило про менш виразні гіпоксичні зміни під дією цього засобу, на відміну від поллентару та фелентару. На тлі засто-

Таблиця 3 – Вплив досліджуваних засобів на біохімічні показники в гомогенаті серця тварин за умов етанол-фуразолідонової кардіоміопатії

Показники	Групи тварин				
	Інтактний контроль	Контрольна патологія (КП)	П+поллентар	П+фелентар	П+янтавіт
ТБК-реактанти, ммоль/г	30,77±4,53	103,6±16,9*	102,6±31,6*	63,6±17,1**	67,9±13,2*
ДК, мкмоль/г	6,48±0,15	8,64±0,41*	7,05±0,25**	7,82±0,38*	7,73±0,29*
ВГ, мкмоль/г	0,53±0,10	0,25±0,04*	0,42±0,08**	0,62±0,11**	0,30±0,04
Піруват, ммоль/г	0,26±0,02	0,23±0,009	0,25±0,01	0,27±0,02	0,28±0,02
Лактат, ммоль/г	3,54±0,82	7,62±0,83*	6,67±0,78*	4,74±0,87**	7,27±0,19*
Л/П	13,6	33,1	26,68	17,5	25,9
Глікоген, мкг/100 мг тканини	416,5±85,0	82,5±17,3*	178,5±34,4*/**	265,7±40,14**	139,2±11,1*/**

Примітка. * – відхилення вірогідні щодо даних інтактного контролю, $p \leq 0,05$; ** – відхилення вірогідні щодо даних контрольної патології, $p \leq 0,05$.

Таблиця 4 – Вплив досліджуваних засобів на біохімічні показники сироватки крові тварин на моделі етанол-фуразолідонової кардіоміопатії

Показники	Групи тварин				
	Інтактний контроль	Контрольна патологія (КП)	П+поллентар	П+фелентар	П+янтавіт
АсАТ, мкат/год х л	0,69±0,05	0,85±0,04*	0,53±0,05**	0,63±0,03**	0,67±0,03**
ЛДГ, ммкат/л	1,92±0,21	1,84±0,14	1,74±0,19	1,86±0,17	2,00±0,13
Урестійка частка ЛДГ, %	28,1±4,8	71,3±8,7*	49,2±6,5*/**	58,5±5,4*	36,4±5,2**
ТБК-Р, ммоль/л	0,53±0,05	0,86±0,03*	0,56±0,06**	0,55±0,02**	0,49±0,09**
ДК, мкмоль/л	0,059±0,01	0,162±0,022*	0,099±0,019**	0,079±0,019**	0,074±0,014**
Загальні ліпіди, г/л	2,95±0,10	4,46±0,35*	3,35±0,32**	3,59±0,32**	3,13±0,27**
Загальний білок, г/л	95,3±8,7	64,1±2,1*	96,0±1,2**	82,4±2,2**	113,6±6,2**

Примітка. * – відхилення вірогідні щодо даних інтактного контролю, $p \leq 0,05$; ** – відхилення вірогідні щодо даних контрольної патології, $p \leq 0,05$.

Таблиця 5 – Вплив досліджуваних засобів на зміщення сегмента ST (мм) електрокардіограми серця тварин на моделі етанол-фуразолідонової кардіоміопатії

Вихідні дані, n=50	Контрольна патологія, n=7	П+поллентар, n=8	П+фелентар, n=8	П+янтавіт, n=6
1-й тиждень експерименту				
-0,33±0,17 (-1,00±0,00)	-0,67±0,17* (-1,2±0,2)	-0,59±0,29 (-2,3±0,00)	-1,04±0,27* (-2,20±0,00)	-0,22±0,13*** (-0,2±0,8)
5-й тиждень експерименту				
-0,33±0,17 (-1,00±0,00)	-1,48±0,40* (-2,80±0,3)	-0,69±0,25 (-1,6±0,00)	-1,18±0,32* (-2,4±0,00)	-0,47±0,13** (-0,9±0,00)
10-й тиждень експерименту				
-0,33±0,17 (-1,00±0,00)	-1,50±0,32* (-3,00±1,10)	-0,37±0,17** (-1,6±0,00)	-0,60±0,26** (-1,8±0,00)	-0,36±0,11** (-1,0±0,5)

Примітка. * – відхилення вірогідні щодо вихідних даних, $p \leq 0,05$; ** – відхилення вірогідні щодо даних контрольної патології, $p \leq 0,05$; *** – тенденція до вірогідності щодо даних контрольної патології, $0,05 < p < 0,1$; n – кількість тварин у групі.

сування досліджуваних засобів мав місце вірогідно більший відносно тварин з групи контрольної патології вміст глікогену, що свідчило про відновлення процесів енергоутворення в кардіоміоцитах.

Нові комбіновані засоби, як і препарат порівняння, проявили вірогідний нормалізуючий вплив на порушений ліпідний гомеостаз, нормалізуючи рівень загальних ліпідів у сироватці крові, та відновлювали білоксинтетичні процеси, підвищуючи рівень загального

білка в сироватці крові відносно аналогічного показника у тварин з групи контрольної патології.

Зміни біохімічних показників відбивалися на характері впливу досліджуваних засобів на електрокардіографічні показники функціонального стану серця. Практично усі засоби на 10-му тижні дослідження сприяли вірогідному зменшенню вираження показника ішемії – депресії зубця ST. Поллентар, фелентар та янтавіт запобігали ішемічному ушкодженню, що корелю-

вало з їх здатністю підвищувати вуглеводний резерв органа.

Отже, за вираженням нормалізувального впливу на досліджувані біохімічні показники, електрофізичні характеристики функції серця та ступінь вираження атаксії, що характеризують кардіопротекторні властивості, нові комбіновані засоби практично однакові. Усі досліджувані засоби на тлі розвиненої кардіоміопатії сприяли підвищенню вуглеводного резерву міокарда, відновленню білоксинтетичних процесів, нормалізували рівень ліпідів у сироватці крові. Проте слід відмітити переваги нових комбінованих засобів, порівняно з янтавітом, за гальмівним впливом на утворення продуктів перекисної деградації мембран кардіоміоцитів – ТБК-Р і ДК та за здатністю підвищувати активність антиоксидантного захисту органа.

Таким чином, вказані комбіновані бурштиновмісні засоби поллентар та фелентар прояв-

ляють всебічну коригувальну дію на порушені в результаті введення кардіотоксинів метаболічні процеси (білоксинтетичні, ліпідний та вуглеводний обмін).

ВИСНОВКИ. 1. Нові комбіновані досліджувані засоби фелентар та поллентар на моделі етанол-фуразолідонової кардіоміопатії проявляють кардіопротекторні властивості.

2. Нові комбіновані засоби фелентар та поллентар, як і засіб порівняння янтавіт, нормалізували рівень ліпідів у сироватці крові, сприяли відновленню білоксинтетичних процесів, вуглеводного резерву міокарда та проявляли виразний гальмівний вплив на посилені процеси перекисного окиснення ліпідів.

3. На відміну від засобу порівняння янтавіту, фелентар та поллентар підвищували активність антиоксидантного захисту органа.

ЛІТЕРАТУРА

1. Антоненков В.Д., Цыпленкова В.Г., Вихерт А.М. и др. Лечебный эффект антиоксиданта дибунула при экспериментальной алкогольной кардиомиопатии // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1990. – **109**, № 5. – С. 446-449.
2. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Методические рекомендации. – С.Пб.: ИКФ "Фолиант" 2000. – 104 с.
3. Воронина Л.М., Десенко В.Ф., Кравченко В.М., Сахарова Т.С. Посібник для лабораторних і семінарських занять з біологічної хімії: Навч. метод. посібник для вузів. – Харків: Основа, 1996. – 432 с.
4. Грудцин Г.В. Поражение сердца у больных хроническим алкоголизмом // Кардиология. – 1991. – **31**, № 4. – С. 94-100.
5. Дземан М.І. Погляд на проблему резистентності, реактивності та загальноадаптивних реакцій організму в клініці внутрішніх захворювань // Укр. мед. часопис. – 1999. – № 4 (12). – С. 97-100.
6. Ивахненко А.К., Бунятян Н.Д., Яковлева Л.В. Хроническая фуразолидоново-алкогольная кардиомиопатия в эксперименте // Оптимизация создания лекарственных препаратов: Материалы научно-практического семинара по созданию новых лекарственных средств. – Харьков, 1999. – С. 98-105.
7. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – 2001. – 320 с.
8. Прохорова М.И., Тупкиова З.Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1995. – С. 53-65.
9. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Доклады АН СССР. – 1979. – **247**, № 6. – С. 1513-1516.
10. Тедиков Е.Б., Нужный В.П., Абдрашитов А.Х., Листвина В.П. Значение толерантности к этанолу, тяжелого синдрома отмены и возраста крыс в развитии постинтоксикационного алкогольного повреждения сердца // Вопр. кардиологии. – 1991. – № 1. – С. 7-9.
11. Cairns C.B., Ferroggiaro A.A., Walther J.M., et al. Postischemic administration of succinate reverses the impairment of oxidative phosphorylation after cardiac ischemia and reperfusion injury // Circulation. – 1997. – **96**, № 4. – (9 Suppl). – P. 260-265.
12. Gatsura V.V., Smirnov L.D. Cardioprotective properties of some synthetic antioxidants // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 1993. – **26**, № 11-12. – P. 795-802.
13. Keith Jones W. A Murine Model of Alcoholic Cardiomyopathy. A Role for Zinc and Metallothionein in Fibrosis // American Journal of Pathology. – 2005. – № 167. – P. 301-304.
14. Pauly D.F., Pepine C.J. Ischemic Heart Disease: Metabolic Approaches to Management // Clin. Cardiol. – 2004. – **27**. – P. 439-441.
15. Ren J., Brown R.A. Influence of chronic alcohol ingestion on acetaldehyde-induced depression of rat cardiac contractile function // Alcohol and Alcoholism. – 2000. – **35**, № 6. – P. 554-560.
16. Sakamoto M., Takeshige K., Yasui H., Tokunaga K. Cardioprotective effect of succinate against ischemia/reperfusion injury // Surg. Today. – 1998. – **28**, № 5. – P. 522-528.

**ОЦЕНКА КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ СРЕДСТВ
АДАПТОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ НА МОДЕЛИ
АЛКОГОЛЬ-ФУРАЗОЛИДОНОВОЙ КАРДИОМИОПАТИИ**

Л.В. Яковлева, О.Я. Мищенко
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

На модели алкоголь-фуразолидоновой кардиомиопатии установлена кардиопротекторная активность новых комбинированных адаптогенных средств – фелентара и поллентара, что разработаны в НФаУ на основе продуктов пчеловодства и янтарной кислоты. Новые комбинированные средства фелентар и поллентар, как и средство сравнения янтавит, нормализовывали уровень липидов в сыворотке крови, способствовали восстановлению белоксинтетических процессов, углеводного резерва миокарда и проявляли выраженное угнетающее влияние на усиленные процессы перекисного окисления липидов. В отличие от средства сравнения янтавита, фелентар и поллентар повышали активность антиоксидантной защиты органа, что свидетельствует об их преимуществе над янтавитом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: экспериментальная кардиомиопатия, комбинированные средства поллентар, фелентар, кардиопротекторная активность, янтавит, экстракт элеутерококка.

**ASSESSMENT OF CARDIOPROTECTIVE ACTIVITY OF NEW ADAPTOGENIC
REMEDIES ON ALCOHOL-FURASOLIDONUM CARDIOMYOPATHY MODEL**

L.V. Yakovleva O.Ya. Mishchenko
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

On alcohol-furasolidonum cardiomyopathy model it was established cardioprotective activity of new combined adaptogenic remedies: phelentarum and pollentarum, that had been developed in National University of Pharmacy on the basis of bee-keeping products and succinic acid. The new combined remedies phelentarum and pollentarum, as well as comparative remedy yantavit, normalized a blood level of lipids, promoted regeneration of protein-synthetic processes, carbohydrate reserve of myocardium and showed the expressed oppressing influence on the processes of lipid peroxidation. Unlike comparative remedy yantavit, phelentarum and pollentarum increased the activity of antioxidant protection of organ, that testifies to their advantages over yantavit.

KEY WORDS: experimental cardiomyopathy, combined remedies phelentarum, pollentarum, cardioprotective activity, yantavit eleuterococcum extract.

Отримано 9.01.2008 р.

Адреса для листування: Л.В. Яковлева, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.

АТФ-аза ПЛАЗМАТИЧНИХ МЕМБРАН БАКТЕРІЙ В ОЦІНЮВАННІ ЕФЕКТІВ СТРЕСУ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ

М.Є. Романько¹, В.О. Ушкалов²

ННЦ "ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ"¹, ХАРКІВ
ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-КОНТРОЛЬНИЙ ІНСТИТУТ БІОТЕХНОЛОГІЇ І ШТАМІВ
МІКРООРГАНІЗМІВ², КИЇВ

У статті наведено результати досліджень активності АТФ-ази плазматичних мембран нативних та деліофілізованих клітин бактерій різних видів. Визначено, що довготривале зберігання у ліофілізованому стані впливає на активність АТФ-ази у мембранах клітин: вірогідне підвищення активності АТФ-ази *P. multocida* № 550, 16 і 5, *S. enteritidis* № 34, *S. dublin* № 12 і *S. typhimurium* № 16, гальмування активності вказаного ферменту в *E. coli*. Одержані дані свідчать про включення адаптаційно-компенсаторних механізмів внаслідок технологічного стресу через індукцію генераторів трансмембранного потенціалу клітин. Тому контролювання біологічного потенціалу мікробної клітини за умов стресу можна здійснювати за визначенням функціонального стану її цитоплазматичної мембрани.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: АТФ-аза, бактерія, деліофілізовані клітини, нативні клітини, сумарні мембранні фракції, штам.

ВСТУП. Однією з центральних проблем сучасної біотехнології і біохімії є дослідження молекулярних механізмів адаптації, які спрямовані на перебудову метаболізму відповідно до умов факторів середовища. У процесі ліофілізації на клітину впливають такі екстремальні фактори, як заморожування та висушування, які доводять клітину до різних ушкоджень, у тому числі летальних. Відомо, що перш за все ушкоджується цитоплазматична мембрана, оскільки вона є однією з основних мішеней екстремальної дії [5, 6].

АТФ-аза є одним із ключових ферментів енергетичного метаболізму клітини, завдяки якому відбувається формування різниці електрхімічних потенціалів на мембрані [9]. Фермент локалізується у плазматичній мембрані таким чином, що його субодиниці експоновані як до цитоплазми, так і до зовнішнього середовища, тому його активність може бути використана як індикатор будь-якого стресорного впливу. Одним із факторів, що спричиняють інгібіцію клітинної активності агресивними агентами довкілля, є їх дія на цілісність мембрани та/або активність мембранних ферментів, насамперед АТФ-ази.

Припускаючи, що аналіз активності АТФ-ази може мати значення в оцінюванні впливу

© М.Є. Романько, В.О. Ушкалов, 2008.

стресорів, у тому числі технологічного походження, метою цієї роботи було визначення її активності у сумарних мембранних фракціях нативних та деліофілізованих клітин бактерій різних штамів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували нативні та деліофілізовані клітини виробничих штамів *E. coli* № 19, 20, 24 і 25; *S. enteritidis* № 34, *S. dublin* № 12, *S. typhimurium* № 16; *P. multocida* "Смол", № 16, 550, 5 і 2, які підтримуються і зберігаються в колекції Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ (м. Київ) у ліофільно висушеному вигляді протягом 10 років.

Ізольовані культури штамів *E. coli* № 19, 20, 24 і 25; *S. enteritidis* № 34, *S. dublin* № 12, *S. typhimurium* № 16; *P. multocida* "Смол", № 16, 550, 5 і 2 культивували на відповідних живильних середовищах – рідких (МПБ, Хоттінгера та Гісса) та щільних (МПА), оптимальних для накопичення бактеріальної маси. Вирощені на щільних середовищах культури мікроорганізмів контролювали за тестами, рекомендованими для відповідного виду бактерій. Відібрані колонії після двократного пасажу (4-6 год за температури (37 ± 1) °С в рідкому живильному середовищі) висівали на агаризоване живильне середовище і культивували за температури

(37±1) °С впродовж 15-18 год з подальшим змиванням клітин стерильним фізіологічним розчином хлориду натрію (рН=7,0-7,2).

Деліофілізацію (відновлення життєздатності клітин штамів) пастерел та сальмонел і ешерихій проводили за такою схемою: у флакони з ліофілізованою біомасою вносили для пастерел модифіковане живильне середовище Хоттінгера, яке додатково містило 5 % сироватки крові коня інактивованої та 1 % глюкози, а для сальмонел і ешерихій – м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), який додатково містив 5 % печінкової води, 2 % поживного середовища № 199 та 1 % глюкози; культивували протягом 24 год за температури (37±1) °С; пересівали одержані добові культури кожного штаму на аналогічне напіврідке агаризоване середовище; культивували протягом 24 год за температури (37±1) °С; визначали культурально-морфологічні характеристики кожного штаму при культивуванні на МПА та середовищах Гісса (облік ферментативних властивостей по відношенню до цукрів і т.д.). Після пасажів на вказаних поживних середовищах біологічні характеристики штамів пастерел та сальмонел і ешерихій відновлювалися (за морфологічними показниками та ферментативною активністю).

Сумарні мембранні фракції (СМФ) бактеріальних клітин одержували методом диференційного центрифугування за таким регламентом [3]: клітини відмивали від культуральної рідини і ресуспендували в середовищі А (10 мМ трис-НСL, рН=7,4; 4 мМ MgCl₂, 1 мМ феназин-метилсульфонілфториду, 1 мМ дитіотрентолу) шляхом центрифугування при 6000 об./хв двічі впродовж 10 хв; піддавали руйнуванню ультразвуком (дезінтегратор УЗДН-1, 22 кГц, сила анодного току – 0,4-0,7 А, резонансні умови). Колбу зі суспензією (25 см³, концентрація клітин – 16-20 мг сухої маси у см³) поміщали в льодяну баню. Ступінь руйнування контролювали за зростанням у середовищі концентрації білка, що вивільнювався із цитоплазми при деструкції клітинних оболонок. За вказаних умов диспергування концентрація білка суттєво зростала і стабілізувалась на максимальному рівні через 2,5-3,0 хв, тому час дезінтеграції клітин звичайно складав 3,0-3,5 хв. Одержаний таким чином диспергат центрифугували при 3000 об./хв упродовж 15-20 хв. Осад (залишок та фрагмент клітинної оболонки) відкидали, а супернатант знову центрифугували при 10 000 об./хв впродовж 1 год. При цьому фрагменти плазмолем, зруйнованої ультразвуком, залишались в осаді. З метою відмивання осад центрифугували, ресуспендували в невеликій кількості середовища А, стабілізували шляхом

додавання мертїоляту з розрахунку 1:100 та використовували в досліді, при необхідності – розводили гліцерином на 20 % (за об'ємом) і зберігали за температури -(18±1) °С.

Для стандартизації препаратів СМФ визначали наявність у їх складі білка за методом Лоурі в модифікації G.L. Miller (1959) [8]. Питому АТФ-азну активність СМФ реєстрували за швидкістю накопичення неорганічного фосфору (P_i) в результаті гідролізу АТФ у середовищі Б (10 мМ трис-НСL, 3 мМ MgCl₂, рН=7,4; 3 мМ АТФ) за температури (37±1) °С та визначали у $\frac{\text{нмоль } P_i}{\text{хв} \cdot \text{мг білка}}$. P_i визначали за методом Фіске-Субарроу після затримки реакції рівним об'ємом 10 % розчину ТХО [7].

Для одержання статистично вірогідних результатів визначення зазначених параметрів проводили у 10-кратній повторності з 3 паралельними пробами зразків. Математичну обробку отриманих даних виконували за допомогою методів варіаційної статистики, як описано в роботі Г.Ф. Лакіна (1980) [4].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як свідчать результати, що наведені у таблиці 1, за значенням своєї абсолютної активності АТФ-ази СМФ нативних клітин *S. enteritidis* № 34, *S. dublin* № 12, *S. typhimurium* № 16 виявились близькими, їх значення перебували у межах 2,32-3,40 мкмоль P_i/хв-мг білка.

Але активність АТФ-ази СМФ нативних клітин *P. multocida* і *E. coli* відрізнялась між різними штамми. Так, найвищі значення її активності реєстрували для клітин штамів *P. multocida* "Смол" і № 2 ((8,33±0,90) і (8,86±1,15) мкмоль P_i/хв-мг білка, що у середньому в 2,6 раза вище за значення АТФ-ази в інших штаммах) та *E. coli* № 20 і 24 ((25,60±2,30) і (15,74±2,10) мкмоль P_i/хв-мг білка, що у середньому в 3,75 раза вище за значення АТФ-ази в інших штаммах) відповідно.

Визначено, що процеси ліофілізації сприяли посиленню активності АТФ-ази у СМФ клітин *P. multocida* штамів № 550, 16 і 5 на 75,6, 66,0 і 143,9 % та *S. enteritidis* № 34, *S. dublin* № 12 і *S. typhimurium* № 16 на 236,2, 194,1 і 284,0 % відповідно (p<0,05). Але ліофілізація клітин *E. coli* № 20, 19 і 24, навпаки, спричиняла інгібування її активності у СМФ, зниження якої складало 71,1, 41,5 і 80,05 % відповідно, що вказувало на гальмування швидкості гідролізу АТФ у бактеріальних мембранах. Одержані дані дають підстави припустити, що зміни активності мембранної АТФ-ази, активний центр якої інкорпорований у мембрану, звернену до

цитоплазми, можуть бути пов'язані з безпосереднім впливом процесів ліофілізації.

Тому можна припустити, що генератори трансмембранного потенціалу клітин *P. multocida* різних штамів, *S. enteritidis* штаму № 34, *S. dublin* штаму № 12 і *S. typhimurium* штаму № 16 перебувають у більш активному функціональному стані, оскільки кінетика АТФ-ази є основним молекулярним механізмом генерації його величини. У СМФ клітин інших досліджуваних штамів гальмування активності АТФ-ази внаслідок ліофілізації вказує на те, що енергія витрачається на взаємодію з дисперсними та розчинними компонентами довкілля. Так, у літературі наведено низку доказів порушення бар'єру проникності цитоплазматичної мембрани після заморожування та висушування бактерій [1, 2, 5, 6], однак характер ушкодження клітинних структур та їх вплив на зберігання життєздатності бактерій також остаточно не з'ясовано.

ВИСНОВКИ. 1. Визначено, що зберігання у ліофілізованому вигляді клітин *P. multocida* (штамів № 550, 16 і 5) та сальмонел (штамів *S. enteritidis* № 34, *S. dublin* № 12 і *S. typhimurium*

№ 16) викликає посилення активності АТФ-ази на 75,6, 66,0 і 143,9 та 236,2, 194,1 і 284,0 % відповідно ($p \leq 0,05$). Отже, технологічний стрес приводить до індукування функціональної активності генераторів трансмембранного потенціалу клітин та включення адаптаційно-компенсаторних механізмів.

2. Зареєстровано, що тривале зберігання у ліофілізованому вигляді клітин *E. coli*, навпаки, приводить до гальмування швидкості гідролізу АТФ у їх мембранах, про що свідчить зниження активності АТФ-ази у СМФ клітин: штамів № 20 – на 71,1, № 19 – на 41,5 і № 24 – на 80,05 % відповідно.

3. Контролювання біологічного потенціалу мікробної клітини за умов впливу будь-якого стресу можна здійснювати за визначенням функціонального стану її цитоплазматичної мембрани, до якої інкорпорована АТФ-аза. Отже, результати роботи доцільно використовувати як корисні й прогностичні параметри при проведенні різноманітних біотехнологічних процесів, пов'язаних з накопиченням біомаси мікроорганізмів у середовищах, збагачених або лімітованих за будь-яким компонентом, та при оцінюванні ступеня шкідливості ефектів технологічного стресу.

Таблиця 1 – Вміст білка та активність АТФ-ази у сумарних мембранних фракціях нативних та деліофілізованих клітин бактерій різних штамів ($M \pm m$; $n=10$)

Клітини штамів	Показники	
	$C_{\text{білка}}, \text{мг/см}^3$	АТФ-аза, $\mu\text{моль P}_i/\text{хв} \cdot \text{мг білка}$
Нативні клітини бактерій		
<i>P. multocida</i> "Смол"	0,140±0,003	8,33±0,90
<i>P. multocida</i> 16	0,250±0,001	5,18±0,23
<i>P. multocida</i> 550	0,500±0,007	2,62±0,30
<i>P. multocida</i> 5	0,400±0,002	3,28±0,15
<i>P. multocida</i> 2	0,130±0,001	8,86±1,15
<i>E. coli</i> 20	0,45±0,05	25,60±2,30
<i>E. coli</i> 19	2,55±0,12	8,20±0,50
<i>E. coli</i> 25	2,05±0,01	7,02±1,55
<i>E. coli</i> 24	0,75±0,05	15,74±2,10
<i>S. enteritidis</i> 34	6,40±0,30	2,32±0,90
<i>S. dublin</i> 12	3,60±0,02	3,40±0,05
<i>S. typhimurium</i> 16	5,80±0,15	2,50±0,15
Деліофілізовані клітини бактерій		
<i>P. multocida</i> "Смол"	3,80±0,13	8,80±0,95
<i>P. multocida</i> 16	3,70±0,08	8,60±1,00*
<i>P. multocida</i> 550	4,10±0,25	4,60±0,15*
<i>P. multocida</i> 5	4,00±0,40	8,00±0,27*
<i>P. multocida</i> 2	6,20±0,48	9,00±0,60
<i>E. coli</i> 20	2,05±0,04	7,40±0,43*
<i>E. coli</i> 19	5,57±0,15	4,80±0,89*
<i>E. coli</i> 25	2,80±0,01	5,40±1,18
<i>E. coli</i> 24	5,70±0,27	3,00±0,05*
<i>S. enteritidis</i> 34	6,83±0,35	7,80±0,12*
<i>S. dublin</i> 12	5,00±0,13	10,00±0,95*
<i>S. typhimurium</i> 16	8,20±0,53	9,60±0,40*

Примітка. * – різниця значень показника у СМФ деліофілізованих клітин вірогідна при $p \leq 0,05$ відносно їх рівня у СМФ нативних клітин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Игнатов С.Г., Андреева О.В., Евдокимова О.А. и др. // Биохимия. – 1982. – **47**, № 10. – С. 1621.
2. Игнатов С.Г., Красильников В.А., Перельгин В.В. и др. // Биохимия. – 1981. – **46**, № 11. – С. 1996.
3. Карамушка В.И., Ульберг З.Р., Грузина Т.Г. и др. Роль мембранных процессов в накоплении золота Au (III) и Au (0) бактериями // Укр. биохим. журн. – 1990. – **62**, вып. 1. – С. 76-82.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 230 с.
5. Benschat L.R. // Adv. Appl. Microbiol. – 1978. – **23**. – P. 219.
6. Calcott P.H. Freezing and thawing microbes (England). – Meadowfield Ltd., 1980.
7. Fiske C.H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus // J. Biol. Chem. – 1925. – **66**, № 1. – P. 375-400.
8. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // Anal. Chem. – 1959. – **31**, № 5. – P. 964-966.
9. Serrano R. Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi // Biochem. Biophys. Acta. – 1988. – **947**, № 1. – P. 1-28.

АТФ-аза ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН БАКТЕРИЙ В ОЦЕНИВАНИИ ЭФФЕКТОВ СТРЕССА ЛИОФИЛИЗАЦИИ

М.Е. Романько¹, В.О. Ушкалов²

ННЦ "ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ"¹, ХАРЬКОВ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-КОНТРОЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ БИОТЕХНОЛОГИИ
И ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ², КИЕВ

Резюме

В статье приведены результаты исследований активности АТФ-азы плазматических мембран нативных и делиофилизированных клеток бактерий разных видов. Определено, что длительное сохранение в лиофилизированном состоянии влияет на активность АТФ-азы в мембранах клеток: достоверное повышение активности АТФ-азы *P. multocida* № 550, 16 и 5, *S. enteritidis* № 34, *S. dublin* № 12 и *S. typhimurium* № 16, торможение активности указанного фермента в *E. coli*. Полученные данные свидетельствуют о включении адаптационно-компенсаторных механизмов вследствие технологического стресса из-за индукции генераторов трансмембранного потенциала клеток. Поэтому контролирование биологического потенциала микробной клетки в условиях стресса можно осуществлять по определению функционального состояния её цитоплазматической мембраны.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: АТФ-аза, бактерия, делиофилизированные клетки, нативные клетки, суммарные мембранные фракции, штамм.

ATP-ase OF BACTERIA PLASMATIC MEMBRANES IN EVALUATION OF LYOPHILIZATION STRESS EFFECTS

M.Ye. Romanko¹, V.O. Ushkalov²

ESC "INSTITUTE OF EXPERIMENTAL AND CLINICAL VETERINARY MEDICINE"¹, KHARKIV
STATE SCIENTIFIC-CONTROL INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY AND STRAINS
OF MICROORGANISMS², KYIV

Summary

The results of research of ATP-ase activity of plasmatic membranes of native and delyophilized cells of bacteria of various species are represented in the article. The long-term storage in lyophilized condition was revealed to influence upon ATP-ase activity in cellular membranes: reliable increase of ATP-ase activity of *P. multocida* № 550, 16 and 5, *S. enteritidis* № 34, *S. dublin* № 12 and *S. typhimurium* № 16, inhibition of the activity of mentioned enzyme in *E. coli*. The data obtained testify to inclusion of adaptive-compensatory mechanisms due to technological stress via induction of generators of cellular trans-membrane potential. So, the control of biological potential of microbial cell under stress condition can be fulfilled by definition of functional condition of its cytoplasmatic membrane.

KEY WORDS: ATP-ase, bacterium, delyophilized cells, native cells, summary membrane fractions, strain.

Отримано 27.03.2008 р.

Адреса для листування: М.Е. Романько, ННЦ "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини", Харків, 61002, Україна.

Медицина хімія – т. 10, № 2, 2008

КОРЕКЦІЯ ЗМІН ВМІСТУ НІКОТИНАМІДНИХ КОФЕРМЕНТІВ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ УРАЖЕННЯ ТОКСИНАМИ БЛІДОЇ ПОГАНКИ

Б.А. Локай, І.Г. Пересадько, О.Є. Макарова

*ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ*

У досліджах на білих щурах встановлено, що отруєння токсинами блідої поганки призводить до значного зменшення вмісту окиснених і відновлених нікотинамідних коферментів, їх суми та співвідношення окиснені/відновлені в печінці. Лікування отруєних тварин ліпоєвою кислотою, кокарбоксілазою, глутаргіном і тіотриазоліном сприяє різкому збільшенню синтезу окиснених коензимів, меншою мірою – відновлених.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: бліда поганка, печінка, нікотинамідні коферменти, ліпоєва кислота, кокарбоксілаза, глутаргін, тіотриазолін.

ВСТУП. Щорічні сезонні отруєння токсичними грибами нерідко набувають вигляду “грибних епідемій” і спричиняють тяжкі ураження організму. Особливо небезпечними є отруєння блідою поганкою (БП), після вживання котрої розвиваються критичні стани з формуванням поліорганної недостатності [2, 15], передусім печінки, з розвитком її фульмінантної недостатності та високою летальністю [14, 18-20]. Роль печінки полягає в здійсненні та регуляції всіх видів обміну речовин, у детоксикації екзо- й ендотоксинів. Особливе місце в метаболізмі займають нікотинамідні коферменти (НАК), воно визначається їх першочерговою роллю в енергетичному і пластичному обміні [5, 11], а також в механізмі дії отруту і лікарських препаратів [13].

Лікування токсичних уражень печінки отрутою БП є складним завданням, про що свідчить велика кількість препаратів, але терапевтичний ефект їх застосування не завжди достатній. З лікувальною метою використовують засоби патогенетичної та симптоматичної терапії. До перших належать ліпоєва кислота (ЛК) [4, 6, 9], яка вважається антидотом при отруєннях БП [17] і разом з кокарбоксілазою (КК) є складником для окисного декарбоксілювання піровиноградної та альфа-кетоглутарової кислот; глутаргін (Глу), що має гепатотропні та антиоксидантні ефекти, проявляє мембраностабілізуючі властивості й позитивно впливає на процеси енергозабезпечення гепатоцитів [1, 10]; тіотриазолін (Тіо) – синтетичний гепатопротектор, який стабілізує клітинні мем-

© Б.А. Локай, 2008.

брани і стимулює біосинтез білка в гепатоцитах [8]. Відомостей щодо вмісту НАК у печінці за умов ураження токсинами БП у літературі мало [3], а дані про вплив Глу і Тіо відсутні. Метою дослідження було вивчити роль порушень метаболізму НАК в патогенезі уражень печінки токсинами БП та ефективність застосування ЛК, КК, Глу та Тіо при даній інтоксикації.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди виконано на 78 білих нелінійних щурах-самцях масою 180-220 г, яких було поділено на 5 груп: 1-ша – інтактні тварини (контроль); 2-га – отруєні; 3-5 – отруєні й ліковані. Отруєння здійснювали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення екстракту БП у дозі ЛД₅₀. Лікування розпочинали через 2 год після отруєння. Лікувальні препарати вводили протягом трьох діб у дозах (мг/кг): 3-тя група – КК – 25, ЛК – 100; 4-та – Глу – 400; 5-та – Тіо – 100. Евтаназію проводили шляхом декапітації під ефірним наркозом через 6, 24 і 72 год після отруєння. У гомогенатах печінки вміст окиснених (НАД⁺+НАДФ) і відновлених (НАДН₂+НАДФН₂) форм НАК визначали флуориметрично [16]. Загальний вміст НАК розраховували як суму окиснених та відновлених форм, а також їх співвідношення. Статистичну обробку результатів дослідження проводили, використовуючи t-критерій Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналізуючи отримані результати, можна констатувати, що при ураженні отрутою БП у печінці білих щурів знижувався сумарний вміст НАК: через 6 год –

на 2 %, 24 год – на 25 %, 72 год – на 6 % (табл. 1). Одночасно відбувалось зменшення вмісту окиснених форм НАК, відповідно, на 12, 37 і 10 % стосовно контролю, відновлених – на 10 і 2 % через 24 і 72 год та незначне підвищення на 10 % через 6 год після отруєння. Співвідношення окиснених форм НАК до відновлених форм НАК було меншим контролю на 19 і 30 % через 6 і 24 год та на 9 % через 72 год дослідю.

Лікування отруєних тварин ЛК, КК, Глу і Тіо супроводжувалося незначним зростанням суми коензимів відносно нелікованих тварин через 6 год, переважно за рахунок збільшення концентрації окиснених форм на 10-13 % та зменшення вмісту відновлених форм на 10 %, підвищивши тим самим їх співвідношення на 20-21 %.

На висоті альфа-аманітинової інтоксикації (на 24 годину дослідю) у всіх групах лікованих тварин, порівняно з нелікованими, сума НАК достовірно зростала на 26-28 %. Збільшення НАК відбувалося, головним чином, за рахунок окиснених форм (на 42-48 %) та незначного збільшення вмісту відновлених (на 9-10 %), підвищивши співвідношення окиснені/відновлені коферменти на 33-37 %.

Через 72 год після отруєння сума НАК в отруєних та лікованих щурів складала 92-101 %

контрольних величин, перевищивши рівень у нелікованих на 6 %. У лікованих тварин збільшення відбувалося переважно за рахунок зростання вмісту окиснених форм на 10 %, відновлених – на 1-2 %. Відповідно, на 8-14 % збільшилося співвідношення окиснені/відновлені коензими.

У клітинах, що нормально функціонують, НАД перебуває переважно в окисненому стані, НАДФ, навпаки, за тих самих умов присутній у відновленій формі. Це сприяє перенесенню електронів у дихальному ланцюгу та є головним джерелом енергії для росту і функціонування клітин [5, 11, 13]. Ураження щурів отрутою БП спричиняє зменшення сумарного вмісту коферментів у печінці, при цьому концентрація відновлених коферментів перевищує концентрацію окиснених, а співвідношення НАД+НАДФ/НАДН+НАДФН стає меншим 1,0 (у контролі воно складає 1,23). Оскільки для синтезу НАД-коферментів необхідна АТФ, різке зниження рівня якої під дією отрути БП відмічено як в експериментальних дослідженнях [2], так і в клінічних умовах [12], зменшення рівня НАД-коферментів можна пояснити значними витратами на детоксикацію, порушенням їх синтезу і проникненням через пошкоджені мембрани гепатоцитів [7]. Підвищення рівня НАД-коферментів у печінці лікованих тварин

Таблиця 1 – Зміни вмісту нікотинамідних коферментів у печінці щурів за умов отруєння блідою поганкою та лікування (ЛД₅₀; M±m; n=6)

Показники	Групи тварин	Строки після отруєння, год			
		6	24	72	
НАД+НАДФ, ммоль/кг сирової тканини	контрольні	465,1±21,3			
	отруєні	408,1±15,4	291,2±22,3*	418,7±19,7	
	ліковані	ЛК+КК	419,8±22,5	343,7±24,7*	428,5±20,5
		Глу	387,3±32,6	372,9±24,2*#	474,8±14,7#
		Тіо	393,4±22,5*	326,2±19,5*	407,9±23,3
НАДН+НАДФН, ммоль/кг сирової тканини	контрольні	381,7±13,8			
	отруєні	422,8±29,4	343,7±24,6	375,1±7,7	
	ліковані	ЛК+КК	384,5±16,9	320,4±15,5*	358,4±20,6
		Глу	361,2±20,5	326,2±32,8	381,7±29,6
		Тіо	390,5±22,8	305,9±28,1*	367,0±26,8
Сума нуклеотидів, ммоль/кг сирової тканини	контрольні	846,9±25,6			
	отруєні	830,9±37,5	634,1±41,9*	793,8±24,3	
	ліковані	ЛК+КК	804,3±27,8	664,1±15,7*	786,9±18,7
		Глу	748,5±37,8	699,1±54,5*	856,6±40,1
		Тіо	783,9±42,6	632,1±46,4*	774,9±46,9
Співвідношення НАД+НАДФ/ НАДН+НАДФН	контрольні	0,23± 0,07			
	отруєні	0,99 ± 0,07*	0,86 ± 0,06*	1,12 ± 0,05	
	ліковані	ЛК+КК	1,10 ± 0,07	1,10 ± 0,13	1,23 ± 0,12
		Глу	1,09 ± 0,13	1,17 ± 0,07#	1,28 ± 0,09
		Тіо	1,01 ± 0,04*	1,09 ± 0,06#	1,12 ± 0,05

Примітка. * – зміни достовірні відносно контролю (p<0,05); # – зміни достовірні відносно отруєних тварин (p<0,05).

більшою мірою зумовлене, очевидно, підсиленням їх синтезу при застосуванні ЛК, КК і Глу, меншою – гепатопротекторною дією Тіо.

Застосування вивчених препаратів свідчить про перспективність їх використання як засобів корекції метаболічних порушень у печінці за умов ураження токсинами блідої поганки.

ВИСНОВКИ. 1. Отруєння щурів екстрактом блідої поганки призводить до значного зниження у печінці вмісту НАД+НАДФ, НАДН+

НАДФН, їх суми та співвідношення окиснені/відновлені.

2. Лікування отруєних тварин ліпоевою кислотою, кокарбоксілазою, глутаргіном і тіотриазоліном значною мірою поліпшує показники вмісту всіх компонентів НАД-коферментної системи, причому, незважаючи на деякі відмінності в механізмі дії, результат використання досліджених препаратів виявився майже ідентичним.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабак О.Я. Применение нового отечественного препарата глутаргина в гастроэнтерологии // Сучасна гастроентерологія. – 2003. – № 2 (12). – С. 85-89.
2. Бойчук Б.Р. Отруєння грибами. – Тернопіль: Укрмедкнига, 1997. – 200 с.
3. Бойчук Б.Р., Локай А.І., Нечай Р.Є. Вплив аманіта-фаллоїдинів на динаміку нікотинамідних коферментів в експерименті // Міжнародний конгрес з інтегративної антропології: Матер. конгресу. – Тернопіль, 1995. – С. 71-72.
4. Бондарь В.К., Кизиль І.П., Крауз В.А. и др. Гемосорбция в комплексном лечении острых экзотоксикозов / Под ред. Л.В. Усенко. – К.: Здоров'я, 1986. – 256 с.
5. Губський Ю.І. Біоорганічна хімія. – К.: Нова книга, 2004. – 464 с.
6. Локай Б.А. Порушення та корекція обміну адениннуклеотидів у печінці щурів при отруєнні блідою поганкою // Мед. хімія. – 2006. – **8**, № 2. – С. 95-97.
7. Локай Б.А., Волков К.С. Патоморфологія отруєнь блідою поганкою // Вісн. Ужгородського державного університету. Серія: Медицина. – 2006. – Вип. 28. – С. 12-15.
8. Мазур І.А., Волошин Н.А., Чекман І.С. и др. Тиотриазолин: Фармакологические аспекты и клиническое применение. – Запорожье, Львов: Наутилус, 2005. – 146 с.
9. Малыш И.Р., Макарук В.А., Цепляев В.И. Алгоритмы дифференцированной интенсивной терапии пациентов с отравлением гепатотропными грибами // Біль, знеболювання і інтенсивна терапія. – 2000. – № 1(д). – С. 128-130.
10. Меркулова Ю.В., Чайка Л.О., Гомон О.Н. та ін. Глутаргін – механізм реалізації антитоксичних фармакологічних властивостей при гострих і хронічних ураженнях печінки // Ліки. – 2004. – № 1-2. – С. 91-98.
11. Нагорна О.О., Горчакова Н.О., Чекман І.С. Фармакодинаміка нікотинаміду // Ліки. – 2003. – № 3-4. – С. 51-58.
12. Стародуб Є.М., Локай Б.А. Вплив пеніциліну на систему аденинових нуклеотидів // Гастроентерологія. – Дніпропетровськ, 1999. – Вип. 28. – С. 267-269.
13. Чекман І.С. Биохимическая фармакодинамика. – К.: Здоров'я, 1991. – 200 с.
14. Черний В.И., Кузнецова И.В., Тюменцева С.Г. и др. Фульминантная недостаточность печени как проявление отравлений гепатотоксическими грибами (обзор литературы и собственные данные) // Біль, знеболювання, інтенсивна терапія. – 2003. – № 4. – С. 69-79.
15. Eyer F., Felgenhauer N., Zilker T. The development of a toxic magacolon due to Amanita phalloides. A rare complication // Dtsch. Med. Wochenschr. – 2004. – **129**, N 4. – P. 137-140.
16. Huff J.W., Perlzweig W.A. The fluorescent condensation product of N-methyl-nicotinamide and acetone // J. Biol. Chem. – 1947. – **197**, № 1. – P. 157-167.
17. Kulig K., Rumack B.H. Mushrooms // Clinical management of poisoning and drug overdose. – London: W.B. Saunders Company, 1983. – P. 294-303.
18. Pawlowska J., Pawlak J., Kaminski A. et al. Amanita phalloides poisoning as an indication for liver transplantation in three family members // Wiad. Lek. – 2006. – **56**, № 1-2. – P. 131-134.
19. Rubic J., Pietraszek-Jeziarska E., Kaminski A. et al. Successful treatment of a child with fulminant liver failure and coma caused by Amanita phalloides intoxication with albumin dialysis without liver transplantation // Pediatr. Transplant. – 2004. – **8**, № 3. – P. 209-300.
20. Shi Y., Chen S., Zhang L. et al. MARS: optimistic therapy method in fulminant hepatic failure secondary to cytotoxic mushroom poisoning – a case report // Liver. – 2002. – Suppl. 2, № 7. – P. 77-80.

**КОРРЕКЦИЯ ИЗМЕНЕНИЙ СОДЕРЖАНИЯ НИКОТИНАМИДНЫХ
КОФЕРМЕНТОВ В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ПОРАЖЕНИИ ТОКСИНАМИ
БЛЕДНОЙ ПОГАНКИ**

Б.А. Локай, И.Г. Пересадько, О.Е. Макарова
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

В опытах на белых крысах установлено, что отравление токсинами бледной поганки приводит к значительному уменьшению содержания окисленных и восстановленных никотинамидных коферментов, их суммы и соотношения окисленные/восстановленные в печени. Лечение отравленных животных липоевой кислотой, кокарбоксилазой, глутаргином и тиотриазолином способствует резкому усилению в печени синтеза окисленных коэнзимов, в меньшей степени – восстановленных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бледная поганка, печень, никотинамидные коферменты, липоевая кислота, кокарбоксилаза, глутаргин, тиотриазолин.

**CORRECTION OF CHANGES OF NICOTINAMIDE COENZYMES IN THE RAT'S
LIVER UNDER CONDITION OF AMANITA PHALLOIDES POISONING**

B.A. Lokay, I.H. Peresadko, O.Ye. Makarova
TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

In the experiments on white rats it was revealed that the Amanita phalloides poisoning causes the considerable reduction of contents of oxidized and reduced nicotinamide coenzymes, their sum and ratio oxidized/reduced in the liver. It was shown that treatment of intoxicated animals with lipoic acid, cocarboxylase, glutargin and thiotriazolin promotes sharp increasing of oxidized coenzymes synthesis, and in a less degree, of reduced ones.

KEY WORDS: Amanita phalloides, liver, nicotinamide coenzymes, lipoic acid, cocarboxylase, glutargin, thiotriazolin.

Отримано 18.02.2008 р.

Адреса для листування: Б.А. Локай, вул. Руська, 23, кв. 99, м. Тернопіль, 46001, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua**

ВПЛИВ РИБОКСИНУ НА ВИЖИВАННЯ ТА МЕТАБОЛІЧНУ АКТИВНІСТЬ ЛІМФОЦИТІВ ТИМУСА ЗА ПРОМЕНЕВОГО УРАЖЕННЯ

Т.Р. Андрійчук, Н.Г. Ракша, С.Л. Лугова, Л.П. Драган, Б.О. Цудзевич
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Показано, що введення препарату "Рибоксин" за 15 хв до опромінення щурів у дозах 1,0 та 7,78 Гр зумовлює підвищення метаболічної активності клітин та відсотка життєздатних лімфоцитів тимуса порівняно з результатами за дії лише променевого чинника. Встановлено нормалізуючий вплив рибоксину як на рівень фрагментації хроматину, оцінений за накопиченням полідезоксирибонуклеопротейдів, так і на ступінь міжнуклеосомної деградації ДНК у тимоцитах опромінених тварин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: рибоксин, лімфоцити тимуса, рентгенівське опромінення.

ВСТУП. Пошук засобів, спрямованих як на попередження, так і на зниження ступеня прояву радіаційно-індукованих порушень гомеостазу на клітинному, органному та організменному рівнях, залишається досить актуальним завданням, особливо з огляду на широке впровадження методів радіотерапії в практику лікування онкологічних захворювань. У зв'язку з тим, що використання класичних радіопротекторів, зважаючи на ряд побічних ефектів, які, як правило, мають місце при їх застосуванні, є не зовсім доцільним, особливий інтерес для досліджень становлять препарати природного походження, здатні підвищувати загальну неспецифічну резистентність організму за опромінення в широкому діапазоні доз.

Однією з найбільш критичних систем за радіаційного впливу є імунна, яка виступає важливою ефекторною ланкою регуляції репаративних можливостей організму. Стан імунної системи на момент опромінення, її репаративний потенціал відіграють вирішальну роль у патогенезі променевих уражень, а отже, і в ступені радіочутливості організму в цілому. Тому препарати, які прямо чи опосередковано впливають на імунореактивність організму, впливатимуть також на ендогенний фон радіорезистентності. Типовою реакцією імунної системи у відповідь на дію променевого чинника є розвиток імунодефіцитів, що супроводжується ураженням клітинної та гуморальної ланок імунітету. Радіаційна імунодепресія зумовлена як безпосередньою загибеллю клітин та спустошенням лімфоїдних органів, так і знач-

© Т.Р. Андрійчук, Н.Г. Ракша, С.Л. Лугова, Л.П. Драган, Б.О. Цудзевич, 2008.

ним пригніченням функціональної активності клітин, що вижили.

Оскільки нормальне функціонування імуннокомпетентних клітин тимуса можливе лише за умови збереження стабільного фонду та підтримання збалансованих концентрацій пуринів, значний інтерес становлять препарати на основі пуринових нуклеотидів і нуклеозидів, які, згідно з даними літератури, мають імуномодуляторні, антизапальні, нейро- та кардіопротекторні властивості [10, 12].

До недавнього часу пуриновий нуклеозид інозин розглядали як неактивний метаболіт, проте дослідження останніх років показали, що позаклітинний інозин проявляє значні захисні властивості, зокрема попереджує загибель клітин глії при нестачі глюкози, знижує вивільнення внутрішньоклітинних ферментів з лімфоцитів за гіпоксії, покращує функціонування нирок за ішемії серця та ін. [13, 14]. Незважаючи на значну кількість експериментальних робіт щодо протекторного впливу інозину (фармакологічний препарат "Рибоксин"), залишаються до кінця не з'ясованими механізми його дії за радіаційного впливу.

Метою даної роботи було дослідити вплив рибоксину на виживання та метаболічну активність лімфоцитів тимуса за променевого ураження.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на нелінійних щурах-самцях масою 150-170 г. Препарат "Рибоксин" у вигляді 2 % розчину вводили за 15 хв до опромінення внутрішньоочеревинно з розрахунку 150 мг препарату на 1 кг маси тварини. Опромінення

здійснювали на рентгенівській установці РУМ-17 в дозах 1,0 Гр та 7,78 Гр за умов: фільтри – 0,5 мм Cu та 1 мм Al, шкірно-фокусна відстань – 50 см, напруга – 200 кВ, сила струму – 5 мА для 1,0 Гр та 10 мА для 7,78 Гр, потужність дози – 0,17 та 0,34 Гр/хв відповідно. Тварин декапітували через 3 год після дії променевого чинника. Лімфоцити з тимуса виділяли за методом [7]. Метаболічну активність клітин визначали за результатами МТТ-тесту (3-[4,5-диметилтіазоліл]-2,5-дифеніл-тетразолію бромід) за накопиченням продукту реакції формазазу, який реєстрували при $\lambda=570$ на спектрофотометрі для мікропланшетів Thermo Labsystems Opsys MR (США). Життєздатність клітин досліджували з використанням вітального барвника трипанового синього. Інкубацію клітин проводили в середовищі RPMI 1640 за присутності 5 % інактивованої сироватки телят при 37 °С. Ступінь фрагментації ДНК оцінювали флуориметричним методом з використанням 3',5'-діамінобензойної кислоти. Відсоток полідезоксирибонуклеопротеїдів (ПДН) від загального вмісту ДНК розраховували як співвідношення кількості деградованого хроматину, що міститься в надосадовій рідині, до його сумарної кількості в осаді та надосадовій рідині [3]. Електрофорез ДНК проводили у 1,7 % агарозному гелі в трис-ацетатному буфері (рН=8,3) впродовж 5 год за напруги 5 В/см, отримані електрофореграми фотографували через червоний фільтр на плівку Мікрат-300 в ультрафіолетових променях, негативи сканували за допомогою сканера HP ScanJet 5p (США). Статистичну обробку одержаних результатів здійснювали загальноприйнятими методами варіаційної статистики.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Оцінку метаболічної активності лімфоцитів тимуса проводили за допомогою МТТ-тесту, принцип якого ґрунтується на здатності клітинних дегідрогеназ відновлювати МТТ-тетразолієву сіль до забарвленого у фіолетовий колір нерозчинного продукту. Оскільки одним з ферментів, що беруть участь у відновленні МТТ, є мітохондріальна НАДН-залежна сукцинатдегідрогеназа, даний тест дозволяє опосередковано зробити висновок про активність електронтранспортного ланцюга мітохондрій – чим вища активність останнього, тим інтенсивніше перебігатиме реакція відновлення МТТ і тим, відповідно, вищою буде метаболічна активність клітин.

Згідно з одержаними результатами (рис. 1), через 3 год після дії на тварин рентгенівського випромінювання в досліджуваних дозах

спостерігалось зниження ступеня відновлення МТТ, що може свідчити про порушення функціонування мітохондрій та узгоджується з існуючими уявленнями про високу чутливість даних органел, зокрема комплексів дихального ланцюга, до дії пошкоджувальних чинників. Так, за опромінення в дозі 1,0 Гр мало місце зменшення ступеня відновлення МТТ в 1,75 раза. При підвищенні дози опромінення до 7,78 Гр ступінь відновлення МТТ, а отже, і загальна активність електронтранспортного ланцюга мітохондрій залишалися в 1,63 раза нижчими за контрольний показник.

З метою корекції променевих ефектів ми використовували препарат “Рибоксин”, профілактичне введення якого, згідно з даними літератури, зумовлює захист тварин за дії іонізуючої радіації в широкому діапазоні доз як гострого, так і хронічного опромінення [4, 11], але, на відміну від класичних радіопротекторів, не супроводжується розвитком побічних ефектів.

Нами показано, що введення рибоксину за 15 хв до опромінення приводить до підвищення активності дихального ланцюга мітохондрій в 1,25 раза за опромінення в дозі 1,0 Гр та в 1,45 раза за дії радіації в дозі 7,78 Гр порівняно з результатами за дії лише променевого чинника. Одержані дані можна пояснити з позицій описаної в літературі здатності препарату підвищувати активність ряду окисно-відновних ферментів дихального ланцюга, зокрема сукцинатдегідрогенази та НАД-діафори [2], що в комплексі з його нормалізуючим впливом на вміст як окисненої, так і відновленої форм нікотинамідних коферментів сприяє нормалізації роботи електронтранспортного ланцюга порівняно з результатами за опромінення.

Окрім того, автори роботи [5] на основі аналізу даних гістохімічних та електронномікроскопічних досліджень показали, що застосування рибоксину сприяє нормалізації ультраструктури мітохондрій, порушеної внаслідок розвитку оксидативного стресу. Беручи до уваги тісний взаємозв'язок структурного стану органел та їх функціональної активності, можна припустити, що стабілізація архітектоники радіаційно-пошкоджених мітохондріальних мембран за введення рибоксину в кінцевому результаті сприяє покращенню енергетичного стану клітини та метаболічного статусу в цілому.

Далі ми досліджували вплив препарату “Рибоксин” на ступінь виживання лімфоїдних клітин за опромінення щурів у мінімальній летальній дозі. На рисунку 2 представлено динаміку виживання тимоцитів, виділених через 3 год після опромінення тварин. З наведених

результатів видно, що впродовж перших 4 год інкубації відбувається поступове зниження кількості життєздатних клітин з 92 %, які були на момент виділення, до 87 % на 4-ту год культивування клітин. За опромінення тварин на фоні попереднього введення рибоксину спостерігалось наближення кількості життєздатних клітин до контрольних величин як безпосередньо після виділення, так і на початкових етапах культивування (91 % на 4-ту год інкубації).

Такий цитопротекторний ефект препарату, ймовірно, має комплексний характер і зумовлений поліфункціональністю дії активної складової – інозину, зокрема як ефектами, пов'язаними з безпосередньою дією інозину на субпопуляцію поверхневих аденозинових рецепторів, так і з ефектами, опосередкованими через залучення продуктів деградації препарату до клітинних реакцій.

Відомо, що радіаційно-індукована загибель клітин лімфоїдних органів супроводжується залежною від дози і часу після опромінення структурною дезорганізацією хроматину. Оскільки інозин та його похідні як необхідні метаболічні субстрати основного та реутилізаційного шляхів біосинтезу пуринів можуть впливати на перебіг реакцій синтезу попередників нуклеїнових кислот, що особливо важливо за променевого ураження, наступним нашим завданням було вивчити вплив препарату "Рибоксин" на ступінь деградації хроматину в лімфоцитах тимуса опромінених тварин. У зв'язку з цим, досліджено вміст у клітинах комплексів ДНК відносно невеликої молеку-

лярної маси з білками – полідезоксирибонуклеопротеїдів, найінтенсивніший вихід яких корелює у часі з вираженими морфологічними змінами в ядрі. Як видно з рисунка 3, через 3 год після загального опромінення тварин у дозі 1,0 Гр відбувалось збільшення вмісту ПДН у тимоцитах, яке становило 157 % від значення контролю. За дії на щурів променевого чинника у дозі 7,78 Гр спостерігалось подальше накопичення у клітинах полідезоксирибонуклеотидів, рівень яких зростав втричі порівняно з контрольним показником. Таке значне збільшення кількості ПДН при опроміненні тварин у мінімальній летальній дозі може бути пов'язане з дозозалежним зростанням кількості нерепарованих одно- та дволанцюгових розривів ДНК, накопичення яких призводить до локальної дестабілізації структури хроматину, що полегшує доступ клітинних нуклеаз до сайтів пошкодження. Рівень ПДН у тимоцитах щурів, опроміненних на фоні введення рибоксину, достовірно знижувався на 32 та 94 % порівняно з результатами за опромінення в дозах 1,0 та 7,78 Гр.

Відповідно до роботи [1], рівень ПДН, що утворюються у відповідь на дію променевого чинника, визначається переважно не ступенем деградації хроматину в усій популяції тимоцитів, а кількістю клітин, що гинуть. А оскільки, згідно з описаними вище даними, введення рибоксину підвищує рівень життєздатних клітин, можна припустити, що нормалізуючий вплив препарату на вміст ПДН частково пов'язаний зі зниженням відсотка клітин, що перебувають на стадії загибелі.

Загальновизнано, що частина променевих ефектів, зокрема пошкодження ДНК, що розвиваються як відразу, так і в більш пізні строки після радіаційного впливу, опосередковується кисневими радикалами і залежить від внутріш-

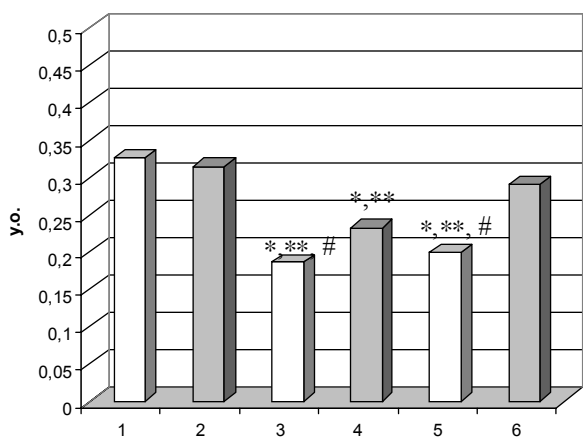


Рис. 1. Ступінь відновлення МТТ у тимоцитах щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення рибоксину: 1 – контроль; 2 – контроль на фоні введення рибоксину; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр на фоні введення рибоксину; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр на фоні введення рибоксину; * – достовірно відносно контролю; ** – достовірно відносно контролю на фоні введення рибоксину; # – достовірно відносно відповідних опромінених груп.

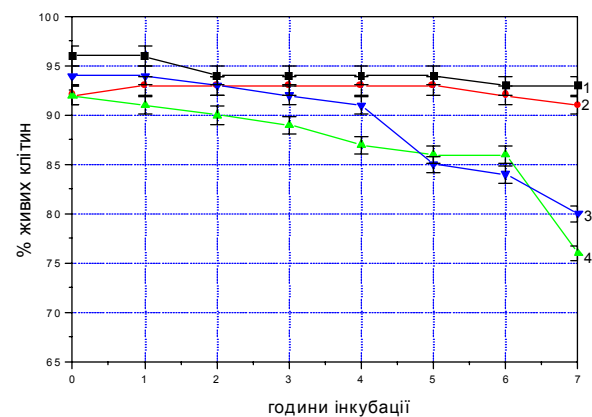


Рис. 2. Динаміка життєздатності тимоцитів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення рибоксину: 1 – контроль; 2 – контроль на фоні введення рибоксину; 3 – опромінення в дозі 7,78 Гр на фоні введення рибоксину; 4 – опромінення в дозі 7,78 Гр.

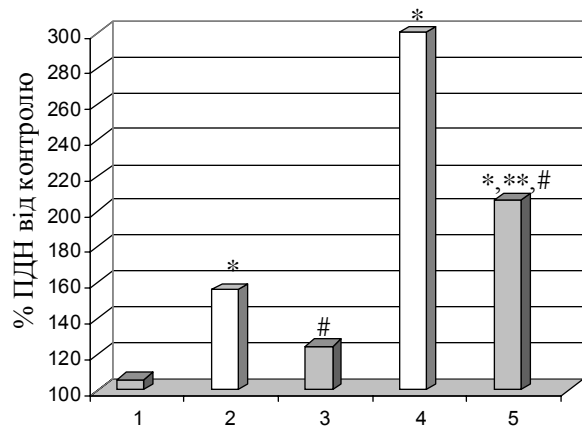


Рис. 3. Вміст полідезоксирибонуклеопротейдів у тимоцитах щурів за дії іонізуючої радіації та на фоні введення рибоксину: 1 – контроль на фоні введення рибоксину; 2 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 3 – опромінення в дозі 7,78 Гр на фоні введення рибоксину; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр на фоні введення рибоксину; * – достовірно відносно контролю; ** – достовірно відносно контролю на фоні введення рибоксину; # – достовірно відносно відповідних опромінених груп.

нюклітинного балансу між компонентами прота антиоксидантної систем. Зниження відсотка ПДН при застосуванні рибоксину частково можна пояснити здатністю препарату впливати на окисний гомеостаз клітин. Так, згідно з даними [6, 8], введення препарату сприяє зростанню рівня відновленого глутатіону та активації супероксиддисмутази при одночасному зниженні інтенсивності процесів вільнорадикального окиснення ліпідів. Нарешті, один з продуктів метаболізму інозину – сечова кислота проявляє виражені антиоксидантні властивості: її утворення можна розглядати як своєрідний компенсаторний механізм під час розвитку в клітинах оксидативного стресу, оскільки ця сполука здатна вступати в обмінні реакції з активними кисневими радикалами та пероксинітридами, інгібуючи таким чином процеси перекисного окиснення ліпідів [9].

Відповідно до сучасних уявлень, однією з класичних ознак радіаційно-індукованої загибелі клітин лімфоїдного ряду є впорядкована міжнуклеосомна деградація ДНК.

З огляду на встановлену нами здатність рибоксину знижувати кількість ПДН, ми з'ясу-

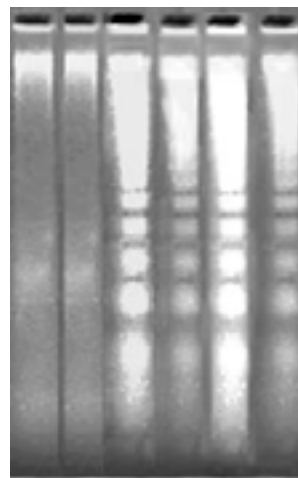


Рис. 4. Електрофореграма ДНК лімфоцитів тимуса: 1 – контроль; 2 – контроль на фоні введення рибоксину; 3 – опромінення в дозі 1,0 Гр; 4 – опромінення в дозі 1,0 Гр на фоні введення рибоксину; 5 – опромінення в дозі 7,78 Гр; 6 – опромінення в дозі 7,78 Гр на фоні введення рибоксину.

вали, чи впливає даний препарат і на характер фрагментації ДНК. Для ідентифікації фрагментів ДНК проводили їх електрофоретичне розділення, результати якого наведено на рисунку 4. Показано, що за опромінення в обох досліджуваних дозах фрагменти ДНК, розподіляючись в агарозному гелі відповідно до своїх розмірів, формують характерну для апоптотичної загибелі “драбину”, причому ні розміри, ні співвідношення між окремими фрагментами різної довжини в цілому від дози опромінення не залежать. За дії на щурів променевого чинника на фоні попереднього введення препарату на електрофореграмах також спостерігали появу дискретних зон, проте інтенсивність змін була менш вираженою порівняно з відповідними результатами при опроміненні в дозах 1,0 та 7,78 Гр.

ВИСНОВОК. У результаті проведених досліджень нами встановлено, що препарат “Рибоксин” підвищує життєздатність лімфоцитів тимуса опромінених щурів, стимулює їх метаболічну активність та сприяє стабілізації структури хроматину тимоцитів тварин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Белецкий И.П., Лихтенштейн А.В., Уманский С.Р. Закономерности деградации индивидуальных генов в тимоцитах облученных крыс // Радиобиология. – 1989. – **29**, № 4. – С. 435-440.

2. Григорьева М.Б. Влияние инозина на обмен веществ (обзор) // Хим.-фармац. журн. – 1982. –

№ 4. – С. 387-422.

3. Дмитренко Н.П., Андрийчук Т.Р., Кишко Т.О. и др. Определение поврежденной ДНК в непролиферирующих клетках животных // Укр. біохім. журн. – 1997. – **69**, № 1. – С. 69-71.

4. Легеза В.И., Абдуль Ю.А., Антушевич А.Е. и

др. Влияние рибоксина на резистентность мышей к пролонгированному γ -облучению в нелетальной дозе // Радиационная биология. Радиоэкология. – 1993. – **33**, № 2 (5). – С. 658-664.

5. Николаева Л.Ф., Черпаченко Н.М., Соколова Р.И. Влияние инозина на метаболизм миокарда вне зоны инфарктирования // Кардиология. – 1971. – № 5. – С. 111-114.

6. Рудык Б.И., Швед Н.И., Блинова Н.Г. и др. Влияние рибоксина на перекисное окисление липидов у больных острым инфарктом миокарда // Врач. дело. – 1989. – **965**, № 8. – С. 14-15.

7. Хант С. Выделение лимфоцитов и вспомогательных клеток. Лимфоциты: Методы. – М.: Мир, 1990. – 395 с.

8. Шлемкевич М.П., Тимочко М.Ф., Федорович И.П. Влияние рибоксина на поддержание баланса перекисного окисления липидов и антиоксидантной активности при старении // Всесоюзный симпозиум "Герiatricкие средства: экспериментальный поиск и клиническое использование": Тезисы и рефераты докладов. – К., 1999. – С. 200-201.

9. Becker B.F., Reinholz N., Ozcelik T. et al. Uric acid as radical scavenger and antioxidant in the heart // Pflugers Arch. – 1989. – **415**. – P. 127-135.

10. Bell M.J., Kochanek P.M., Carcillo J.A. et al. Interstitial adenosine, inosine, and hypoxanthine are increased after experimental traumatic brain injury in the rat // J. Neurotrauma. – 1998. – **15**. – P. 163-167.

11. Bing Hou, Zhi-Wei Xu, Chao-Wen Yang et al. Protective effects of inosine on mice subjected to lethal total-body ionizing irradiation // J. Radiation Research. – 2007. – **48**. – P. 57-62.

12. Cronstein B.N. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent // J. Appl. Physiol. – 1994. – **76**, № 5. – P. 13-17.

13. Hasko G., Sitkovsky M.V., Szabo C. Immunomodulatory and neuroprotective effects of inosine // TRENDS in Pharmacological Sciences. – 2004. – **25**, № 3. – P. 152-157.

14. Jurkowitz M.S., Litsky M.L., Browning M.J., Hohl C.M. Adenosine, inosine and guanosine protect glial cells during glucose deprivation and mitochondrial inhibition: correlation between protection and ATP preservation // J. Neurochem. – 1998. – **71**. – P. 535-537.

ВЛИЯНИЕ РИБОКСИНА НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ И МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЛИМФОЦИТОВ ТИМУСА ПРИ ЛУЧЕВОМ ПОРАЖЕНИИ

Т.Р. Андрийчук, Н.Г. Ракша, С.Л. Луговая, Л.П. Драган, Б.А. Цудзевич
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

Резюме

Показано, что введение препарата рибоксина за 15 мин до облучения крыс в дозах 1,0 и 7,78 Гр приводит к повышению метаболической активности клеток и процента жизнеспособных лимфоцитов тимуса в сравнении с результатами при действии только лучевого фактора. Установлено нормализующее влияние рибоксина как на уровень фрагментации хроматина, оцененный по накоплению полидезоксирибонуклеопротеидов, так и на степень межнуклеосомной деградации ДНК в тимocyтах облученных животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: рибоксин, лимфоциты тимуса, рентгеновское облучение.

THE INFLUENCE OF RIBOXINE ON VIABILITY AND METABOLIC ACTIVITY OF THYMUS LYMPHOCYTES UNDER IRRADIATION

T.R. Andriychuk, N.H. Raksha, S.L. Luhova, L.P. Drahan, B.O. Tsudzevych
KYIV NATIONAL UNIVERSITY BY TARAS SHEVCHENKO

Summary

It has been shown that riboxine injection prior to 15 min to rats irradiation in doses 1,0 Gy and 7,78 Gy causes the increase of cell metabolic activity and percentage of viable thymus lymphocytes comparing to the corresponding results obtained only after X-ray exposure. It was identified that the riboxine has the normalizing effect on the level of chromatin degradation which was estimated by accumulation of polydesoxyribonucleo-proteides as well as on the rate of internucleosomal DNA fragmentation in thymocytes of irradiated animals.

KEY WORDS: riboxine, thymus lymphocytes, X-ray irradiation.

Отримано 24.01.2008 р.

Адреса для листування: Н.Г. Ракша, вул. Туполева, 15А, кв. 80, Київ, 01601, Україна.

УДК 615.076.9 582.931.4 54.061/.062

ФІТОХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ВИВЧЕННЯ АДАПТОГЕННОЇ АКТИВНОСТІ ПЛОДІВ І КОРИ SYRINGA VULGARIS L.

**В.С. Кисличенко, В.В. Король, Н.В. Деркач,
Адель Ахмад Халил Абу Юсеф, А.І. Попик**
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

У статті наведено результати фітохімічного аналізу плодів і кори бузку звичайного. Встановлено, що у плодах та корі рослини локалізуються такі групи біологічно активних речовин, як: полісахариди, кумарини, іридоїди, сапоніни, флавоноїди, лігнани, дубильні речовини, органічні й фенолкарбонові кислоти. Проведено кількісне визначення флавоноїдів, фенолкарбонових і органічних кислот, дубильних речовин, аскорбінової кислоти. Визначено основні числові показники і вивчено адаптогенну активність екстрактів плодів і кори рослини. Встановлено, що екстракти кори *Syringa vulgaris* L. мають значно більшу активність, ніж екстракти плодів цієї рослини. Результати дослідження дають можливість запропонувати подальше вивчення екстрактів плодів і кори рослини з метою створення протизапальних, імуностимулювальних і адаптогенних лікарських засобів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: бузок звичайний, біологічно активні речовини, адаптогенна активність.

ВСТУП. Лікарська рослинна сировина є невичерпним джерелом різноманітних біологічно активних сполук. Дослідження культивованих та дикорослих лікарських рослин з метою одержання лікарських засобів адаптогенної дії – актуальне завдання фітохімії на сучасному етапі її розвитку.

Однією з таких рослин є бузок звичайний (*Syringa vulgaris* L.) родини маслинові (*Oleaceae*). Бузок звичайний – дикорослий вид, розповсюджений по всій території України, особливо в гірських районах Криму, Карпат [1]. Рослина знайшла своє застосування як в офіційній, так і народній медицині.

В офіційній медицині використовують кору бузку як сировину для отримання ДСЗ сиригінну (елеутерозиду В), при проведенні стандартизації лікарських препаратів із коренів елеутерококу колючого. Встановлено, що кора бузку відзначається високим вмістом (до 4 %) фенолпропанового глікозиду сиригінну (елеутерозиду В), що значно перевищує вміст даної сполуки в такій відомій за своєю адаптогенною дією рослині, як елеутерокок колючий, – 0,1 %, а це, у свою чергу, дозволяє передбачити значно більшу адаптогенну активність кори бузку, ніж у препаратів з елеутерококу колючого [7]. Крім того, у корі рослини виявлено й інші біологічно активні речовини (БАР), зокрема

© В.С. Кисличенко, В.В. Король, Н.В. Деркач, Адель Ахмад Халил Абу Юсеф, А.І. Попик, 2008.

фенольні сполуки: фенолетаноїди, їх глікозиди (тиразол, салідрозид); О-ацилглікозиди фенолетаноїдів (актеозид); флавоноїди; кумарини; іридоїдний глікозид – ларициризенол [4, 8, 11]. Таким чином, різноманітність хімічного складу бузку звичайного зумовлює різні його лікувальні властивості та вплив на організм людини, що здавна використовують у народній медицині. Відомо, що відвар кори зовнішньо використовують при бешихових запаленнях шкіри, гнійничкових ранах, мастопатії, а також як тонізуючий засіб при лікуванні епілептичної хвороби [2, 9, 10, 12].

Метою даної роботи стало фітохімічне дослідження плодів і кори рослини та вивчення адаптогенної активності кори для розробки аналітичної документації на лікарську сировину і препаратів з неї.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Сировину (кору і плоди) для досліджень заготовлювали у Харківській області у фазу максимального накопичення біологічно активних речовин: кору – навесні під час сокоруху (березень-травень), коли вона легко відділялась від стовбурів і молодих гілок, плоди – восени після досягання (вересень-жовтень).

Для вивчення якісного складу плодів та кори бузку використовували загальноприйнятні якісні реакції. Хроматографічний аналіз плодів і кори бузку проводили за допомогою двовимірної

хроматографії на папері у системі розчинників "бутанол-оцтова кислота-вода у співвідношенні 4:1:2 – I напрямок, 15 % оцтова кислота – II напрямок. Для аналізу використовували водно-спиртові екстракти (1:10) плодів і кори бузку звичайного. Методом паперової хроматографії із застосуванням стандартних зразків було ідентифіковано у корі бузку такі фенолкарбонові кислоти: кавову, ферулову, хлорогенову, в плодах – кавову; органічні кислоти: саліцилову, лимонну, винну й аскорбінову, в плодах – лимонну, винну, аскорбінову. Визначення кількісного вмісту проводили за методиками, що вказані в ДФ СРСР XI видання. Вміст суми фенолкарбонових кислот і флавоноїдів визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 327 і 415 нм відповідно у кюветі з товщиною шару 10 мм. Кількісний вміст аскорбінової кислоти встановлювали титриметричним методом, органічних кислот – алкаліметричним методом, дубильних речовин – перманганатометричним методом за Левенталем.

Дослідження адаптогенної активності проводили на моделі загальної фізичної витривалості. Як модель загальної фізичної витривалості використовували плавання мишей у басейні (10x30x150 см) за методикою G.F. Kiplinger [3]. Попередньо проводили тренінгові запливи, які склалися із 3-х серій експерименту, по 5 запливів у кожній, з перервою на 1 год між ними. Після тренінгових запливів із 50-ти тварин вибрали 20 мишей масою 22,0-25,0 г з однаковими показниками фізичної витривалості.

Для проведення експерименту було сформовано 4 групи по 5 мишей в кожній: 1-ша – контроль; 2-га – тварини, які отримали ЕБ № 1 (екстракт плодів); 3-тя – тварини, які отримали ЕБ № 2 (екстракт кори); 4-та група тварин отримала препарат порівняння – екстракт елеутерококу. Як відомо, ця рослина належить до групи рослинних адаптогенів і в медичній практиці застосовується як рідкий екстракт коренів у 33 % спирті, який містить близько 6 % екстрактивних речовин. Біологічна активність рос-

лини зумовлена високим вмістом різноманітних глікозидів (сирингін, даукостерин, сиринго-резинол). Тому препарати з коренів елеутерококу призначають як стимулювальний і тонізуючий засіб при перевтомленні, після тяжких, виснажливих захворювань [6].

Екстракти експериментальним тваринам вводили перорально в дозі 25 мл/кг маси тіла. Тварини контрольної групи отримували еквівалентну кількість води. Мишей опускали на стартову лінію і фіксували час проходження ними басейну, заповненого водою з температурою 17-19 °С. Через 30 хв після введення препаратів проводили 20 запливів без перерв між ними, не враховуючи час, необхідний для перенесення тварин з фінішної на стартову лінію. Загальну витривалість оцінювали за здатністю препарату знижувати втомленість експериментальних мишей порівняно з контрольними і виражали у відсотках. Результати обчислювали за формулою:

$$AA = 100 - (Te/Tk)100 \%$$

де AA – % зниження втомленості;

Te і Tk – час запливу (час проходження басейну експериментальними тваринами в контрольній (Tk) та експериментальних (Te) групах).

Отримані дані обробляли методом математичної статистики з використанням t-критерію Стьюдента [5].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Нами проведений фітохімічний аналіз і вивчена адаптогенна активність плодів та кори бузку звичайного. За допомогою загальноприйнятих якісних реакцій і хроматографічних методів встановлено, що у плодах та корі рослини локалізуються такі групи БАР: полісахариди, кумарини, іридоїди, сапоніни, флавоноїди, лігнани, дубильні речовини, органічні й фенолкарбонові кислоти. Проведено кількісне визначення флавоноїдів, фенолкарбонових і органічних кислот, дубильних речовин, аскорбінової кислоти (табл. 1). Визначено основні числові показники сировини (табл. 2).

Таблиця 1 – Результати кількісного визначення деяких біологічно активних речовин бузку звичайного

Біологічно активні речовини	Кількісний вміст, %	
	Плоди	Кора
Аскорбінова кислота	0,19±0,0041	1,3±0,0027
Флавоноїди	1,29±0,01	1,26±0,01
Органічні кислоти	12±0,24	9,5±0,22
Фенолкарбонові кислоти	0,8±0,01	2,17±0,02
Дубильні речовини	12±0,24	9,5±0,22

Таблиця 2 – Результати визначення деяких числових показників бузку звичайного

Числові показники	Вміст, %	
	Плоди	Кора
Вологість сировини	7,23±0,003	8±0,018
Екстрактивні речовини	17,06±0,024	18,06±0,024
Загальна зола	2±0,019	5,82±0,002
Зола, не розчинна у 10 % хлористоводневій кислоті	0,18±1,600	1,37±0,027
Сульфатна зола	1,02±0,012	2,01±0,019

У результаті проведення експерименту на адаптогенну активність встановлено, що екстракти бузку (ЕБ) № 1 та 2 проявляють адаптогенну дію, посилюючи фізичну витривалість тварин через 30, 60, 90 хв після введення препарату.

На основі проведеного порівняльного аналізу екстрактів елеутерококу та ЕБ № 1 і 2 можна відзначити, що досліджувані екстракти не поступаються за активністю препарату порівняння. Найбільшу активність проявляють препарати ЕБ № 1 і 2. Їх активність відносно препарату порівняння складає в ЕБ № 1 47,6 % через 30 хв, 62,9 % через 60 хв і 133,9 % через 90 хв; ЕБ № 2 – 87,3 % через 30 хв, 98,3 % через 60 хв і 158,4 % через 90 хв. Результати наведено у таблиці 3.

ВИСНОВКИ. Встановлено якісний склад і кількісний вміст БАР у плодах та корі бузку звичайного. Визначено основні числові показники плодів і кори рослини. Вивчення адаптогенної активності плодів і кори *Syringa vulgaris* L. показало, що досліджувані екстракти проявляють адаптогенну активність, що підвищує витривалість і працездатність мишей, і можуть бути рекомендовані як профілактичний, імуностимулювальний та адаптогенний засіб. Встановлено, що екстракти кори *Syringa vulgaris* L. мають значно більшу адаптогенну активність, ніж екстракти плодів цієї рослини. Проведені дослідження свідчать про багатий, різноманітний хімічний склад кори і плодів бузку звичайного і дають підставу для подальшого вивчення БАР з метою створення лікарських засобів протизапальної та імуностимулювальної дії.

Таблиця 3 – Вплив екстрактів бузку на фізичну витривалість мишей

Об'єкт дослідження	Вихідні дані	% зниження втоми (АА)		
		через 30 хв	через 60 хв	через 90 хв
Контроль	14,2±1,6	12,6±1,4	12,4±1,4	10,6±1,1
ЕБ № 1 (екстракт плодів)	15,6±1,6	18,6±1,9 47,6 %	20,2±1,9 62,9 %	24,8±2,7 133,9 %
ЕБ № 2 (екстракт кори)	16,2±1,8	23,6±2,0 87,3%	24,61±2,3 98,3%	27,41±2,7 158,4 %
Екстракт елеутерококу	16,0±1,7	19,0±1,7 50,7 %	22,4±2,1 80,6 %	27,8±2,9 162,2 %

ЛІТЕРАТУРА

1. Белорусец Е.Ш., Горб В.К. Сирень. – К.: Урожай, 1990. – 176 с.
2. Виноградова Т.А., Гажаев Б.И. Практическая фитотерапия. – М.: ЕКСМО Пресс, С.Пб.: Валери СПД, 2001. – 640 с.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авицена, 2001. – 528 с.
4. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения / Под ред. Г.П. Яковлевой и К.Ф. Блиновой. – С.Пб.: Спец. лит., 1999. – 255 с.
5. Иванова Ю.И., Погорелюк О.Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. – М.: Медицина, 1999. – 240 с.
6. Кириллов О.И. Итоги и перспективы фармакологических исследований *ELEU-TEROCOCCUS SENTICOCUS MAXIM* // Растительные ресурсы. – 2004. – 40, вып. 2. – С. 124-132.
7. Куркин В.А., Акимова Н.Л., Климова И.Ю., Кулямина О.В. Сирень обыкновенная – перспективный источник для получения новых фитопрепаратов. // Человек и Вселенная. – 2005. – № 1. – С. 53-55.
8. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Гриненко Н.А., Золотарев Б.М. Фенольные соединения коры *Syringa vulgaris* // Химия природных соединений. –

1989. – № 4. – С. 581-582.

9. Лекарственные растения: Энциклопедия / Сост. И.Н. Пугырский, В.Н. Прохоров. – 2-е изд., стереотип. – Мн.: Книжный Дом, 2005. – 656 с.

10. Чекман І.С. Клінічна фітотерапія. – К.: Вид-во А.С.К., 2003. – 552 с.

11. Farmakognozya. Podrecznik dla studentow farmacyi / Stanislaw Kohlmunzer. Warszawa. Wydawnetwo Lekarskie PZWL. – 1998. – S. 434-435.

12. Mosyakin S.L., Fedorchuk M.M. Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist / Editor: Sergei L. Mosyakin. – Kiev, 1999. – 345 с.

ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ АДАПТОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПЛОДОВ И КОРЫ SYRINGA VULGARIS L.

**В.С. Кисличенко, В.В. Король, Н.В. Деркач,
Адель Ахмад Халил Абу Юсеф, А.И. Попик**
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

В статье приведены результаты фитохимического анализа плодов и коры сирени обыкновенной. Установлено, что в плодах и коре растения локализуются такие группы биологически активных веществ, как: полисахариды, кумарины, иридоиды, сапонины, флавоноиды, лигнаны, дубильные вещества, органические и фенолкарбоновые кислоты. Проведено количественное определение флавоноидов, фенолкарбоновых и органических кислот, дубильных веществ, аскорбиновой кислоты. Определены основные числовые показатели и изучена адаптогенная активность экстрактов плодов и коры растения. Установлено, что экстракты коры *Syringa vulgaris* L. обладают значительно большей адаптогенной активностью, нежели экстракты плодов этого растения. Результаты исследования дают возможность предложить дальнейшее изучение экстрактов плодов и коры растения с целью создания противовоспалительных, иммуностимулирующих и адаптогенных лекарственных средств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **сирень обыкновенная, биологически активные вещества, адаптогенная активность.**

PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION AND STUDY OF ADAPTOGENIC ACTIVITY OF SYRINGA VULGARIS L. FRUIT AND BARK

**V.S. Kyslychenko, V.V. Korol, N.V. Derkach,
Adel Achmad Halil Abu Yusef, A.I. Popyk**
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

The results of phytochemical analysis of *Syringa vulgaris* fruit and bark have been adduced in the article. It has been established that such groups of biologically active substances as polysaccharides, coumarins, iridoids, saponins, flavonoids, lignans, tannin substances, organic and phenol-carbonic acids are located in the fruit and bark of the plant. A quantitative determination of flavonoids, of phenolcarbonic and organic acids, tannin substances, ascorbic acid has been carried out. The main numerical indicators have been determined and adaptogenic activity of the fruit and bark extracts of the plant has been studied. It has been established that the extracts of *Syringa vulgaris* bark has a bigger adaptogenic activity than the extracts of fruit. The results of investigation give the possibility to suggest further study of fruit and bark of the plant with the aim of creation of anti-inflammatory, immunostimulating and adaptogenic drugs.

KEY WORDS: **Syringa vulgaris L., biologically active substances, adaptogenic activity.**

Отримано 17.03.2008 р.

Адреса для листування: В.С. Кисличенко, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.

УДК 615.243.2.57.089.5.00.5

ПОРУШЕННЯ ВОДНО-ЕЛЕКТРОЛІТНОГО ОБМІНУ ЗА УМОВ ГІПЕРГІДРАТАЦІЇ ОРГАНІЗМУ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ ПРИ БАГАТОРАЗОВОМУ ВВЕДЕННІ КАРБОРЕНУ

О.І. Набока, А.І. Березнякова

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

У роботі представлено дані експериментів з вивчення впливу карборену на функціональний стан нирок при застосуванні різних доз препарату за умов багаторазового його введення. Доведено, що після тривалого введення карборену за умов водного навантаження із зростанням дози спостерігається посилення діурезу за рахунок збільшення швидкості клубочкової фільтрації; не відмічається значних зрушень іоноуретичної функції нирок за рахунок підвищення інтенсивності процесів канальцевої реабсорбції. Встановлено, що більш виражений вплив на діяльність нирок карборен проявляє у дозі 10 мг/кг, при цьому він викликає зростання інтенсивності процесів реабсорбції іонів натрію переважно в проксимальному відділі нефрону.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: функціональний стан нирок, карборен, гіпергідратація, калійурез, натрійурез.

ВСТУП. Діуретики – група лікарських засобів, які найчастіше застосовують в медичній практиці [1, 2, 5, 8, 9]. Тому буде доцільним вивчення дії в організмі нових і маловідомих сечогінних препаратів при одно- та багаторазовому введенні різних доз. Раніше нами досліджено вплив карборену на функціональний стан нирок за умов гіпергідратації організму після одноразового введення різних доз [6].

Метою даної роботи стало вивчення впливу карборену на функціональний стан нирок за умов гіпергідратації організму при застосуванні різних доз після багаторазового введення.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проведено на 6 групах щурів по 9-10 тварин в кожній. Карборен вводили в дозах 3, 5, 7, 10 і 15 мг/кг протягом 7 днів. Через 30 хв після останнього повторного введення карборену щурам у шлунок через зонд вводили питну воду кімнатної температури в об'ємі 5 % від маси тіла [3]. Після об'ємної стимуляції тварин поміщали на 2 год в індивідуальні клітки для збирання сечі, в якій визначали концентрацію креатиніну та основних електролітів. Для визначення аналогічних показників у плазмі крові проводили евтаназію щурів під ефірною анестезією, кров забирали гепаринізованим шприцом і центрифугували при 3000 об./хв протягом 10 хв.

© О.І. Набока, А.І. Березнякова, 2008.

Концентрацію креатиніну (ммоль/л) у плазмі крові визначали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 590 нм за методом Фоліна у модифікації Є.Б. Берхіна [3]. Концентрацію креатиніну в сечі досліджували за методом Фоліна. Концентрацію білка в сечі визначали за методом А.П. Міхеевої, І.А. Богодарової [4]. Вміст іонів натрію, калію в плазмі крові та сечі визначали методом полум'яної фотометрії на ФПЛ-1 [4]. Концентрацію електролітів у біологічних рідинах визначали шляхом порівнювання показників полум'яного фотометра при введенні в розпилювач досліджуваних і стандартних розчинів. За стандартною кривою, яка містила концентрації іонів натрію або калію від 0,1 до 0,5 мекв/л, знаходили вміст досліджуваних іонів і, враховуючи розведення розчинів, проводили відповідні перерахунки.

Досліди на тваринах проводили згідно з Міжнародними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986).

Дані обробляли методами параметричної статистики із застосуванням t-критерію Стьюдента [7].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження проводили після тривалого (протягом 7 днів) застосування карборену. Для виконання експериментів було вибрано дози 3 мг/кг, при

одноразовому введенні якої суттєвого впливу на діяльність нирок не спостерігалось, та 10 мг/кг, при одноразовому використанні якої мали місце найбільш виражені зміни функції нирок. Посилювалось сечовиділення після повторного застосування обох доз препарату. Спостерігалось вірогідне зростання діурезу в 1,4-1,24 раза порівняно з контролем (табл. 1). Зростала також швидкість клубочкової фільтрації: в 1,4 раза ($p < 0,05$) – при використанні дози 3 мг/кг, більш виражено – в 2,4 раза ($p < 0,05$) – після тривалого застосування дози 10 мг/кг.

Концентрація креатиніну в сечі дещо зменшувалась (в 1,3 раза) після введення карборену в дозі 3 мг/кг і суттєво не відрізнялась від даних контролю при використанні більшої дози препарату. Концентрація креатиніну в плазмі крові, навпаки, не зазнавала виражених змін при застосуванні дози 3 мг/кг, в більшій дозі (10 мг/кг) була нижчою даних контролю в 1,7 раза (на 71 %) ($p < 0,05$). Виявлено негативний кореляційний зв'язок між клубочковою фільтрацією та концентрацією креатиніну в плазмі крові при застосуванні карборену в дозі 10 мг/кг ($r = 0,75$; $Sr = 0,30$; $t = 2,55$; $p < 0,05$). Концентраційний індекс ендогенного креатиніну при використанні карборену в дозі 10 мг/кг перевищував аналогічний показник контрольної групи в 1,8 раза (на 84 %) ($p < 0,05$). Аналіз результатів проведених досліджень показав, що посилювалась також реабсорбція води в ниркових каналцях. Якщо в меншій дозі показник відносної реабсорбції води був близьким до даних контролю, то при застосуванні карборену в дозі 10 мг/кг показник вірогідно перевищував значення контролю.

Після багаторазового введення карборену відмічалось зниження концентрації білка в сечі – в 5,0-4,5 раза відповідно до досліджуваних доз, а також його екскреції – в 2,8-4,1 раза. Цей ефект особливо підтверджують стандартизовані на 100 мкл клубочкового фільтрату показники. Порівняно з контролем значення екскреції білка знижувались в 7-10 разів залежно від дози.

Після тривалого введення карборену за умов водного навантаження не спостерігалось суттєвих змін концентрації та екскреції іонів калію із сечею, проте необхідно зазначити наявність незначної тенденції до зростання цих показників незалежно від введених доз препарату.

Результати дослідження впливу карборену на нирковий транспорт іонів натрію наведено в таблиці 2. При тривалому використанні різних доз карборену в іонорегулюючій діяльності нирок також спостерігались певні відмінності. Після тривалого застосування меншої дози препарату (3 мг/кг) мало місце статистично вірогідне підвищення в 1,4 раза концентрації іонів натрію в сечі та в 1,6 раза, порівняно з контролем, екскреції цього іона із сечею. При використанні дози 10 мг/кг концентрація іонів натрію в сечі майже не змінювалась, а його екскреція була дещо вищою ($p < 0,05$) показників контрольної групи щурів. Концентрація іонів натрію в плазмі крові дослідних тварин суттєво не відрізнялась від показників контролю незалежно від дози препарату. Відповідно до рівня клубочкової фільтрації зростала фільтрована фракція іонів натрію: при застосуванні дози 3 мг/кг – на 37 % ($p < 0,05$), дози 10 мг/кг – на 150 % ($p < 0,05$).

Таблиця 1 – Вплив багаторазового (7 днів) введення карборену (мг/кг) на екскреторну функцію нирок у щурів ($\bar{X} \pm Sx$)

Показники	Доза 3 мг/кг		Доза 10 мг/кг	
	Контроль	Карборен	Контроль	Карборен
Діурез, мл/2 год	4,10±0,12	4,69±0,17*	3,26±0,15	4,04±0,22*
Клубочкова фільтрація, мкл/хв/100 г	325,83±29,21	453,81±31,16*	316,00±26,62	745,26±79,35*
Концентрація креатиніну в сечі, ммоль/л	0,11±0,03	0,90±0,03*	1,01±0,06	0,92±0,05
Концентрація креатиніну в плазмі крові, мкмоль/л	77,24±5,38	80,21±4,22	75,01±7,21	43,91±4,34*
Концентраційний індекс ендогенного креатиніну, од	9,50±0,77	11,60±0,63	12,30±1,48	22,69±2,57*
Реабсорбція води, %	88,84±1,00	91,18±0,46	90,51±0,81	95,01±0,58*
Концентрація K ⁺ в сечі, ммоль/л	3,50±0,58	3,80±0,26	6,63±0,97	6,66±0,56
Екскреція K ⁺ , мкмоль/2 год/100 г	14,46±2,54	18,20±1,68	21,60±3,17	27,60±3,43
Концентрація білка в сечі, г/л	0,05±0,01	0,01±0,01*	0,09±0,01	0,02±0,002*
Екскреція білка, мг/2 год/100 г	0,20±0,03	0,07±0,03*	0,29±0,02	0,07±0,01*
Екскреція білка, мг/100 мкл клубочкового фільтрату	0,07±0,02	0,01±0,004*	0,10±0,01	0,01±0,001*

Примітка. Тут і в наступній таблиці: n в групах – 9-10 щурів; * – $p < 0,05$ вірогідно порівняно з контролем.

Таблиця 2 – Вплив багаторазового (7 днів) введення карборену (мг/кг) на нирковий транспорт іонів натрію у щурів ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)

Показники	Доза 3 мг/кг		Доза 10 мг/кг	
	Контроль	Карборен	Контроль	Карборен
Концентрація Na ⁺ в сечі, ммоль/л	0,50±0,04	0,72±0,06*	0,71±0,17	0,66±0,04
Екскреція Na ⁺ , мкмоль/2 год/100 г	2,07±0,21	3,46±0,38*	2,17±0,43	2,66±0,20
Концентрація Na ⁺ в плазмі крові, ммоль/л	130,07±3,74	110,30±2,84	140,00±0,60	147,30±3,36
Фільтрована фракція Na ⁺ , мкмоль/хв	36,18±2,70	49,60±2,84*	44,12±3,74	110,54±16,67*
Екскретована фракція Na ⁺ , мкмоль/хв	0,017±0,002	0,029±0,003*	0,018±0,004	0,02±0,002
Реабсорбована фракція Na ⁺ , мкмоль/хв	36,14±2,70	49,56±2,84*	44,11±3,74	110,52±16,67*
Дистальний транспорт Na ⁺ , мкмоль/2 год	460,52±18,96	511,16±15,11	453,76±21,70	592,50±35,59*
Проксимальний транспорт Na ⁺ , мкмоль/2 год	3,89±0,32	5,45±0,33*	4,85±0,45	12,67±1,51*
Кліренс вільної від Na ⁺ води, мл/2 год	4,08±0,12	4,67±0,17*	3,25±0,15	4,03±0,22
Екскреція Na ⁺ , мкмоль/100 мкл клубочкового фільтрату	0,67±0,06	0,77±0,06	0,71±0,12	0,41±0,05
Проксимальний транспорт Na ⁺ , мкмоль/100 мкл клубочкового фільтрату	10,03±0,30	10,05±0,27	12,64±0,11	14,00±0,37
Дистальний транспорт Na ⁺ , мкмоль/100 мкл клубочкового фільтрату	1,28±0,14	0,97±0,06	1,32±0,11	0,72±0,08*

Залежність між рівнями клубочкової фільтрації та фільтрованої фракції натрію при застосуванні карборену в дозі 10 мг/кг підтверджує позитивний кореляційний зв'язок ($r=0,89$; $Sr=0,16$; $t=5,40$; $p<0,05$). Екскретована фракція іонів натрію при застосуванні дози 3 мг/кг була вірогідно вищою контролю (в 1,7 раза, $p<0,05$), незважаючи на посилення інтенсивності процесів реабсорбції цього іона (в 1,37 раза, $p<0,05$) за рахунок зростання в основному проксимального транспорту (в 1,4 раза, $p<0,05$). Стандартизовані на 100 мкл клубочкового фільтрату показники транспорту іонів натрію не виявили суттєвих відмінностей порівняно з контрольною групою тварин. Проте за тривалого застосування більшої дози (10 мг/кг) препарату екскретована фракція іонів натрію була близькою до даних контролю. Одночасно з підсиленням фільтрації зростала, як і слід очікувати, реабсорбція іонів натрію (в 2,5 раза, $p<0,05$), що підтверджувалося наявністю прямого кореляційного зв'язку між клубочковою фільтрацією та реабсорбованою фракцією натрію ($r=0,89$; $Sr=0,16$; $t=5,40$; $p<0,05$). Причому при застосуванні дози 10 мг/кг мало місце підвищення інтенсивності як проксимального (в 2,6 раза), так і дистального (в 1,3 раза) транспорту іонів натрію. При перерахунку на 100 мкл клубочкового фільтрату спостерігалось

зниження екскреції іонів натрію та дистальної його реабсорбції (в 1,8 раза, $p<0,05$). Переважне зростання проксимального транспорту (на 11 %) під впливом карборену підтверджено стандартизованими показниками (на 100 мкл клубочкового фільтрату) реабсорбції іонів натрію в цьому відділі нефрону. Також виявлено позитивний кореляційний зв'язок між реабсорбованою фракцією іонів натрію та його проксимальним транспортом ($r=0,89$; $Sr=0,17$; $t=5,13$; $p<0,05$). При використанні карборену в досліджуваних дозах мало місце зростання кліренсу безнатрієвої води на 14-24 %.

ВИСНОВКИ. 1. Після тривалого введення карборену за умов водного навантаження із зростанням дози спостерігається посилення діурезу за рахунок збільшення швидкості клубочкової фільтрації.

2. Під впливом карборену за умов багаторазового введення не відмічається значних зрушень іоноуретичної функції нирок за рахунок підвищення інтенсивності процесів канальцевої реабсорбції.

3. Більш виражений вплив на діяльність нирок карборен проявляє у дозі 10 мг/кг, при цьому він викликає зростання інтенсивності процесів реабсорбції іонів натрію переважно в проксимальному відділі нефрону.

ЛІТЕРАТУРА

1. Березняков И.Г. Диуретики как антигипертензивные средства // Провизор. – 2000. – № 22. – С. 42-44.

2. Березняков И.Г., Черных В.Ф., Черных В.П. и др. Гипертоническая болезнь. – Харьков: Магистр Валентина, 1995. – 325 с.

3. Берхин Е.Б., Иванов Ю.И. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена. – М.: Медицина, 1972. – 198 с.

4. Магальяс В.М., Михеев А.О., Роговий Ю.Є. Сучасні методики експериментальних та клінічних досліджень центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії: Навч.-метод. посіб. – Чернівці: БДМА, 2001. – 42 с.

5. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. – 14-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: ООО "Издательство Новая Волна", 2002. – Т. 1. – С. 82-86.

6. Набока О.І., Березнякова А.І. Функціональний стан нирок за умов гіпергідратації організму після

одноразового введення різних доз карборену // Мед. хімія. – 2008. – 10, № 1 – С. 106-108.

7. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. – М.: Медицина, 2000. – С. 117-320.

8. Joffly S., Rosner M.N. Natriuretic peptides in ESPD // Amer. J. of Kidney Diseases. – 2005. – 46, №.1. – P. 1-10.

9. Rejnmark L., Vestergaard P., Pedersen A.R. et al. Dose-effect relations of loop- and thiazide-diuretics on calcium homeostasis: A randomized, double-blinded Latin-square multiple cross-over study in postmenopausal osteopenic women // Eur. J. Clin. Invest. – 2003. – 33, № 1. – P. 41–50.

НАРУШЕНИЯ ВОДНО-ЭЛЕКТРОЛИТНОГО ОБМЕНА В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГИДРАТАЦИИ ОРГАНИЗМА И ИХ КОРРЕКЦИЯ ПРИ МНОГОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ КАРБОРЕНА

О.И. Набока, А.И. Березнякова

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

В работе представлены данные экспериментов по изучению влияния карборена на функциональное состояние почек при применении разных доз препарата в условиях многократного его введения. Доказано, что после продолжительного введения карборена в условиях водной нагрузки с возрастанием дозы наблюдается усиление диуреза за счет увеличения скорости клубочковой фильтрации; не отмечается значительных сдвигов ионоуретической функции почек за счет возрастания интенсивности процессов канальцевой реабсорбции. Установлено, что более выраженное влияние на деятельность почек карборен проявляет в дозе 10 мг/кг, при этом он вызывает повышение интенсивности процессов реабсорбции ионов натрия преимущественно в проксимальном отделе нефрона.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: функциональное состояние почек, карборен, гипергидратация, калийурез, натрийурез.

VIOLATIONS OF AQUA-ELECTROLYTIC EXCHANGE UNDER CONDITIONS OF ORGANISM HYPERHYDRATATION AND THEIR CORRECTION AT MULTIPLE INTRODUCTION OF KARBOREN

O.I. Naboka, A.I. Bereznyakova

NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

The work presents the data of experimental study of karboren influence on functional condition of kidneys after multiple introduction of different doses of karboren. It has been proved that after prolonged introduction of karboren under conditions of water loading with the increase of dose occurs the intensity of diuresis due to growing of filtration speed; significant shifts of ion-uretic function of kidneys owing to increase of intensity of canal reabsorption processes. It has been revealed that karboren has more marked influence on kidney functioning in a dose 10 mg/kg causing the increase of intensity of sodium ions reabsorption processes mainly in proximal segmtn of nephron.

KEY WORDS: functional condition of kidneys, karboren, hyperhydratation, potassium uresis, sodium uresis.

Отримано 26.09.2008 р.

Адреса для листування: О.І. Набока, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, Харків, 61002, Україна.

АСОЦІАЦІЯ СЕРЕДНЬОГО ОБ'ЄМУ ТРОМБОЦИТІВ З РІВНЕМ ГОМОЦИСТЕЇНУ ТА ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ В КРОВІ ЩУРІВ З ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЄЮ

Н.В. Заїчко

УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НДІ РЕАБІЛІТАЦІЇ ІНВАЛІДІВ, ВІННИЦЯ

Досліджено зв'язок середнього об'єму тромбоцитів (MPV) з рівнем гомоцистеїну, гідроген сульфїду, активністю нуклеотидаз та агрегацією тромбоцитів у щурів з гіпергомоцистеїнемією (ГГЦ). Встановлено, що у тварин з ГГЦ збільшується MPV, посилюється ADP-індукована агрегація тромбоцитів, знижується рівень гідроген сульфїду, зменшується активність апірази в сироватці крові. MPV прямо корелює з рівнем гомоцистеїну та ступенем агрегації тромбоцитів і обернено – з рівнем гідроген сульфїду в сироватці крові.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: середній об'єм тромбоцитів, гомоцистеїн, гідроген сульфід, апіраза.

ВСТУП. Гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ) є відомим фактором ризику виникнення артеріальних та венозних тромбозів [20]. Серед механізмів протромбогенної дії гомоцистеїну (ГЦ) обговорюється його здатність активувати тромбоцити за рахунок посилення синтезу тромбоксанів та гальмування продукування оксиду азоту [11, 14]. Відомо, що функціональна активність тромбоцитів визначається їхньою здатністю реагувати на сигнальні молекули нуклеотидного походження і значною мірою залежить від швидкості перетворення індуктора агрегації ADP на антиагрегант аденозин, що забезпечується ектонуклеотидазами ендотеліальних та тромбоцитарних клітин і нуклеотидазами плазми крові – АТР-дифосфогідролазою (апіразою) та 5'-нуклеотидазою [5]. ГЦ зменшує активність екто-ADP-ази ендотеліальних клітин в культурі тканини, що потенціює дію ADP на тромбоцити [9]. Нами було показано, що ГЦ дозозалежно посилює ADP-індуковану агрегацію тромбоцитів *in vitro* [1]. Зауважимо, що всі вказані механізми дії ГЦ на тромбоцити реалізуються в кров'яному руслі. Разом із тим, питання щодо участі ГЦ у формуванні гіперреактивності кров'яних пластинок на етапі тромбоцитопоезу не з'ясовано. Також певну зацікавленість викликає вплив на функціональний стан тромбоцитів метаболіту ГЦ – гідроген сульфїду, який має вазодилатуючий ефект і є синергістом оксиду азоту [19].

© Н.В. Заїчко, 2008.

Одним із показників морфофункціонального стану тромбоцитів, який детермінується на етапі утворення в кістковому мозку і не змінюється у період їх циркуляції в крові, є середній об'єм (MPV) [2, 18]. Вважається, що великі тромбоцити мають більші адгезивно-агрегаційні властивості, що зумовлено високим вмістом біологічно активних речовин у щільних гранулах. Збільшення MPV асоціюється з ішемічною хворобою серця і розцінюється як предиктор тяжкого перебігу захворювання [17].

Метою даної роботи було визначити зв'язок MPV з рівнем ГЦ, гідроген сульфїду, активністю нуклеотидаз (апірази та 5'-нуклеотидази) в сироватці крові й показниками агрегації тромбоцитів у щурів з ГГЦ.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 36 білих безпородних щурах з індивідуальною масою 250-270 г, які перебували на стандартному раціоні віварію з водним режимом *ad libitum* та 12-годинним світловим режимом день/ніч.

ГГЦ викликали у 18 щурів (9 самців) шляхом інтрагастрального введення впродовж 14 днів тіолактону DL-гомоцистеїну (Fluka, Німеччина) з розрахунку 200 мг/кг маси тіла у вигляді водного розчину [16]. Контрольну групу склали 18 інтактних щурів (9 самців). При проведенні експерименту дотримувались правил гуманного ставлення до експериментальних тварин, затверджених комітетом з біоетики Вінницького на-

ціонального медичного університету ім. М.І. Пирогова, а також рекомендацій Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Hemostasis [8].

Кров для дослідження отримували з каудальної порожнистої вени після анестезування щурів кетаміном (100 мг/кг інтраперитонеально). З метою проведення гематологічних досліджень 1 мл крові поміщали в стандартні пластикові пробірки з K₂EDTA (1,5 мг на 1 мл крові), аналіз виконували на гематологічному аналізаторі Erma PCE-210 (Японія). Для оцінки стану тромбоцитарної ланки системи гемостазу реєстрували такі показники: середній об'єм тромбоцитів (MPV, фл), ширину розподілу тромбоцитів по об'єму (PDW, %) та тромбокрит (PCT, %).

Для дослідження агрегації тромбоцитів кров набирали в пластикові пробірки з 3,8 % розчином лимоннокислого натрію у співвідношенні 9:1. Збагачену тромбоцитами плазму (ПЗТ) отримували шляхом центрифугування стабілізованої крові при 300 г упродовж 5 хв при 18-22 °С, бідну на тромбоцити плазму (ПБТ) одержували, центрифугуючи ПЗТ при 1500 г упродовж 20 хв. Процес агрегації тромбоцитів індукували, додаючи до ПЗТ ADP ("Технологія-Стандарт", Росія) в кінцевій концентрації 2,5 мкМ, і реєстрували його на фотооптичному агрегометрі AP2110 ("Солар", Білорусь) протягом 10 хв. Визначали ступінь агрегації – максимальний рівень світлопропускання ПЗТ після внесення індуктора агрегації (за 100 % взято рівень світлопропускання ПБТ); швидкість агрегації – зміну світлопропускання ПЗТ після внесення індуктора за перші 30 с; час агрегації – час досягнення максимального ступеня агрегації.

Рівень ГЦ в сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням комерційного набору фірми "Axis-Shield" (Англія). Вміст сульфідів у сироватці крові – спектрофотометричним методом [4, 6].

Активність 5'-нуклеотидази (КФ 3.1.3.5) та АТФ-дифосфогідролази (КФ 3.6.1.5) в сироватці крові визначали за кількістю неорганічного фосфату, який утворився при гідролізі АМР та АДР [7, 10].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартних статистичних програм "MS Excel XP". Вірогідність відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як свідчать результати наших досліджень, інтрагастральне введення тіолактону ГЦ упродовж 14 днів викликало істотне підвищення рівня ГЦ в сироватці крові – з (5,46±0,61) в контролі до (27,5±3,34) мкмоль/л (p<0,001). Оскільки оновлення кров'яних пластинок відбувається кожні 8-10 днів [2], обраний нами термін спостереження дозволяє виявити вплив ГЦ на формування нової генерації тромбоцитів.

Було виявлено, що MPV у щурів контрольної групи коливався від 6,4 до 7,7 фл і в середньому становив (7,00±0,11) фл. Разом із тим, у тварин, які отримували тіолактон ГЦ, мало місце збільшення розмірів тромбоцитів: MPV реєструвався в межах 7,2-9,8 фл і в середньому складав (8,26±0,20) фл, що перевищувало MPV в контролі на 18 % (p<0,05).

У щурів з ГГЦ достовірно збільшувався тромбокрит (PCT) – з (0,306±0,012) до (0,355±0,013) % (p<0,05) та на рівні тенденції зменшувався показник розподілу тромбоцитів за об'ємом (PDW), при цьому середня кількість тромбоцитів у щурів контрольної групи і тварин з ГГЦ була практично однаковою (440,6±18,6 та 433,8±18,5·10⁹/л відповідно). Такі зміни PCT та PDW опосередковано підтверджують збільшення розмірів кров'яних пластинок у щурів з ГГЦ. У цілому збільшення MPV при ГГЦ зумовило зростання маси тромбоцитів, що циркулюють у крові (MPV x кількість тромбоцитів), порівняно з контролем (рис. 1).

Рівень гідроген сульфідів у сироватці крові здорових щурів коливався від 4,2 до 15,1 мкг/мл і в середньому склав (8,33±0,80) мкг/мл. У тварин з ГГЦ спостерігалось зниження вмісту гідроген сульфідів майже вдвічі порівняно з контролем, і в середньому цей показник становив (4,20±0,30) мкг/мл (p<0,05). Як свідчать результати оцінки активності нуклеотидаз в сироватці крові (табл. 1), у щурів з ГГЦ достовірно знижувалась (на 34,7 %) активність

Таблиця 1 – Активність 5'-нуклеотидази та апірази в сироватці крові й показники ADP-індукованої агрегації тромбоцитів у щурів з ГГЦ (M±m)

Показники	Контроль (n=18)	ГГЦ (n=18)
5'-нуклеотидаза, нмоль/хв/мл	6,62±0,51	5,80±0,32
Апіраза, нмоль/хв/мл	8,17±1,04	5,33±0,46*
Ступінь агрегації, %	39,3±0,95	45,8±1,45*
Час агрегації, с	379,5±9,89	384,6±10,5
Швидкість агрегації, % за 1 хв	31,6±0,83	38,0±1,03*

Примітка. * – p<0,05 відносно контролю.

апірази порівняно з контролем, тоді як активність 5'-нуклеотидази змінювалась менше.

За цих умов у щурів з ГГЦ відмічали збільшення ступеня та початкової швидкості ADP-індукованої агрегації тромбоцитів (на 16,5 та 20,2 % відповідно) порівняно з контролем (див. табл. 1; рис. 2).

Кореляційний аналіз виявив, що рівень ГЦ прямо корелював з MPV ($r=0,58$) та ступенем агрегації тромбоцитів ($r=0,54$) і обернено з рівнем гідроген сульфід ($r=-0,61$) та активністю апірази в сироватці крові ($r=-0,32$) (рис. 3). Між MPV та ступенем агрегації тромбоцитів також спостерігався прямий кореляційний зв'язок ($r=0,60$), що підтверджує більшу функціональну активність тромбоцитів великих розмірів. Разом із тим, гідроген сульфід обернено корелював з MPV ($r=-0,52$) та ступенем агрегації тромбоцитів ($r=-0,38$). Таким чином, ГЦ та гідроген сульфід мають протилежний вплив на процес агрегації тромбоцитів та MPV (див. рис. 3).

Отже, нами вперше було встановлено, що за умов ГГЦ відбувається формування популяції тромбоцитів, яка характеризується більшим MPV та гіперагрегабельністю. Оскільки тромбоцити є без'ядерними клітинами і практично позбавлені здатності синтезувати білки *de novo*, їх гемокоагуляційний потенціал визначається під час тромбоцитопоезу [2, 15]. Це підтверджується наявністю зв'язку між вмістом ДНК в мегакаріоцитах та чинниками, які визначають адгезивно-агрегаційні властивості тромбоцитів, – розміром, гранулярністю та експресією адгезивної молекули GP IIIa [15]. Доведено, що у хворих на гіпертонічну хворобу та в осіб з гіперхолестеринемією підвищення вмісту ДНК в мегакаріоцитах асоціюється зі збільшенням розмірів та гіперреактивністю тромбоцитів [12, 13].

Цілком зрозуміло, що зміни MPV, індуковані введенням тіолактону ГЦ упродовж 14 днів, свідчать про реалізацію протромбогенної дії ГГЦ ще під час тромбоцитопоезу. Ймовірно

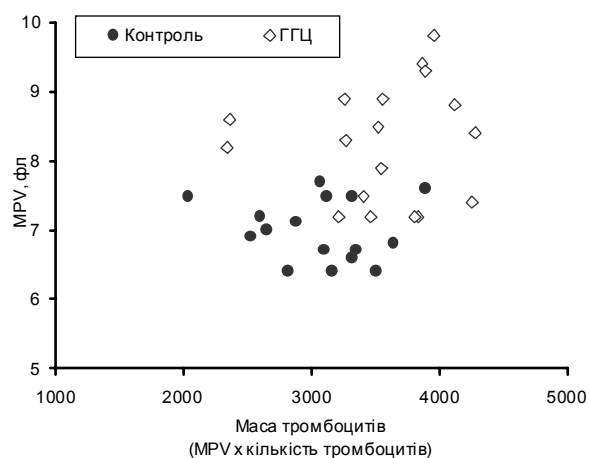


Рис. 1. Порівнювання середнього об'єму тромбоцитів (MPV) та їх маси у здорових щурів і тварин з ГГЦ.

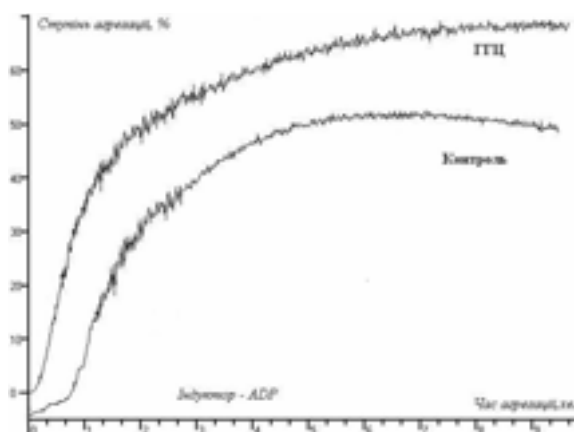


Рис. 2. Агрегатограма здорового щура (контроль) порівняно з агрегатограмою тварини з ГГЦ (індуктор агрегації – 2,5 мкМ ADP).

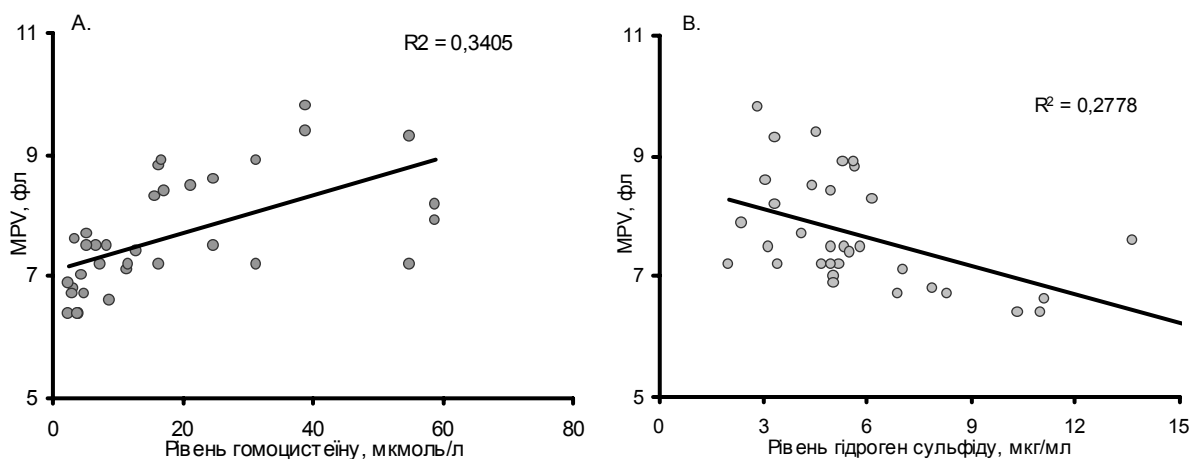


Рис. 3. Кореляційні зв'язки між середнім об'ємом тромбоцитів (MPV) та рівнем гомоцистеїну (А) і гідроген сульфід (В) в сироватці крові щурів.

механізми впливу ГЦ на мегакаріоцити, як і на інші клітини, очевидно, пов'язані з порушенням процесів метилування нуклеїнових кислот та біосинтезу білків, модуляцією тіолдисульфідного обміну, гомоцистеїнуванням білків [3].

Інший аспект проагрегантного ефекту високих рівнів ГЦ реалізується через зменшення ендогенної продукції гідроген сульфїду, який, за останніми даними, здатний пригнічувати агрегацію тромбоцитів *in vitro* [21]. Посиленню активаційних процесів у тромбоцитах також сприяє зниження активності апірази в сироватці крові, що збільшує тривалість існування в циркуляторному руслі ADP – індуктора агрегації тромбоцитів, чутливість до дії якого за умов ГЦ підвищується, при цьому сповільнюється і утворення аденозину – потужного вазодилатора та антиагреганта [1, 5]. Отже, в цілісному організмі проагрегантний ефект ГЦ реалізується на рівні кісткового мозку, де зумовлює появу тромбоцитів з гіперреактивним фенотипом, та в циркуляторному руслі, де він посилює активаційні процеси у сфор-

мованих клітинах за рахунок потенціювання ADP-стимуляції та зменшення вмісту вазоактивних молекул з антиагрегантними властивостями – аденозину та гідроген сульфїду. Однак механізми впливу високих рівнів ГЦ на формування кров'яних пластинок в кістковому мозку та на синтез гідроген сульфїду потребують подальшого вивчення.

ВИСНОВКИ. 1. У щурів з ГЦ збільшується середній об'єм тромбоцитів (на 18 %), зростає ступінь та швидкість ADP-індукованої агрегації тромбоцитів (на 16,5 та 20,2 %). MPV прямо корелює з рівнем ГЦ в сироватці крові та ступенем агрегації тромбоцитів.

2. Підвищення вмісту ГЦ в сироватці крові супроводжується зниженням вмісту гідроген сульфїду та зменшенням активності апірази в сироватці крові, що є підґрунтям для посилення процесу агрегації тромбоцитів за умов ГЦ. Вміст гідроген сульфїду в сироватці крові обернено корелює з рівнем ГЦ, MPV та ступенем ADP-індукованої агрегації тромбоцитів, активність апірази в сироватці крові також обернено корелює з рівнем ГЦ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Заїчко Н.В., Пентюк О.О. Вплив тіольних сполук та їх дисульфідних форм на агрегацію тромбоцитів людини // *Мед. хімія.* – 2006. – **8**, № 3. – С. 45-47.
2. Исследование системы крови в клинической практике / Под ред. Г.И. Козинца, В.А. Макарова. – М.: Триада-Х, 1997. – 480 с.
3. Пентюк О.О., Луцюк М.Б., Андрушко І.І., Постовітенко К.П. Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології // *Укр. біохім. журн.* – 2003. – **75**, № 1. – С.5-17.
4. Уильямс У.Дж. Определение анионов: Справочник: Пер. с англ. – М.: Химия, 1982. – 624 с.
5. Birk A.V., Broekman M.J., Gladek E.M. et al. Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity // *J. Lab. Clin. Med.* – 2002. – **140**, № 3. – P. 166-175.
6. Dombkowski R., Russell M., Olson K. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* – 2004. – **286**. – P. 678-685.
7. Frassetto S., Renato D., Sarkis J.E. Characterization of an ATP diphosphohydrolase activity (Apyrase, EC 3.6.1.5) in rat blood platelets // *Molecular and Cellular Biochemistry.* – 1993. – **129**. – P. 47-55.
8. Giles A.R. Guidelines for the use of animals in biomedical research // *Thromb. Haemost.* – 1987. – **58**. – P. 1078-1084.
9. Harpel P.C., Zhang X., Borth W. Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis // *J. Nutr.* – 1996. – **126**, № 4 – P. 1285-1289.
10. Kawashima Y., Nagasawa T., Ninomiya H. Contribution of ecto-5'-nucleotidase to the inhibition of platelet aggregation by human endothelial cells // *Blood.* – 2000. – **96**, № 6. – P. 2157-2162.
11. Li J., Zhang Y., Yao X. et al. Effect of homocysteine on the L-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in human platelets // *Heart Vessels.* – 2002. – **16**, № 2. – P. 46-50.
12. Pathansali R., Smith N., Bath P. Altered megakaryocyte-platelet haemostatic axis in hypercholesterolaemia // *Platelets.* – 2001. – **12**, № 5. – P. 292-297.
13. Pathansali R., Smith N., Bath P. Prothrombotic megakaryocyte and platelet changes in hypertension are reversed following treatment: a pilot study // *Platelets.* – 2001. – **12**, № 3. – P. 144-149.
14. Signorello M.G., Pascale R., Leoncini G. Effect of homocysteine on arachidonic acid release in human platelets // *Eur. J. Clin. Invest.* – 2002. – **32**, № 4. – P. 279-284.
15. Smith N.M., Pathansali R., Bath P.M. Platelets and stroke // *Vasc. Med.* – 1999. – **4**, № 3. – P. 165-172.
16. Stangl G.I., Weisse K., Dinger C. et al.

Homocysteine thiolactone-induced hyperhomocysteinemia does not alter concentrations of cholesterol and SREBP-2 target gene mRNAs in rats // *Exp. Biol. Med (Maywood)*. – 2007. – **232**, № 1. – P. 81-87.

17. Tavit Y., Sena N., Yazicia H.U. et al. Mean platelet volume in patients with metabolic syndrome and its relationship with coronary artery disease // *Thrombosis Research*. – 2007. – **120**, № 2. – P. 245-250.

18. Thompson C.B., Love D.G., Quinn P.G., Valeri C.R. Platelet size does not correlate with platelet

age // *Blood*. – 1983. – **62**, № 2. – P. 487-494.

19. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? // *FASEB*. – 2002. – **16**. – P. 1792-1798.

20. Willemin W.A., Solenthaler M. Hyperhomocysteinemia: a risk factor for arterial and venous thrombosis // *Vasa*. – 1999. – **28**, № 3. – P. 151-155.

21. Zagli G., Patacchini R., Trevisani M. et al. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation // *Eur. J. Pharmacol.* – 2007. – **559**, № 1. – P. 65-68.

АССОЦИАЦИЯ СРЕДНЕГО ОБЪЕМА ТРОМБОЦИТОВ С УРОВНЕМ ГОМОЦИСТЕИНА И ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА В КРОВИ КРЫС С ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ

Н.В. Заичко

УКРАИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НИИ РЕАБИЛИТАЦИИ ИНВАЛИДОВ, ВИННИЦА

Резюме

Исследована связь среднего объема тромбоцитов (MPV) с уровнем гомоцистеина, гидроген сульфида, активностью нуклеотидаз и агрегацией тромбоцитов у крыс с гипергомоцистеинемией (ГГЦ). Установлено, что у животных с ГГЦ увеличивается MPV, усиливается ADP-индуцированная агрегация тромбоцитов, снижается уровень гидроген сульфида, уменьшается активность апиразы в сыворотке крови. MPV прямо коррелирует с уровнем гомоцистеина и степенью агрегации тромбоцитов и обратно – с уровнем гидроген сульфида в сыворотке крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **средний объем тромбоцитов, гомоцистеин, гидроген сульфид, апираза.**

ASSOCIATION BETWEEN MEAN PLATELET VOLUME AND BLOOD LEVEL OF HOMOCYSTEINE AND HYDROGEN SULFIDE IN RATS WITH HYPERHOMOCYSTEINEMIA

N.V. Zaichko

UKRAINIAN STATE SCIENTIFIC RESEARCH INSTITUTE OF INVALID REHABILITATION, VINNYTSIA

Summary

The relationship between mean platelet volume (MPV) and plasma homocysteine level, hydrogen sulfide level, activity of plasma nucleotidases and platelet aggregation in the rats with hyperhomocysteinemia (HHC) was investigated. It was established that MPV was elevated, ADP-induced platelet aggregation was increased, plasma hydrogen sulfide level and plasma apyrase activity in blood plasma were decreased in the animals with HHC. MPV correlated directly with plasma homocysteine level, the degree of platelet aggregation, and inversely – with plasma hydrogen sulfide level.

KEY WORDS: **mean platelet volume, homocysteine, hydrogen sulfide, apyrase.**

Отримано 22.01.2008 р.

Адреса для листування: Н.В. Заічко, Український державний НДІ реабілітації інвалідів, Вінниця, 210018, Україна.

УДК 547-304.9-32-304.2

СИНТЕЗ НОВИХ АМІНОВМІСНИХ ПОХІДНИХ НА ОСНОВІ ХЛОРИСТОГО ЦІАНУРУ

С.В. Половкович, О.Б. Миколів, Н.Г. Марінцова, Л.Р. Журахівська,
І.І. Губицька, Л.Д. Болібрух, В.П. Новіков
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ "ЛЬВІВСЬКА ПОЛІТЕХНІКА"

Досліджено перебіг реакцій заміщення атомів хлору 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазину різними аміновмісними замісниками. Розроблено зручні та ефективні препаративні методи синтезу моно-, ди- і тризаміщених похідних 1,3,5-триазину.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хлористий ціанур, 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазин.

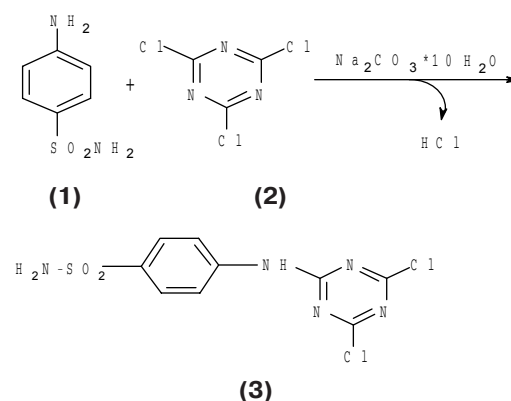
ВСТУП. В останні роки особливий інтерес викликає одержання лікарських препаратів поліфункціональної дії шляхом поетапного включення замісників з різним спектром властивостей. Розробка ефективних і зручних методів синтезу гетероциклічних амінопохідних і подальша їх модифікація є перспективним напрямком пошуку нових фізіологічно активних речовин. У науковому співтоваристві добре помітна зацікавленість класом гетероциклічних сполук, зокрема похідними 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазину. Серед триазинів відомі сполуки з високою гербіцидною, фунгіцидною та інсектицидною діями [4]. Сульфаніламід – це речовини, які проявляють протимікробну дію. Амінокислоти, як відомо, широко використовують в медичній практиці, що пояснюється їх здатністю брати участь в синтезі необхідних для нормальної життєдіяльності речовин: білків, ферментів, гормонів тощо. Отже, модифікація триазинового циклу фармакофорними угрупованнями має важливе значення як з теоретичної, так і з практичної точок зору.

Метою роботи була розробка зручних і ефективних препаративних методик синтезу моно-, ди- і тризаміщених похідних 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазину.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У ціанурхлориді всі атоми хлору рівноцінні. Однак при заміщенні одного атома хлору замісником активність інших атомів хлору зменшується [2].

© С.В. Половкович, О.Б. Миколів, Н.Г. Марінцова, Л.Р. Журахівська, І.І. Губицька, Л.Д. Болібрух, В.П. Новіков, 2008.

Першим етапом даної роботи було заміщення атома хлору в ціанурхлориді стрептоцидом. Синтез проводили в ацетон-водному середовищі при температурі $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Реакція відбувалася за такою схемою:

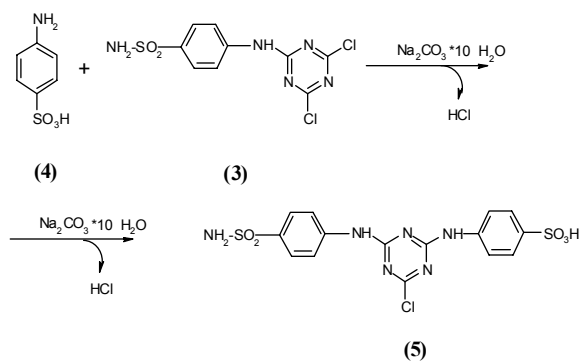


Утворена сполука – 4-(4,6-дихлоро-(1,3,5)-триазин-2-іламіно)-бензолсульфонамід – не розчиняється у воді й ацетоні.

Склад і будова продукту підтверджені даними ІЧ-електроскопії.

Наступним етапом роботи було досягнення розчинності утвореної сполуки у воді за рахунок введення в триазин замісника з гідрофільними властивостями. Таким замісником обрали сульфанілову кислоту, яка містить вільну аміногрупу, здатну до ацилювання 4-(4,6-дихлоро-(1,3,5)-триазин-2-іламіно)-бензолсульфонамідом. Продукт дизаміщення одержували у водному середовищі при температурі $50\text{--}60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Взаємодія 4-(4,6-дихлоро-(1,3,5)-триазин-2-іламіно)-бензолсульфонамідом із сульфаніловою кислотою відбувалася за такою схемою:



Одержаний продукт – кристали світло-бежевого кольору – добре розчиняються у воді.

Склад і будова продукту підтверджені даними ІЧ-спектроскопії.

Наступним етапом роботи було одержання тризаміщених похідних 2,4,6-трихлоро-1,3,5-триазину. Для заміщення третього атома хлору взяли ряд амінокислот: метіонін, аргінін, норлейцин, тирозин, фенілаланін. Вибір амінокислот як замісників для модифікації 2,4,6-трихлоро-1,3,5-триазину був оснований на високій біологічній активності амінокислотних похідних. Третій атом хлору в 2,4,6-трихлоро-1,3,5-триазині заміщається дуже важко. Заміщення двох атомів хлору замісниками знижує активність третього атома хлору, тому реакцію одержання тризаміщених похідних 2,4,6-трихлоро-1,3,5-триазину проводили у диметилформаміді при температурі 120-130 °С за присутності органічної основи – піридину.

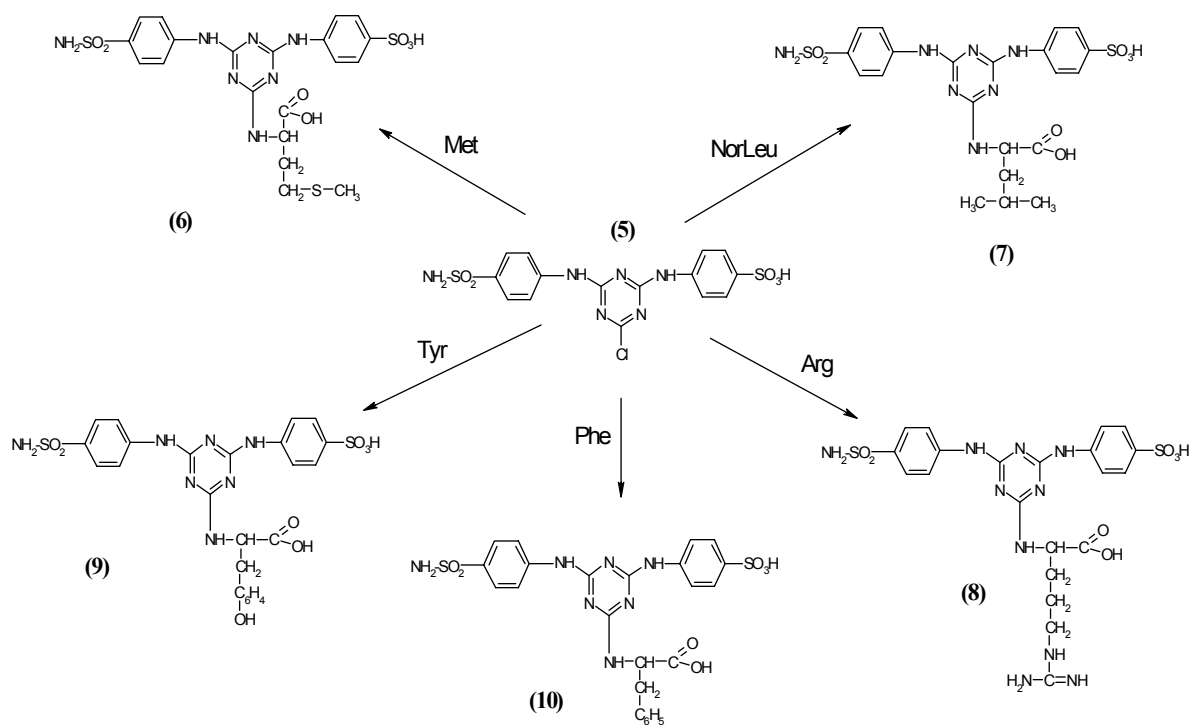
РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Було знято спектри вихідних речовин і продукту. ІЧ-спектри знімали на спектрофотометрі SPECORD M-80 в таблетках з KBr. Діапазон спектра – 4000-400 см⁻¹. Контроль за ходом реакції та індивідуальністю речовин проводили методом тонкошарової хроматографії на пластинках "Silufol UV-254" і "Merk Kieselgel 60 F254". При визначенні температури топлення сполук поправку на виступаючий стовпчик ртуті не проводили. Розчинники сушили та очищували методами, наведеними у літературі [1, 3].

4-(4,6-дихлоро-(1,3,5)-триазин-2-іламіно)-бензолсульфонамід

До 0,538 г (0,003 моль) стрептоциду в 30 мл ацетону при температурі -5 °С і перемішуванні додавали 0,577 г (0,003 моль) ціанурхлориду в 20 мл ацетону. Реакцію проводили при температурі -5-0 °С і постійному перемішуванні. Соляну кислоту, яка виділялась в ході реакції, зв'язували 10 % розчином соди. рН середовища підтримували в межах близько 6,5-7. Тривалість реакції – приблизно 4 год. Реакцію вважали завершеною, якщо значення рН=7 залишалось сталим і не змінювалось, що свідчило про припинення виділення HCl. Такі умови було підібрано для запобігання гідролізу ціанурхлориду. Утворений осад відфільтровували і промивали водою.

Одержаний продукт – кристали білого кольору, m=0,614 г (61,4 %). Температура його топлення T=185 °С. Отримана сполука – 4-(4,6-

Схема синтезу тризаміщених амінокислотних похідних 1,3,5-триазину



дихлоро-(1,3,5)-триазин-2-іламіно)-бензолсульфонамід не розчиняється у воді.

ІЧ (KBr, cm^{-1}): 1400-1420, 900-1120, 800-820, 700-720 ($=\text{C}-\text{N}=\text{}$), 830-850, 1250, 1270, 1300 (C-Cl), 1616-1632, 3310-3350 (N-H), 1118-1126, 1310-1320 (SO_2NH_2).

4-(4-хлоро-6-(4-сульфамойл-феніламіно)-(1,3,5)-триазин-2-іламіно)-бензолсульфо кислота

До 0,378 г (0,0022 моль) сульфаноїлової кислоти в 100 мл води при температурі 55 °С і постійному перемішуванні додавали 0,7 г (0,0022 моль) 4-(4,6-дихлоро-(1,3,5)-триазин-2-іламіно)-бензолсульфонамід. Реакцію проводили при температурі 45-55 °С і постійному перемішуванні. Соляну кислоту, яка виділялась в ході реакції, зв'язували 10 % розчином соди. рН середовища підтримували в межах близько 6,5-7. Тривалість реакції – приблизно 10 год. Реакцію вважали завершеною, якщо значення рН=7 залишалось сталим і не змінювалось, що свідчило про припинення виділення HCl. Реакційну суміш відфільтровували від залишку непрореагованого 4-(4,6-дихлоро-(1,3,5)-триазин-2-іламіно)-бензолсульфонамід. Одержаний фільтрат нагрівали до 60 °С і при перемішуванні додавали 25 г NaCl, суміш витримували 1 год при перемішуванні й температурі 55-60 °С, далі припиняли нагрівання і при перемішуванні охолоджували суміш до 20 °С. Висолений осад відфільтровували.

Одержаний продукт – 4-(4-хлоро-6-(4-сульфамойл-феніламіно)-(1,3,5)-триазин-2-іламіно)-бензолсульфо кислота – кристали світло-бежевого кольору, $m=0,571$ г (57,1 %). Температура його топлення $T=270$ °С.

ІЧ (KBr, cm^{-1}): 1400-1420, 900-1120, 800-820, 700-720 ($=\text{C}-\text{N}=\text{}$), 830-850, 1250, 1270, 1300 (C-Cl), 1616-1632, 3310-3350 (N-H), 1118-1126, 1310-1320 (SO_2NH_2), 1040-1050 (SO_3H).

4-метилсульфаніл-2-(4-(4-сульфофеніламіно)-1,3,5-триазин-2-іламіно)-бутилова кислота

До 0,802 г (0,0017 моль) 4-(4-хлоро-6-(4-сульфамойл-феніламіно)-(1,3,5)-триазин-2-іламіно)-бензолсульфо кислоти в 100 мл води при температурі 70 °С і постійному перемішуванні додавали 0,262 г (0,0017 моль) амінокислоти метіоніну. Реакцію проводили при температурі 110-120 °С і постійному перемішуванні. Соляну кислоту, яка виділялась в ході реакції, зв'язували 10 % розчином соди. рН середовища підтримували в межах близько 6,5-7. Тривалість реакції – приблизно 10 год. Реакцію вважали завершеною, якщо значення рН=7 залишалось сталим і не змінювалось, що свідчило про припинення виділення HCl. Реакцію проводили за присутності органічної основи – піридину. Реакційну суміш охоло-

джували до кімнатної температури, відфільтровували кристали продукту 4-метилсульфаніл-2-(4-(4-сульфамойл-феніламіно)-6-(4-сульфофеніламіно)-1,3,5-триазин-2-іламіно)-бутилової кислоти. Одержаний осад розчиняли у воді, відфільтровували від залишків непрореагованих вихідних речовин. Отриманий фільтрат нагрівали до 60 °С і при перемішуванні додавали 100 г NaCl, суміш витримували 1 год при перемішуванні й температурі 55-60 °С, далі припиняли нагрівання і при перемішуванні охолоджували суміш до 20 °С. Висолений осад відфільтровували. Одержаний продукт – 4-метилсульфаніл-2-(4-(4-сульфамойл-феніламіно)-6-(4-сульфофеніламіно)-1,3,5-триазин-2-іламіно)-бутилова кислота – кристали темно-коричневого кольору, $m=0,571$ г (57,1 %).

ІЧ (KBr, cm^{-1}): 1400-1420, 900-1120, 800-820, 700-720 ($=\text{C}-\text{N}=\text{}$), 1616-1632, 3310-3350 (N-H), 1118-1126, 1310-1320 (SO_2NH_2), 1040-1050 (SO_3H), 1550-1610, 1300-1420 (COOH).

Із застосуванням даної методики за аналогією було одержано такі амінокислотні похідні 1,3,5-триазину:

1. 4-метил-2-(4-(4-сульфамойл-феніламіно)-6-(4-сульфофеніламіно)-(1,3,5)триазин-2-іламіно)-пентанова кислота, $m=0,610$ г (61,0 %).

ІЧ (KBr, cm^{-1}): 1400-1420, 900-1120, 800-820, 700-720 ($=\text{C}-\text{N}=\text{}$), 1616-1632, 3310-3350 (N-H), 1110-1126, 1310-1320 (SO_2NH_2), 1040-1050 (SO_3H), 1550-1610, 1300-1400 (COOH), 1145-1170 (-C-C-).

2. 3-(4-гідроксифеніл)-2-(4-(4-сульфамойл-феніламіно)-6-(4-сульфофеніламіно)-(1,3,5)триазин-2-іламіно)-пропіонова кислота, $m=0,480$ г (48,0 %).

ІЧ (KBr, cm^{-1}): 1400-1420, 900-1120, 800-820, 700-720 ($=\text{C}-\text{N}=\text{}$), 1610-1632, 3310-3350 (N-H), 1115-1126, 1310-1320 (SO_2NH_2), 1040-1050 (SO_3H), 1550-1610, 1300-1420 (COOH), 3610-3620 (-OH), 1500-1600, 3000-3030 (-Ar).

3. 3-феніл-2-(4-(4-сульфамойл-феніламіно)-6-(4-сульфофеніламіно)-(1,3,5)триазин-2-іламіно)-пропіонова кислота, $m=0,510$ г (51,0 %).

ІЧ (KBr, cm^{-1}): 1400-1420, 900-1120, 800-820, 700-720 ($=\text{C}-\text{N}=\text{}$), 1610-1632, 3310-3350 (N-H), 1115-1126, 1310-1320 (SO_2NH_2), 1040-1050 (SO_3H), 1550-1610, 1300-1420 (COOH), 1500-1600, 3000-3030 (-Ar).

4. 5-гуанідин-2-(4-(4-сульфамойл-феніламіно)-6-(4-сульфофеніламіно)-(1,3,5)триазин-2-іламіно)-пентанова кислота, $m=0,590$ г (59,0 %).

ІЧ (KBr, cm^{-1}): 1400-1420, 900-1120, 800-820, 700-720 ($=\text{C}-\text{N}=\text{}$), 1600-1632, 3310-3340 (N-H), 1120-1126, 1310-1320 (SO_2NH_2), 1040-1050 (SO_3H), 1550-1610, 1300-1420 (COOH), 2130-2140 (-C=N-).

Таблиця 1 – Фізико-хімічні властивості синтезованих речовин

№ з/п	№ сполуки в тексті	Вихід, %	Т пл., °С	Знайдено, %				Формула	Обчислено, %			
				С	Н	N	Cl		С	Н	N	Cl
1	3	61,4	185	29,8	0,25	19,5	19,6	C ₉ H ₇ N ₅ O ₂ SCl ₂	30,0	0,27	19,4	19,7
2	5	89,1	270	39,3	2,4	21,1	7,3	C ₁₅ H ₁₃ N ₆ O ₅ S ₂ Cl	39,4	2,8	21,4	7,7
3	6	57,1	276	42,2	4,1	17,3	–	C ₂₀ H ₂₃ N ₇ O ₇ S ₃	42,0	4,0	17,2	–
4	7	61,0	284	46,7	4,4	15,5	–	C ₂₁ H ₂₅ N ₇ O ₇ S ₂	46,9	4,6	15,6	–
5	8	59,0	267	43,2	4,3	21,5	–	C ₂₁ H ₂₆ N ₁₀ O ₇ S ₂	43,4	4,4	21,7	–
6	9	48,0	310	43,1	4,3	19,3	–	C ₂₄ H ₂₃ N ₇ O ₈ S ₂	43,4	4,6	19,7	–
7	10	51,0	232	53,3	4,2	18,0	–	C ₂₄ H ₂₃ N ₇ O ₇ S ₂	53,5	4,4	18,2	–

ВИСНОВКИ. 1. Досліджено перебіг реакцій заміщення атомів хлору різними аміновмісними замісниками.

2. Розроблено зручні й ефективні препаративні методики синтезу моно-, ди- і тризаміщених похідних 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазину.

3. Досліджено модифікацію триазинового циклу фармакофорними угрупованнями, що

містять різноманітні біологічно активні фрагменти, що дає можливість здійснити цілеспрямований синтез нових біологічно активних сполук.

4. Попередній скринінг, виконаний за допомогою програми комп'ютерного прогнозування біологічної активності PASS, показав доцільність проведення досліджень в даному напрямку.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гетероциклические соединения / Под ред. Н.К. Кочеткова. – М.: Издательство, 1961. – 5. – 209 с.
2. Келарев В.И., Кошелев В.Н., Белов Н.В. и др. Синтез и свойства производных сим-триазина // Химия гетероциклических соединений. – 1994. – № 2. – С. 240-243.

3. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 1982. – 583 с.

4. Мельников Н.Н. Пестициды. Химия, технология, применение. – М.: Химия, 1987. – 711 с.

СИНТЕЗ НОВЫХ АМИНОСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ОСНОВЕ ХЛОРИСТОГО ЦИАНУРА

С.В. Половкович, О.Б. Миколив, Н.Г. Маринцова, Л.Р. Жураховская, И.И. Губицкая, Л.Д. Болибрух, В.П. Новиков
НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ "ЛЬВОВСКАЯ ПОЛИТЕХНИКА"

Резюме

Исследовано протекание реакций замещения атомов хлора 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазина разными аминокислотными заместителями. Разработаны удобные и эффективные препаративные методы синтеза моно-, ди- и тризамещенных производных 1,3,5-триазина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хлористый цианур, 2,4,6-трихлор-1,3,5-триазин.

SYNTHESIS OF NEW AMINO-CONTAINING DERIVATIVES ON THE BASIS OF CYANUR CHLORIDE

S.V. Polovkovych, O.B. Mykoliv, N.H. Marintsova, L.R. Zhurakhivska, I.I. Hubytska, L.D. Bolibrukh, V.P. Novikov
NATIONAL UNIVERSITY "LVIV POLYTECHNIKA"

Summary

Passing of reactions of substitution of chlorine atoms of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine by different amino-containing derivatives was investigated. Comfortable and effective preparative methods of synthesis of mono-, di-, three-substituted derivatives of 1,3,5-triazine were developed.

KEY WORDS: cyanur chloride, 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine.

Отримано 17.03.2008 р.

Адреса для листування: С.В. Половкович, Національний університет "Львівська політехніка", вул. С. Бандери, 12, Львів, 79013, Україна.

ФІТОХІМІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ГІСОПУ ЛІКАРСЬКОГО З МЕТОЮ ВИКОРИСТАННЯ У ФАРМАЦІЇ

М.І. Шанайда, І.А. Лемішка, О.В. Лукієнко¹

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ¹, ХАРКІВ

Вивчено кількісний вміст та компонентний склад ефірної олії трави *Hyssopus officinalis* L., з'ясовано її вплив на мікроорганізми. Встановлено, що в складі ефірної олії домінують ізопінокамфон, пінокамфон, β -пінен і β -феландрен. У траві *Hyssopus officinalis* ідентифіковано також ряд фенолокіслот.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: *Hyssopus officinalis*, ефірна олія, фенолокіслоти.

ВСТУП. Гісоп лікарський (*Hyssopus officinalis* L.) – ефіроолійна рослина родини *Lamiaceae*, яка походить з Південної Європи. В Україні гісоп лікарський культивують здавна, проте в офіційній медицині рослину не застосовують [5, 10]. У медичній практиці зарубіжних країн траву гісопу лікарського використовують переважно у складі комплексних фітопрепаратів протизапальної, відхаркувальної дій [7, 8, 12]. Основною групою біологічно активних речовин гісопу лікарського є ефірна олія, компонентний склад та антимікробну дію якої вивчено лише частково [6, 7, 8, 12]. Літературні дані стосовно вмісту фенолокіслот у сировині гісопу лікарського на сьогодні відсутні, незважаючи на те, що вказані сполуки відіграють істотну роль у складі ряду галенових фітопрепаратів.

Мета цієї роботи – здійснити фітохімічне дослідження ефірної олії та фенолокіслот трави гісопу лікарського, вирощеного в умовах Тернопільської області, та вивчити вплив його ефірної олії на мікроорганізми.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Сировину – надземну частину гісопу лікарського – заготовляли у період масового цвітіння 3-4-річних рослин на ділянках ботанічного саду Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського в 2005-2007 рр. Ефірну олію отримано з висушеної надземної частини рослини шляхом перегонки з водяною парою методом 4 відповідно до ДФ XI [1]. Хромато-мас-спектрометричний аналіз зразків ефірних олій здійснено на газовому хроматографі Agilent Technologies 6890 N.

© М.І. Шанайда, І.А. Лемішка, О.В. Лукієнко, 2008.

Вміст фенолокіслот визначали методом високоефективної рідинної хроматографії на хроматографі Agilent Technologies 1100 при довжині хвиль 256 і 313 нм. Елюювання проводили 0,4 % водним розчином трифтороцтової кислоти та метанолом.

Біологічну активність ефірної олії визначали методом дії її серійних розведень на індикаторні тест-штами мікроорганізмів: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* та *Candida albicans* [2].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Встановлено, що в умовах Тернопільської області трава гісопу лікарського у період цвітіння накопичує 1,05 % ефірної олії (в перерахунку на абсолютно суху сировину). На основі органолептичного аналізу отриманої ефірної олії з'ясовано, що вона є легкокорухливою рідиною світло-жовтого кольору з дещо різким запахом та пекучо-пряним смаком. Фізико-хімічні показники ефірної олії такі: показник заломлення (n^{20}) – 1,473, показник обертання (λ_D^{20}) – $-5,9^\circ$, питома вага (ρ_{20}) – 0,924, кислотне число (мг КОН/г) – 2,6, ефірне число (мг КОН/г) – 32,1.

На основі проведеного хромато-мас-спектрометричного аналізу ефірної олії *H. officinalis* нами вперше виявлено 31 компонент (табл. 1, рис. 1). Як видно з таблиці 1, основними компонентами ефірної олії гісопу лікарського є ізопінокамфон (34,260 %), пінокамфон (16,950 %), β -пінен (13,572 %) і β -феландрен (5,703%), які належать до групи монотерпеноїдів. Серед виявлених сесквітерпеноїдів домінує гермакрен D (2,960 %), а серед ароматичних сполук – метилхавікол (1,260 %).

Ізопінокамфон – основний компонент ефірної олії *H. officinalis* – належить до кисневмісних біциклічних монотерпеноїдів із вираженою відхаркувальною дією [12]. Ймовірно, ця сполука надає ефірній олії гісопу також специфічного пекучо-пряного смаку.

Згідно з літературними відомостями [5], у траві гісопу лікарського може накопичуватись близько 70 % ізопінокамфону та до 12 % сесквітерпеноїдів, що значно більше, ніж у досліджуваній нами сировині (див. табл. 1). За даними [8], основними компонентами ефірної олії гісопу лікарського є ізопінокамфон і міртенол. Разом із тим, нами в ефірній олії гісопу лі-

карського виявлено лише 2,66 % міртенолу. Подібні до цих розбіжності компонентного складу ефірних олій рослин, за даними різних авторів [5, 9, 11], значною мірою зумовлені різним географічним місцезнаходженням та умовами місцезростання виду, а також залежать від погодних умов у період вегетації. К.Х. Ходжиматов та Н.В. Рамазанова [9] так само відмітили, що накопичення ефірної олії в траві гісопу лікарського залежить від віку рослин.

Для з'ясування можливості застосування ефірної олії *H. officinalis* у медичній практиці виникла необхідність вивчення її біологічної активності [6, 12, 13] в умовах *in vitro*.

Таблиця 1 – Компонентний склад ефірної олії гісопу лікарського

№	Компонент	Час утримання, с	Вміст компонента в ефірній олії, %	№	Компонент	Час утримання, с	Вміст компонента в ефірній олії, %
1	α -туйон	409	0,293	17	ізопінокамфон	1017	34,260
2	α -пінен	422	0,970	18	терпінен-4-ол	1050	0,241
3	сабінен	504	2,044	19	міртенол	1067	2,661
4	-пінен	513	13,572	20	метилхавікол	1070	1,260
5	1-октен-3-ол	518	0,231	21	пулегон	1175	0,697
6	мірцен	549	1,965	22	тимол	1322	0,366
7	α -терпінен	599	0,220	23	міртенілацетат	1401	1,085
8	β -феландрен	630	5,703	24	β -бурбонен	1550	0,797
9	1,8-цинеол	634	0,442	25	метилевгенол	1607	0,329
10	оцимен	677	0,431	26	каріофілен	1635	0,472
11	терпінолен	776	0,328	27	аромадендрен	1737	0,575
12	ліналоол	814	1,031	28	гермакрен D	1789	2,960
13	α -туйон	821	0,318	29	біциклогерма-крен	1825	0,706
14	пінокарвеол	914	0,255	30	елемол	1953	0,567
15	пінокамфон	973	16,964	31	спатунеол	2017	0,587
16	пінокарвон	978	7,540				

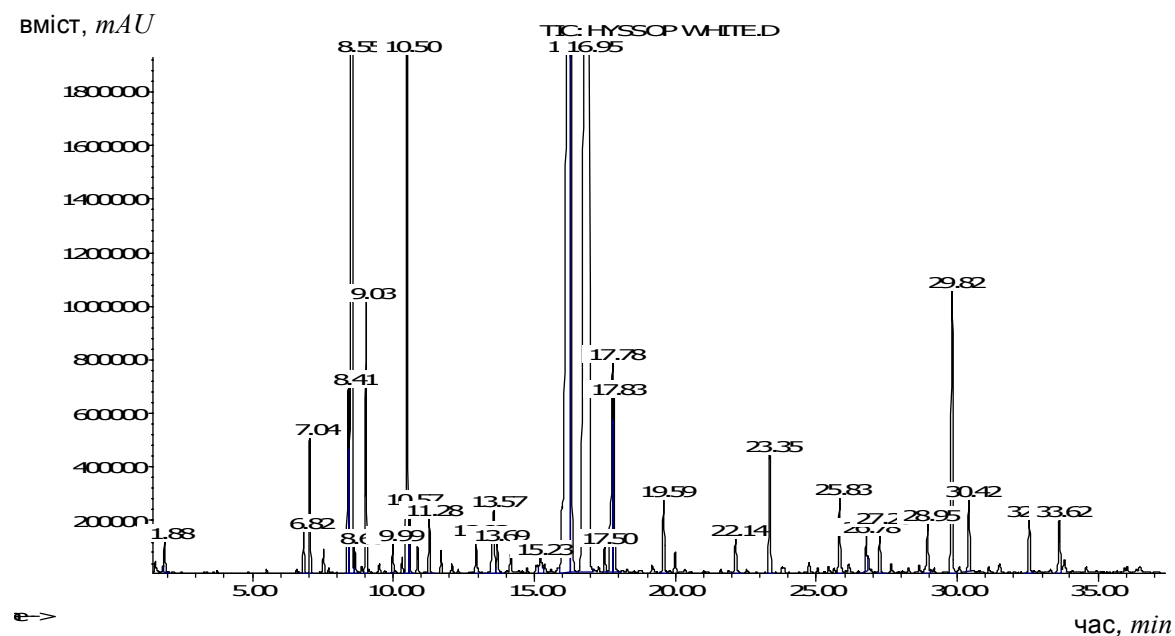
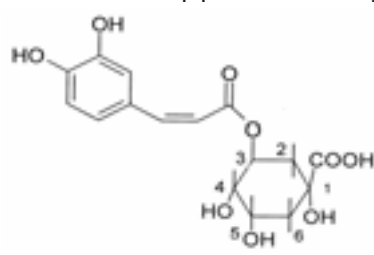


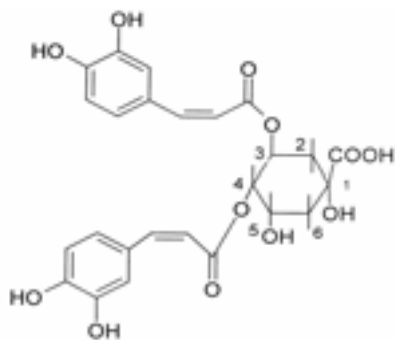
Рис. 1. Хроматограма ефірної олії трави гісопу лікарського.

Проведене дослідження впливу ефірної олії гісопу лікарського на мікроорганізми в умовах *in vitro* дозволило встановити таке: в усіх випробуваних серійних розведеннях (спочатку у співвідношенні 1:10, а далі в дворазових розведеннях – 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 та 1:160) вона проявляла бактерицидну активність стосовно *Staphylococcus aureus* та фунгіцидну – стосовно *Candida albicans*. Що стосується *Escherichia coli*, то деяка бактериостатична дія спостерігалась лише при розведенні 1:10. Антибактеріальну дію ефірної олії гісопу лікарського щодо *Vacillus subtilis* не виявлено у жодному із випробуваних розведень.

Вважаємо, що отримані дані стосовно біологічної активності ефірної олії гісопу лікарського



Хлорогенова кислота



Ізохлорогенова кислота

потребують подальших експериментальних досліджень. При цьому, крім ефірної олії, дослідження біологічного впливу заслуговують також водні та спиртові екстракти трави рослини, які здавна використовують у народній медицині [5, 7].

На сьогодні практично не вивченими є фенольні сполуки гісопу лікарського [8, 10], оскільки основна увага науковців була приділена ефірній олії рослини. У траві гісопу лікарського нами вперше ідентифіковано ряд фенолокіслот, зокрема: 455,24 мг/кг кавової кислоти, 470,82 мг/кг хлорогенової (псевдодепсид кавової кислоти) та 4504,52 мг/кг ізохлорогенової (тридепсид кавової кислоти) кислот.

Згідно з найновішими літературними даними [3, 4], наявність у сировині кавової кислоти та її похідних зумовлює імуностимулювальну, адаптогенну, гепатопротекторну, ноотропну дії лікарських засобів з рослин. Вказані фармакологічні властивості фенолокіслот, на нашу думку, варто дослідити і стосовно гісопу лікарського.

ВИСНОВКИ. 1. Вперше в умовах Тернопільської області досліджено вміст та компонентний склад ефірної олії гісопу лікарського і вивчено її антимікробну й антифунгальну активність.

2. У траві гісопу лікарського вперше встановлено вміст кавової кислоти та її похідних. Отримані дані можуть бути використані в хемотаксономії представників родини *Lamiaceae*.

3. У перспективі вважаємо за доцільне продовжити фітохімічне дослідження та вивчення біологічної активності надземної частини гісопу лікарського.

ЛІТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
2. Дикий И.Л., Сидорчук И.И., Хопуляк И.Ю. Микробиология: Руководство к лабораторным занятиям. – К.: Професионал, 2004. – 594 с.
3. Ковальов В.М., Павлій О.І., Ісакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин / За ред. В.М. Ковальова. – Харків: Вид-во НФАУ, 2000. – 703 с.
4. Куркин В.А., Дубищев А.В., Ежков В.Н. и др. Ноотропная активность некоторых фитопрепаратов и фенилпропаноидов // Растит. ресурсы. – 2007. – 43, вып. 2. – С. 76-83.

5. Либусь О.К., Работягов В.Д., Кутько С.П., Хлыпенко Л.А. Эфирномасличные и пряноароматические растения. – Херсон: Айлант, 2004. – 272 с.
6. Николаевский В.В., Еременко А.Е., Иванов И.К. Биологическая активность эфирных масел. – М.: Медицина, 1987. – 144 с.
7. Палов М. Энциклопедия лекарственных растений: Пер. с нем. / Предисловие И.А. Губанова. – М.: Мир, 1998. – С. 145-146.
8. Растительные ресурсы России и сопредельных государств. – С.Пб., 1996. – С. 297.
9. Ходжиматов К.Х., Рамазанова Н. Некоторые биологические особенности, динамика содержания и состав эфирного масла *иссопа лекарственного*,

выращиваемого в Ташкентской области // Растит. ресурсы. – 1975. – 11, вып 2. – С. 238-242.

10. Шанайда М.І. Перспективи використання лікарських рослин родини *Lamiaceae* Juss. в офіційній і народній медицині // Мед. хімія. – 2006. – 8, № 1. – С. 84-88.

11. Hegnauer R. Chemotaxonomie der Pflanzen. Band. 4 (*Daphniphyllaceae–Lythraceae*). – Birkhauser, Verlag, Basel und Stuttgart, 1966. – S. 289-346.

12. Knobloch K., Pauli A., Iberl B. et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components // J. Essential Oil Res. – 1989. – № 1. – P. 119-128.

13. Nemeth E., Bernath J., Varga E., Franke R. Variability of essential oil content of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) // Abstract 31st International symposium on essential oils (Hamburg, Germany, 10-13 September 2000). – Hamburg, 2000. – P. 19.

ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИССОПА ЛЕКАРСТВЕННОГО С ЦЕЛЮ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ФАРМАЦИИ

М.И. Шанайда, И.А. Лемишка, О.В. Лукиенко¹

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ¹, ХАРЬКОВ

Резюме

Изучено количественное содержание и компонентный состав эфирного масла травы *Hyssopus officinalis* L., выяснено его влияние на микроорганизмы. Установлено, что в составе эфирного масла доминируют изопинокамфон, пинокамфон, β -пинен и β -феландрен. В траве *Hyssopus officinalis* идентифицировано также ряд фенолокислот.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Hyssopus officinalis*, эфирное масло, фенолокислоты.

PHYTOCHEMICAL STUDY OF HYSSOP WITH THE PURPOSE OF USE IN PHARMACY

M.I. Shanayda, I.A. Lemishka, O.V. Lukiyenko¹

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY¹, KHARKIV

Summary

The quantitative content and component composition of essential oil and antimicrobial activity of *Hyssopus officinalis* L. was investigated, its influence on microorganisms was revealed. It was set that in composition of essential oil prevail isopinocampone, pinocampone, β -pinene and β -phellandrene. Contents of the number of phenolic acids was identified in *Hyssopus officinalis* grass too.

KEY WORDS: *Hyssopus officinalis*, essential oil, phenolic acids.

Отримано 20.02.2008 р.

Адреса для листування: М.І. Шанайда, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, м.Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ СУБСТАНЦІЙ, ОТРИМАНИХ З НАСІННЯ ВИНОГРАДУ РІЗНИХ СОРТІВ

Л.М. Вороніна¹, А.Л. Загайко¹, Г.Б. Кравченко¹, С.В. Заїка¹, Ю.О. Огай²
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ¹, ХАРКІВ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ВИНОГРАДУ І ВИНА "МАГАРАЧ"², ЯЛТА

У роботі досліджено вплив профілактичного введення поліфенольних екстрактів, отриманих з насіння винограду різних сортів, на розвиток негативних наслідків нейрогенного стресу при іммобілізації тварин. Показано, що іммобілізаційний емоційно-больовий стрес у піддослідних щурів супроводжується характерними змінами метаболізму, що спрямовані на постачання джерел енергії та активацію енергетичного обміну. Ці зміни свідчать про активацію катаболічних процесів у клітинах та посилення виділення кінцевих продуктів азотистого обміну. За цих умов профілактичне застосування екстрактів винограду значно полегшувало перебіг стрес-реакції, що проявлялось зниженням інтенсивності катаболічних процесів та проявів цитолізу. Проведені дослідження дозволяють зробити висновок про значну стрес-протекторну та мембраностабілізуювальну активність, загалом порівнювану для усіх досліджуваних екстрактів, незалежно від сорту винограду, що робить дані екстракти цінним об'єктом для подальших досліджень з метою впровадження в медичну практику.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: насіння винограду, поліфеноли, стрес, метаболізм білків.

ВСТУП. З безлічі проатерогенних за своїми можливими наслідками факторів, що ушкоджують, першорядне значення мають ті, з якими найчастіше стикається людина у своїй повсякденній і виробничій діяльності, – сильні або постійні перегрівання, холод, фізична і нервова перенапруга, гіподинамія, інтоксикації, голод, спрага, гравітація, шум, вібрація та ін. [8]. Під впливом різних інтенсивних чи незнайомих організму впливів розвивається неспецифічна реакція організму – стрес. Перенасиченість життя сучасної людини стресорними ситуаціями підвищує інтерес дослідників до гострого впливу на організм стрес-факторів.

Роль стресу як фактора етіології та патогенезу атеросклерозу, виразкових уражень слизової оболонки шлунка і дванадцятипалої кишки, порушень функцій серця, печінки, вторинних імунодефіцитних станів, онкологічних захворювань на даний час доведена численними дослідженнями [7, 8].

Перші дослідження фармакологічних властивостей поліфенолів винограду були проведені в кінці ХХ століття й показали, що вони здатні підвищувати антиоксидантний потенціал плазми крові *in vitro* та значно переважають α -токоферол за ступенем гальму-

© Л.М. Вороніна, А.Л. Загайко, Г.Б. Кравченко, С.В. Заїка, Ю.О. Огай, 2008.

вання окиснення ліпопротеїнів низької густини. При цьому протекторний ефект має дозозалежний характер [1, 2].

Тому вивчення і цілеспрямоване використання лікувально-профілактичної активності продуктів переробки винограду різних сортів може бути перспективним.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували безпородних щурів-самців масою 180-220 г, яких утримували у віварії Національного фармацевтичного університету. Тваринам протягом 15 днів щодня перорально вводили поліфенольні екстракти насіння винограду сортів "Каберне", "Мерло", "Ркацителі" та "Рислінг", що містять близько 25 г поліфенолів у літрі та отримані в Національному інституті винограду і вина "Магарач", у заздалегідь підібраних ефективних дозах (в перерахунку на поліфеноли – 9 мг на 100 г маси тіла). Щурам контрольної групи вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину. Емоційно-больовий стрес викликали іммобілізацією на череві протягом 3 год [7]. Тварин декапітували через 3 год після іммобілізації. Усі маніпуляції зі щурами проводили під хлоралозо-уретановим наркозом. Дослідження проводили відповідно до національних "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах" (Україна, 2001), які

узгоджуються з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985).

Кров збирали для одержання сироватки. Вміст сечовини визначали за кольоровою реакцією з діацетилмоноксимом (набір реактивів фірми "Felicit", Україна), креатиніну – за методом Яффе-Поппера (набір реактивів фірми "Реагент", Україна) [5, 6]. Для визначення активності аланінамінотрансферази (АлАт) та аспартатамінотрансферази (АсАт) використовували уніфікований динітрофенілгидразинний метод, запропонований S. Reitman та S. Frenkel (1957) [4, 5], активності гаммаглутаміл-транспептидази (ГГТП) – тест-набори фірми "Felicit" (Україна) [3]. Вміст сечовини визначали за кольоровою реакцією з діацетилмоноксимом (тест-набори фірми "Felicit", Україна), сечової кислоти – за реакцією з фосфорновольфрамним реактивом (набір реактивів фірми "Реагент", Україна), загального білка – за методом Лоурі в модифікації Міллера.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як видно з отриманих нами даних (табл. 1), іммобілізаційний емоційно-больовий стрес у піддослідних щурів супроводжувався характерними змінами метаболізму, що спрямовані на постачання джерел енергії та активацію енергетичного обміну. Так, рівень сечовини в сироватці крові зростав на 31 %, концентрація сечової кислоти підвищувалась на 88 %, а вміст креатиніну збільшувався на 54 % порівняно з інтактними тваринами. Ці зміни свідчать про актива-

цію катаболічних процесів у клітинах та посилення утилізації кінцевих продуктів азотистого обміну.

Разом із тим, нейрогенний стрес, викликаний іммобілізацією щурів, супроводжувався, очевидно, і активацією цитолізу через вільнорадикальне пошкодження мембран. Це призводило до надходження ферментів у кров та спричиняло гіперферментемію: активність трансаміназ зростала (АлАт – на 46 %, АсАт – на 88 %) порівняно з інтактними тваринами, таку ж тенденцію проявляла активність ГГТП (підвищувалась на 93 %).

За цих умов профілактичне застосування екстрактів винограду значно полегшувало перебіг стрес-реакції, що проявлялось зниженням інтенсивності катаболічних процесів та проявів цитолізу (див. табл. 1).

Так, введення тваринам екстракту насіння (винограду сорту "Каберне" нормалізувало рівень сечовини та активність вивчених ферментів у сироватці й зменшувало гіперурикемію та гіперкреатинінемію (рівень сечової кислоти був на 22 %, а креатиніну – на 26 % нижчим, ніж у контрольних стресованих щурів). Екстракт насіння винограду сорту "Мерло" також нормалізував вміст сечовини та активність АлАт і ГГТП, знижував рівень креатиніну (на 74 %) та сечової кислоти (на 75 %) порівняно з контрольними тваринами.

Екстракти насіння винограду сортів "Ркацителі" та "Рислінг" нормалізували вміст креатиніну, а рівень сечовини за їх впливу зменшувався навіть нижче інтактних показників. Останнє спостереження дозволяє припустити, що останні екстракти можуть надавати певної анаболічної дії за умов нашого експерименту.

Таблиця 1 – Вплив профілактичного введення екстрактів насіння винограду на вміст продуктів та активність ферментів азотистого обміну в сироватці крові щурів при іммобілізаційному стресі ($M \pm m$, $n=7$)

Показники	Групи					
	Інтакт	Контроль (стрес)	Стрес+ "Каберне"	Стрес+ "Мерло"	Стрес+ "Ркацителі"	Стрес+ "Рислінг"
Сечовина, ммоль/л	7,25±0,61	9,53±0,57*	7,32±0,55**	6,95±0,47**	4,77±0,49***	4,35±0,38***
Креатинін, мкмоль/л	69,79±3,47	107,48±5,58*	85,39±2,69***	79,61±3,54***	64,19±2,24**	65,73±3,13**
Сечова кислота, мкмоль/л	131,25±5,73	247,98±6,34*	202,52±7,01***	185,36±5,78***	166,39±2,27***	152,78±5,74**
АлАт, мкмоль/год·мл	1,15±0,08	1,68±0,09*	1,35±0,11**	1,41±0,10*	1,52±0,11*	1,32±0,13**
АсАт, мкмоль/год·мл	0,99±0,09	1,77±0,11*	1,25±0,10**	1,34±0,11***	1,42±0,15***	1,55±0,14*
ГГТП, мккат/л	0,33±0,02	0,62±0,03*	0,38±0,03**	0,48±0,03***	0,39±0,03**	0,36±0,02**

Примітка. * – зміни вірогідні, $p \leq 0,05$ відносно інтакту; ** – зміни вірогідні, $p \leq 0,05$ відносно контролю.

Таблиця 2 – Вплив профілактичного введення екстрактів насіння винограду на вміст продуктів та активність ферментів азотистого обміну в сироватці крові щурів (M±m, n=7)

Показники	Екстракти насіння винограду			
	"Каберне"	"Мерло"	"Ркацителі"	"Рислінг"
Сечовина, ммоль/л	7,54±0,36	7,07±0,21	3,25±0,19*	2,84±0,22*
Креатинін, ммоль/л	78,32±5,56	73,54±3,65	43,32±4,85*	55,75±4,78*
Сечова кислота, мкмоль/л	145,26±3,69*	159,96±4,58*	167,77±3,97*	155,43±4,678
АлАт, мкмоль/год·л	0,91±0,08	0,82±0,08*	0,98±0,09	0,73±0,09*
АсАт, мкмоль/год·мл	0,79±0,06*	0,85±0,05	0,95±0,06	0,71±0,07*
ГГТП, Мккат/л	0,25±0,02*	0,29±0,03	0,18±0,02*	0,31±0,01

Примітка. * – зміни вірогідні, p≤0,05 відносно інтакту.

На це непрямо вказує і більш значне зниження вмісту сечової кислоти за дії екстрактів насіння винограду сортів "Рислінг" та "Ркацителі" порівняно з екстрактами "Каберне" та "Мерло".

Для перевірки останнього припущення, а також для з'ясування впливу досліджуваних екстрактів на організм інтактних тварин ми дослідили зміни вмісту деяких метаболітів за тривалого введення екстрактів.

Дані, наведені в таблиці 2, свідчать про те, що екстракти насіння винограду сортів "Рислінг" та "Ркацителі" дійсно здатні зменшувати рівень сечовини в крові, що може вказувати на зниження інтенсивності розпаду білків за дії даних екстрактів. Цей факт має неоднозначне тлумачення та потребує подальшого дослідження.

Щодо решти досліджуваних показників, то привертає також увагу зростання за введення досліджуваних екстрактів (крім "Рислінгу") вмісту в крові сечової кислоти, особливо під впливом "Ркацителі". Це може пояснюватися вмістом в даних екстрактах пуринових похідних і також потребує подальшого дослідження.

Звернемо увагу ще і на те, що введення екстрактів насіння винограду, очевидно, загалом стабілізувало клітинні мембрани, що проявлялося зниженням потрапляння клітинних ферментів у кров (активність АлАт зменшувалася за дії "Мерло" та "Ркацителі", АсАт – "Каберне" та "Рислінгу", а ГГТП – "Каберне" та "Ркацителі"). Відмінності в антицитолітичній дії екстрактів, можливо, пов'язані з різними точками впливу компонентів екстрактів на клітину: для "Мерло", очевидно, була більшою мірою характерна стабілізуюча дія на мітохондрії, а для "Рислінгу" – на плазматичні мембрани. Екстракт "Ркацителі", ймовірно, стабілізував як зовнішні, так і внутрішні мембрани клітин.

ВИСНОВОК. Проведені дослідження вказують на значну стрес-протекторну та мембраностабілізуючу активність, загалом порівнювану для усіх досліджуваних екстрактів, незалежно від сорту винограду, що робить дані екстракти цінним об'єктом для подальших досліджень з метою впровадження в медичну практику.

ЛІТЕРАТУРА

1. Авидзба А.М., Иванченко В.И., Загоруйко В.А., Огай Ю.А. Перспективы разработки новых биологически активных продуктов питания на основе винограда // "Магарач". Виноградарство и виноделие. – 2001. – № 1. – С. 30-31.
2. Барабой В.А. Биологическое действие растительных фенольных соединений. – К.: Наукова думка, 1976. – 260 с.
3. Губергриц Н.Б., Лоукашевич Г.М., Загоренко Ю.А. Синдром цитолиза в практике гастроэнтеролога: диагностика и терапевтическая практика // Сучасна гастроентерологія. – 2001. – № 2. – С. 44-49.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. –

К.: Авіцена, 2001. – 528 с.

5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. – Мн.: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.
6. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. – Мн.: Беларусь, 2000. – Т. 2. – 463 с.
7. Семагин В.Н., Зухарь А.В., Куликов М.А. Тип нервной системы, стрессустойчивость и репродуктивная функция. – М.: Наука, 1988. – 135 с.
8. Соколова Е.Д., Березин Ф.Б., Барлас Т.В. Эмоциональный стресс: психологические механизмы, проявление, терапия // *Materia Medica*. – 1996. – 9, № 1. – С. 5-56.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СУБСТАНЦИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СЕМЯН ВИНОГРАДА РАЗНЫХ СОРТОВ

Л.Н. Воронина¹, А.Л. Загайко¹, А.Б. Кравченко¹, С.В. Заика¹, Ю.А. Огай²
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ¹, ХАРЬКОВ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ВИНОГРАДА И ВИНА "МАГАРАЧ"², ЯЛТА

Резюме

В работе исследовано влияние профилактического введения полифенольных экстрактов, полученных из семян винограда разных сортов, на развитие негативных последствий нейрогенного стресса при иммобилизации животных. Показано, что иммобилизационный эмоционально-болевой стресс у подопытных крыс сопровождается характерными изменениями метаболизма, которые направлены на обеспечение источниками энергии и активацию энергетического обмена. Эти изменения свидетельствуют об активации катаболических процессов в клетках и усилении выделения конечных продуктов азотистого обмена. В этих условиях профилактическое применение экстрактов винограда значительно облегчало протекание стресс-реакции, что проявлялось в снижении интенсивности катаболических процессов и проявлений цитолиза. Проведенные исследования позволяют сделать вывод о значительной стресс-протекторной и мембраностабилизирующей активности, в целом сравниваемой для всех исследуемых экстрактов, независимо от сорта винограда, что делает данные экстракты ценным объектом для дальнейших исследований с целью внедрения в медицинскую практику.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: семена винограда, полифенолы, стресс, метаболизм белков.

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE SUBSTANCES OBTAINED FROM THE DIFFERENT KINDS OF VINE SEED

L.M. Voronina¹, A.L. Zagayko¹, H.B. Kravchenko¹, S.V. Zaika¹, Ju.O. Ohay²
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY¹, KHARKIV
NATIONAL INSTITUTE OF GRAPES AND VINE "MAGARACH"², YALTA

Summary

The influence of prophylactic administration of polyphenol extracts obtained from the vine seeds of different kinds on the neurogenic stress negative effects under the animals' immobilization was investigated in this work. It was shown that immobilized emotional-painful stress in experimental rats was accompanied by typical metabolic changes that are directed onto providing the source of energy and energetic metabolism activation. These changes are the evidence of catabolic processes activation in cells and activation of the final products utilization. Under these conditions vine extracts prophylactic administration noticeably alleviates the stress-reaction that is manifested in the catabolic processes activity decreasing and cytolysis development. The conducted researches allowed to make the conclusion about the significant stress-protective and membrane stabilizing activity that as a whole is comparable for all the examined extracts independently of vine kinds, and makes these extracts the valuable object for the further investigations with the purpose of application in medical practice.

KEY WORDS: vine seeds, polyphenols, stress, protein metabolism.

Отримано 27.03.2008 р.

Адреса для листування: Л.М. Вороніна, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.

УЛЬТРАСТРУКТУРА АЕРОГЕМАТИЧНОГО БАР'ЄРУ І ФОСФОЛІПІДНИЙ СКЛАД СУРФАКТАНТУ ПРИ ГОСТРОГІПОКСИЧНОМУ НАБРЯКУ ЛЕГЕНЬ

Т.І. Тюпка

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Порушення ультраструктури аерогематичного бар'єру при експериментальному гострогіпоксичному набряку легень у щурів полягають у різкому зменшенні резервного і збільшенні активного сурфактантів. Вказані морфологічні зміни відбуваються внаслідок порушень фосфоліпідного складу сурфактанту. Важливу роль у розвитку набряку легень відіграє збільшення вмісту лізофосфотидилхоліну, що призводить до мембранолітичних процесів і потенціює функціональні порушення легень.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: набряк легень, сурфактант, аерогематичний бар'єр, фосфоліпіди.

ВСТУП. Відкриття сурфактанту легень в 50-х роках ХХ століття стало початком численних досліджень його хімічного складу, фізико-хімічних властивостей, ролі у фізіологічних і патологічних станах легень. Завдяки вирішенню цієї актуальної проблеми в пульмонології стало відомо, що порушення структури і складу ліпідів сурфактанту впливають на функції легень і сприяють розвитку різних патологічних процесів [4]. Досягнуто деяких успіхів у вивченні патогенезу легневих захворювань, при яких першочергову роль відіграють порушення структури і функції сурфактантної системи легень, що забезпечує постійну зміну мономолекулярного шару фосфоліпідів на поверхні альвеол. Опубліковано велику кількість робіт, присвячених вивченню ліпідного складу сурфактанту легень при пневмонії, бронхоектатичній хворобі, емфіземі та ін. [2, 5]. Але аналізу фосфоліпідного складу сурфактанту легень порівняно з ультраструктурою аерогематичного бар'єру при гострогіпоксичному набряку легень у доступній літературі ми не зустрічали.

У зв'язку з викладеним, метою дослідження стало вивчення ліпідного складу й ультраструктури сурфактантної системи легень і визначення їх ролі в патогенезі гострогіпоксичного набряку легень.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проведено на 20 білих нелінійних щурах-самцях масою 180-200 г, яких було поділено на 2 групи:

© Т.І. Тюпка, 2008.

1-ша – інтактні тварини (контроль); 2-га – тварини, які дихали гіпоксичною газовою сумішшю, що містила 7 % O₂ в азоті, одноразово протягом 1 год і досліджені через добу після впливу. Вибір для моделювання гострогіпоксичного набряку легень вказаного складу гіпоксичної суміші зумовлений тим, що зниження концентрації кисню в дихальній газовій суміші до 7 % сприяє виявленню меж пристосувальних можливостей організму, як на системному, так і на тканинному рівні, й, безсумнівно, викликає в легенях зміни, що призводять до набряку легень [4]. Гіпоксичні умови для тварин створювали в герметичній камері з постійним потоком газової суміші та поглинанням вуглекислого газу.

Підготовку препаратів для електронно-мікроскопічних досліджень проводили відповідно до загальноприйнятих методик з подвійною фіксацією глютаральдегідом та OsO₄, зневоднюванням у спиртах зростаючої концентрації та заливанням в епон [6]. Ультратонкі зрізи товщиною 40-60 нм фіксували ураніацетатом та цитратом свинцю і вивчали за допомогою електронних мікроскопів JEM 100-CX (Японія) та ПЕМ-125 К (Україна).

Морфометричні дослідження проводили відповідно до методик Вейбеля [6], а також з використанням комп'ютерної програми для морфологічних підрахунків Image Tool Version 3 (Техас, США).

Для дослідження ліпідного складу легень тварин заморожували у рідинному азоті. Після відокремлювання фракції мембран проводили

екстракцію ліпідів за методом Фолча [3, 7]. Склад фосfolіпідів в екстрактах аналізували методом двомірної мікротонкошарової хроматографії на пластинках силікагелю КСК у двох системах розчинника: 1) хлороформ – метанол – 25 % водний розчин аміаку (65:35:5); 2) хлороформ – метанол – ацетон – крижана оцтова кислота – вода (50:10:20:10:5) [7]. Вміст сумарних та індивідуальних фосfolіпідів (ФЛ) визначали за кількістю ліпідозв'язаного неорганічного фосфору методом Васьковського [8]. Для статистичної обробки використовували t-критерій Стьюдента [1].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналіз результатів дослідження показав, що ультраструктура легень і стан сурфактантної системи у щурів 2-ї експериментальної групи відповідали картині гострогіпоксичного набряку легень, який виникав внаслідок застосування вказаної вище схеми гіпоксичного впливу. Через добу у тварин 2-ї групи спостерігали набряк аерогематичного бар'єру легень. На це вказувало збільшення його середньої товщини на 50-60 % (табл. 1, рис. 1). Крім того, був зафіксований вихід рідини та білкових компонентів плазми крові в порожнину альвеол, що є проявом набряку легень у клінічному розумінні даного процесу.

З боку сурфактантної системи спостерігали властиві гіпоксичному впливу зміни, а саме:

пригнічення синтезу сурфактанту, характерною ознакою якого є запусівання ламелярних тілець у пневмоцитах II типу (рис. 2A). Але при цьому мали місце збереження секреції сурфактанту і навіть її посилення, на що вказувала досить значна кількість активного сурфактанту у вигляді сітчастих та решітчастих структур (рис. 2B).

Таким чином, при гострогіпоксичному набряку легень відбувається різке зменшення кількості резервного сурфактанту в осміофільних тільцях пневмоцитів за умов вірогідного збільшення площі активного сурфактанту, який вистилає альвеоли.

Аналіз результатів експериментального вивчення ліпідного складу сурфактанту показав, що загальний вміст фосfolіпідів при гострогіпоксичному набряку легень у щурів зменшувався на 21 % (табл. 2). При цьому спостерігали кількісні зміни відсоткового вмісту різних фосfolіпідних класів, за винятком сфінгомієліну, кількість якого вірогідно не змінювалася. Вміст фосфатидилхоліну знижувався на 14 % (за 100 % взято інтактний контроль). Пояснити даний факт можна тим, що утворення фосфатидилхоліну шляхом ацилювання лізофосфатидилхоліну проходить з участю ферменту лізолецитин-ацетилтрансферази, активність якого пригнічується за умов гіпоксії і в цілому призводить до зменшення синтезу сурфактанту [2]. Крім того, відбувалося зниження

Таблиця 1 – Показники морфофункціонального стану аерогематичного бар'єру ($\bar{X} \pm S\bar{x}$), n=10

Об'єкт дослідження	Показники		
	товщина аерогематичного бар'єру, нм	площа заповнення ламелярних тілець резервним сурфактантом, %	площа "полів" вільного сурфактанту, ум.од.
1-ша (інтактний контроль)	163±8	42,6	8671±185
2-га (експериментальна – тварини з гострогіпоксичним набряком легень)	253±12*	17,8*	10314±196*

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – p<0,05 відносно інтактного контролю.

Таблиця 2 – Ліпідний склад сурфактанту легень щурів з гострогіпоксичним набряком легень ($\bar{X} \pm S\bar{x}$), n=10

Показники	Об'єкт дослідження	
	1-ша (інтактний контроль)	2-га (тварини з гострогіпоксичним набряком легень)
Загальний вміст фосfolіпідів, ммоль/л	0,041±0,004	0,032±0,03
Фосфатидилхолін, %	55±2,2	47,2±1,9*
Фосфатидилетаноламін, %	10,8±1,1	8,0±1,2*
Сфінгомієлін, %	9,9±1,0	9,6±1,6
Фосфатидилінозит, %	7,0±0,8	5,0±0,9*
Фосфатидилсерин, %	7,5±0,3	5,5±0,6*
Фосфатидилгліцерин, %	5,5±0,4	8,5±0,5*
Фосфатидна кислота, %	3,8±0,6	6,3±0,4*
Лізофосфатидилхолін, %	0,5±0,1	9,9±1,7*

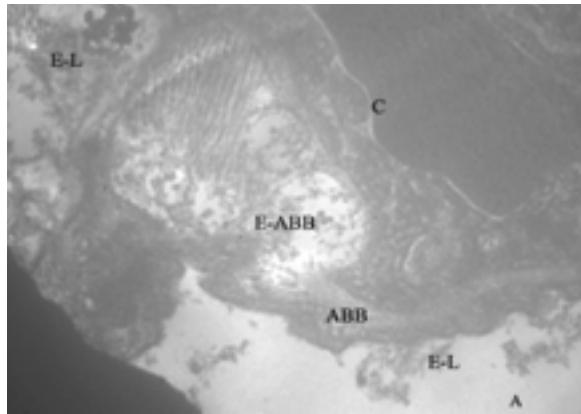


Рис. 1. Елементи набряку легень після гострогіпоксичного впливу: E-L – набряк лень, E-ABB – набряк аерогематичного бар'єру, C – капіляр, ABB – аерогематичний бар'єр, A – порожнина альвеоли. Зб. 12000.

на 26 % вмісту фосфатидилетаноламіну, який розглядається багатьма дослідниками як попередник у синтезі фосфатидилхоліну [4]. Також зменшувалася кількість синтезованого пневмоцитами II типу фосфатидилінозиту – на 29 %, фосфатидилсерину – на 27 %. Але, поряд зі зниженням загальної кількості ліпідів сурфактанту, відносна кількість деяких класів фосфоліпідів збільшувалася. Так, вміст фосфатидилгліцерину став вищим на 55 %, фосфатидної кислоти – на 66 %, а лізофосфатидилхоліну – майже у 20 разів. Оскільки лізофосфатидилхолін є субстратом при синтезі головного компонента сурфактанту – фосфатидилхоліну, то таке значне збільшення його можна вважати захисно-компенсаторним механізмом, який вмикається у зв'язку зі зменшенням вмісту фосфатидилхоліну при гострогіпоксичному набряку легень. Але, з іншого боку, за даними літератури, лізофосфатидилхолін чинить мембранолітичну дію: мембрани потовщуються, стають гідратованими, а їх проникність для різних речовин різко зростає [5]. Цим можна пояснити набухання мембран мітохондрій у пневмоцитах, яке відбувається при гострогіпоксичному набряку легень, що, у свою чергу, призводить до порушення транспорту електронів у дихальному ланцюгу [4] і ще більше порушує функціональний стан легень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. – М., 2000. – С. 192.
2. Bartsch and Gibbs Effect of Altitude on the Heart and the Lungs // *Circulation*. – 2007. – **116**. – P. 2191-2202.

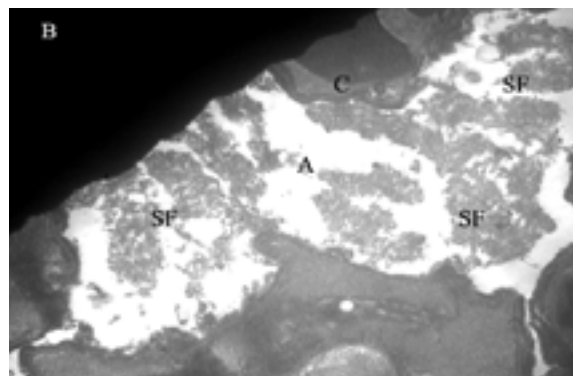
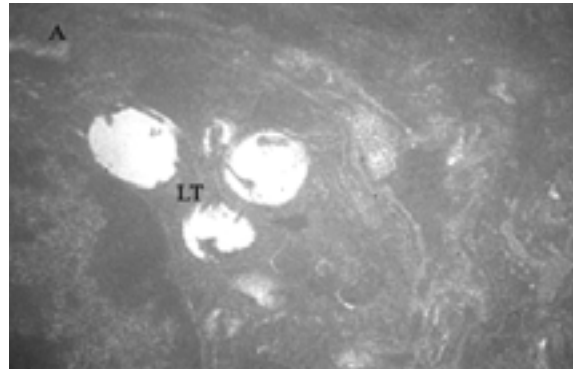


Рис. 2. Сурфактантна система при експериментальному гострогіпоксичному набряку легень: А – запусівання ламелярних тілець; В – “поля” сурфактанту в порожнині альвеоли. LT – ламелярні тільця, C – капіляр, А – порожнина альвеоли, SF – сурфактант. Зб. 8000.

ВИСНОВКИ. 1. Порушення ультраструктури аерогематичного бар'єру при гострогіпоксичному набряку легень полягають у різкому зменшенні кількості резервного сурфактанту в осміофільних тільцях пневмоцитів при вірогідному збільшенні площі активного сурфактанту, який вистилає альвеоли.

2. Морфофункціональні зміни аерогематичного бар'єру при гострогіпоксичному набряку легень відбуваються внаслідок порушень фосфоліпідного складу сурфактанту.

3. Важливу роль у розвитку гострогіпоксичного набряку легень відіграє значне компенсаторне збільшення вмісту лізофосфатидилхоліну в сурфактанті, що призводить до мембранолітичних процесів і потенціює функціональні порушення легень.

3. Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G.N. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissues // *J. Boil. Chem.* – 1957. – **226**. – P. 497-499.
4. Lorraine B. Ware, Michael A. Matthay Acute

- Pulmonary Edema // New Engl. J. Med. – 2005. – **353**. – P. 2788-2796.
5. Mattu A., Martinez J.P., Kelly B.S. Modern management of cardiogenic pulmonary edema // Emerg. Med. Clin. North. Am. – 2005. – **23** (4). – P. 1105-1125.
6. Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses / S.L.S. Menezes, P.T. Bozza, H.C.C. Faria Neto et al. // J. Appl. Physiol. – 2005. – **98** (5). – P. 1777-1783.
7. Rouser G., Siacotos A.N., Fleischer S. Quantitative analysis of phospholipids by thin layer chromatography and phosphorus analysis of spots // J. Lipids. – 1966. – 1. – P. 85.
8. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. A universal reagent for phospholipids analysis // J. Chromatogr. – 1975. – **114**. – P. 129-141.

УЛЬТРАСТРУКТУРА АЭРОГЕМАТИЧЕСКОГО БАРЬЕРА И ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ СУРФАКТАНТА ПРИ ОСТРОГИПОКСИЧЕСКОМ ОТЕКЕ ЛЕГКИХ

Т.И. Тюпка
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Нарушения ультраструктуры аэрогематического барьера при экспериментальном острогипоксическом отеке легких у крыс состоят в резком уменьшении резервного и увеличении активного сурфактантов. Указанные морфологические изменения происходят вследствие нарушений фосфолипидного состава сурфактанта. Важную роль в развитии отека легких играет увеличение содержания лизофосфотидилхолина, что приводит к мембранолитическим процессам и потенцирует функциональные нарушения легких.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **отек легких, сурфактант, аэрогематический барьер, фосфолипиды.**

ULTRASTRUCTURE OF AEROHEMATIC BARRIER AND PHOSPHOLIPID COMPOSITION OF SURFATANT AT ACUTE HYPOXIC PULMONARY EDEMA

T.I. Tyupka
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

Infringements of ultrastructure of aeroheumatic barrier at experimental acute hypoxic pulmonary edema of the rats consist in sharp reduction of reserve surfactant and increase of active one. The specified morphological changes occur owing to infringements of phospholipid composition of surfactant. The important role in development of lung hypostasis of lungs plays enlargement of lysophosphatidilcholine which leads to membranolytic processes and intensifies functional infringements of lungs.

KEY WORDS: **pulmonary edema, surfactant, aeroheumatic barrier, phospholipids.**

Отримано 15.01.2008 р.

Адреса для листування: Т.І.Тюпка, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, Харків, 61002, Україна.

АНАЛЬГЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ ІНДОМЕТАЦИНУ В КОМБІНАЦІЇ З ТІОТРИАЗОЛІНОМ ПРИ АРТРОЗІ У ЩУРІВ

О.А. Подплетня

ДНІПРОПЕТРОВСЬКА ДЕРЖАВНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ

Доведено експериментально можливість підвищення ефективності знеболювальної терапії артрозу за допомогою комбінації найсильнішого нестероїдного протизапального засобу індометацину (доза становить 1/2 від оптимальної анальгетичної) та антиоксиданту тіотриазоліну в дослідях на щурах.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **індометацин, тіотриазолін, артроз.**

ВСТУП. Основні клінічні симптоми остеоартрозу (ОА) – біль і деформація суглобів, що призводять до порушення їх функції. Біль в даному випадку пов'язаний з ураженням кісток (остеофіти, мікроінфаркти, збільшення тиску в субхондральній кістці й кістковомозковому каналі), суглобів (запалення синовіальної оболонки, розтягування капсули суглоба), навколосуглобових тканин (пошкодження зв'язок, м'язовий спазм, бурсит), психоемоційними й іншими чинниками. Обговорюється також роль “запального” компонента в походженні хвороби [2]. Незважаючи на те, що сучасні дослідження спрямовані перш за все на пошук і вивчення засобів, здатних сповільнювати прогрес ОА, лікування цього захворювання залишається в основному симптоматичним. У класифікації препаратів, які застосовують при дегенеративних захворюваннях суглобів, нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) утворюють першу групу. Загальні принципи призначення НПЗЗ при ОА полягають у використанні мінімальної ефективної дози препаратів, застосуванні з найменшим ризиком розвитку побічних реакцій.

У патогенезі ОА мають значення протеогліканова недостатність хряща, активація перекисного окиснення ліпідів, що викликає порушення мікроциркуляції, ділення клітин, структури колагену, внаслідок чого відбувається деполімеризація гіалуронової кислоти і прогресує дегенеративний процес в суглобових тканинах; певну роль відіграє також імунологічний чинник.

У зв'язку з цим, нами проведено дослідження перспективної комбінації індометацину © О.А. Подплетня, 2008.

і тіотриазоліну, в якій НПЗЗ використовують в дозі 1/2 від оптимальної анальгетичної.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Остеоартроз моделювали на 36 білих щурах масою (180±20) г. Модель основана на введенні в колінний суглоб розчину моноіодоцтової кислоти (МОК) з розрахунку 3 мг на 50 мкл стерильного фізіологічного розчину, як описано С. Guingamp, P. Geogout-Pottie [8]. Починаючи з 21 дня, впродовж тижня хворим тваринам вводили досліджувані препарати – 5 мг/кг індометацину, 5 мг/кг диклофенаку натрію, комбінований препарат (5 мг/кг індометацину + 15 мг/кг тіотриазоліну), воду дистильовану (контрольна група).

Анальгетичну активність досліджуваних засобів у тварин з модельованим артрозом оцінювали за латентним періодом реакції відсмикування хвоста [4]. Після поміщення 3 см хвоста щурів у водяну баню з температурою (50±0,2) °С вимірювали латентний період до і через 90 хв після введення препаратів. У інтактних тварин (36 білих щурів масою (180±20) г) антиноцицептивну активність препаратів вивчали на моделі електробольового подразнення кореня хвоста [5].

Також визначали подовжній і поперечний розмір суглоба в початковому стані, до і після лікування препаратами (перед забоєм тварин).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Оптимальною анальгетичною дозою як індометацину, так і диклофенаку є 10 мг/кг. Для демонстрування синергічної дії антиоксиданту ми досліджували підпорогову дозу індометацину – 5 мг/кг як окремо, так і в комбінації з тіотриазоліном. Результати досліджень, представлені на ри-

сунку 1, свідчать про те, що відомий антиоксидант тіотриазолін здатний значно підсилювати анальгетичну дію НПВС (практично в 2 рази).

Отримані результати показують безпечну перевагу анальгетичної дії поєднаного застосування підпорогової анальгетичної дози індометацину (5 мг/кг) і тіотриазоліну, яке перевищує навіть ефект оптимальної анальгетичної дози індометацину (10 мг/кг) і диклофенаку натрію (10 мг/кг).

Основна мета лікування артрозу полягає в зменшенні болю, зниженні функціональної недостатності суглобів, обмеженні прогресу захворювання і поліпшенні якості життя хворих. Наші експерименти на щурах продемонстрували появу основних симптомів захворювання через 3 тижні після введення МОК. МОК викликає дегенеративні зміни в тканинах суглоба, що супроводжуються видимими змінами кінцівок тварини – підвищується больова чутливість, порушується рухова активність, збільшується розмір суглоба. Такі зміни, які прогресують аж до 20 дня від введення МОК, свідчать про розвиток експериментального артрозу.

Результати досліджень зміни больового реагування тварин на термічне подразнення в ході розвитку артрозу і його лікування представлено в таблиці 1.

Щури, яким вводили досліджувані препарати на відміну від контрольної групи хворих тварин, що не отримували лікування, менше реагували на подразник, що демонструє

анальгетичну ефективність досліджуваних препаратів порівняння – НПЗЗ і більшою мірою досліджуваного комбінованого препарату.

Також нами було проведено макроскопічне спостереження за розміром суглобів у ході формування артрозу і його лікування. Було виявлено, що комбінований препарат зменшував об'єм уражених суглобів на 18,87 %, а препарати порівняння індометацин і диклофенак – на 16,25 та 14,95 % відповідно, тоді як в контрольній групі нелікованих тварин розміри суглобів збільшувалися (рис. 2).

Таким чином, нами виявлений позитивний вплив тіотриазоліну на лікування ОА. Антиоксидант дозволяє в 2 рази знизити дозу основного препарату – індометацину, підвищити поріг больового реагування як в інтактних тварин, так і в умовах модельованого захворювання, зменшити розміри суглобів і підвищити працездатність тварин. Результати наших попередніх досліджень [1, 3] показали значну протекторну роль тіотриазоліну, який обмежує розвиток гастро-, хондро- й інших видів токсичності індометацину.

Зараз вже ні у кого не викликає сумніву факт активації процесів перекисного окиснення ліпідів за різних патологічних процесів, у тому числі й при формуванні больової реакції. Інтенсивність утворення простагландинів, про що свідчать численні дані літератури, змінюється залежно від присутності прооксидантів і антиоксидантів. Цей факт підтверджується експериментами *in vivo* та *in vitro* [9, 10]. Вивчення

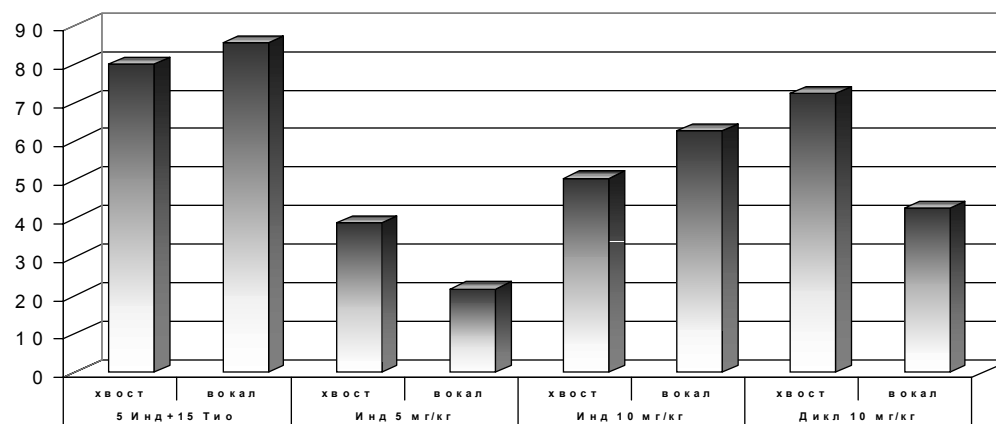


Рис. 1. Порівняльний аналіз впливу різних доз НПЗЗ і комбінованого препарату на зміну больового порогу в щурів. Примітка: по вертикалі – % змін відносно початкового фону.

Таблиця 1 – Зміни больових порогів на основних етапах дослідження

	Початковий фон	3 тижні хвороби	1 тиждень лікування
Індометацин	1,96±0,05	1,6±0,04*	2,09±0,071
Індометацин + тіотриазолін	1,92±0,066	1,55±0,064*	2,07±0,083
Диклофенак натрію	1,95±0,039	1,59±0,041*	2,06±0,053
Контроль-артроз	1,94±0,035	1,61±0,033*	1,55±0,032*

Примітка. * – зміни достовірні відносно початкового фону ($p < 0,05$).

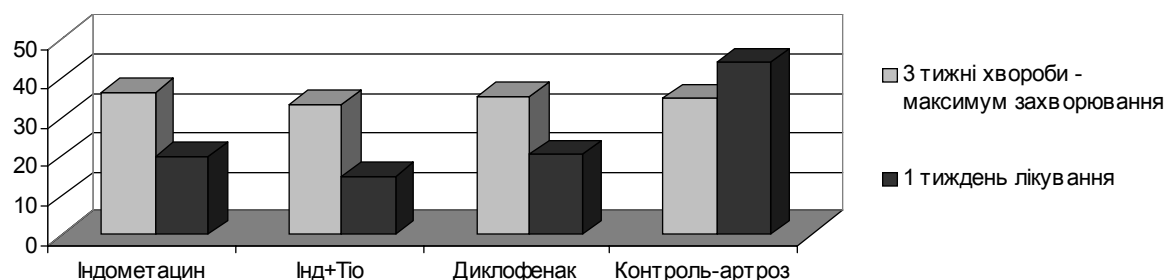


Рис. 2. Динаміка зміни розмірів суглобів у ході розвитку і лікування артрозу. За 0 взято початкові значення розмірів суглобів.

впливу антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутаза, глутатіонпероксидаза) на утворення простагландинів також підтверджує той факт, що вільнорадикальний окиснювальний гомеостаз клітини взаємопов'язаний з синтезом простагландинів та інших прозапальних агентів [11, 12]. Зараз також відомо про особливі метаболіти арахідонової кислоти – ізопростани, утворення яких *in vivo* відбувається без участі циклооксигенази, ініціюється вільними радикалами, і продукти реакції, що з'явилися і мають певну фізіологічну активність [6]. Так, наприклад, ізопростани підвищують ноцицепцію і стимулюють симпатичну нейропередачу, а продукти вільнорадикального окиснення докозагексаєнової кислоти, названі F-4-нейпростанами, визначають інтенсивність перекисного окиснення ліпідів при неврологічних розладах. 8-ізоПГЕ2 і 2-ізоПГФ2альфа підвищують чутливість С-ноцицепторів при механічному і термічному подразненні *in vivo*,

дослідження *in vitro* показали, що ці ізопростани сприяють збільшенню кількості потенціалів дії, вивільненню білків, пов'язаних з генами субстанції Р і кальцитоніну [7].

Таким чином, застосування антиоксидантів в антиноцицептивній терапії різних захворювань є перспективним напрямком, що дозволяє підвищити ефективність симптоматичного лікування ОА НПЗЗ.

ВИСНОВКИ. 1. Тіотриазолін в дозі 15 мг/кг, який застосовують в комбінації із сильним і токсичним НПЗЗ індометацином, потенціє анальгетичний ефект останнього в інтактних тварин.

2. Одночасне використання підпорогової дози індометацину і тіотриазоліну дозволяє підвищити якість лікування ОА у щурів.

3. Досліджувана комбінація викликає безперечний інтерес для подальшого дослідження як засіб протизапальної та антиноцицептивної терапії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Мамчур В.И., Подплетняя Е.А., Мазур И.А. Морфологические изменения в органах желудочно-кишечного тракта крыс при изучении хронической токсичности индометацина и препаратов сравнения // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. – Запоріжжя, 2006. – Вип. XV, том 3. – С. 597-598.
2. Насонова В.А., Насонов Е.Л. Рациональная фармакотерапия ревматических заболеваний. – М.: Литтерра, 2003. – 506 с.
3. Подплетняя Е.А., Мамчур В.И., Мазур И.А. и др. Возрождение индометацина. Возможно ли это? // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. – Запоріжжя, 2006. – Вип. XV, том 3. – С. 507-512.
4. Стефанов А.В. Биоскрининг. Лекарственные средства. – К.: Авицена, 1998. – С. 56-58.
5. Carroll M.N., Lim R.K.S. Observation on the

neuropharmacology of morphine and morphine-like analgesia // Arch. Jut. Pharmacodyn. Ther. – 1960. – **125**. – P. 383-403.

6. Cracowski J.L., Durand T., Bessard G. Isoprostanes as biomarkers of lipid peroxidation in human physiology, pharmacology and clinical implications // Trends in Pharmacol. Sci. – 2002. – **23**, № 8. – P. 360-366.

7. Evans A.R., Junger H., Southall M.D. et al. Isoprostanes, novel eicosanoids that produce nociception and sensitize rat sensory neurons // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2000. – **293**, № 3. – P. 912-920.

8. Guingamp C., Gegout-Pottie P., Philippe L. et al. Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry // Arthritis Rheum. – 1997. – **40**, № 9. – P. 1670-1679.

9. Jiang Q., Ames B.N. Gamma-tocopherol, but

not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats // FASEB J. – 2003. – **17**, № 8. – P. 816-822.

10. Mutoh M., Takahashi M., Fukuda K. et al. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship // Jpn. J. Cancer Res. – 2000. – **91**, № 7. – P. 686-691.

11. Sare M., Bozkurt S., Onuk E. et al. The effects

of indomethacine, NDGA, allopurinol and superoxide dismutase on prostaglandin E2 and leukotriene C4 levels after mesenteric ischemia-reperfusion injury // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. – 1996. – **55**, № 6. – P. 379-383.

12. Sugino N., Nakata M., Kashida S., et al. Decreased superoxide dismutase expression and increased concentrations of lipid peroxide and prostaglandin F(2alpha) in the decidua of failed pregnancy // Mol. Hum. Reprod. – 2000. – № 6. – P. 642-647.

АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИНДОМЕТАЦИНА В КОМБИНАЦИИ С ТИОТРИАЗОЛИНОМ ПРИ АРТРОЗЕ У КРЫС

Е.А. Подплетня

ДНЕПРОПЕТРОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

Резюме

Доказано экспериментально возможность повышения эффективности обезболивающей терапии артроза с помощью комбинации наиболее сильного нестероидного противовоспалительного средства индометацина (доза составляет 1/2 от оптимальной анальгетической) и антиоксиданта тиотриазолина в опытах на крысах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **индометацин, тиотриазолин, артроз.**

ANALGESIC ACTIVITY OF INDOMETHACINE IN COMBINATION WITH THIOTRIAZOLINE AT ARTHROSIS IN RATS

O.A. Podplyetnya

DNIPROPETROVSK STATE MEDICAL ACADEMY

Summary

The possibility of improving the effectiveness of analgesic therapy of arthrosis with combined use of the strongest nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacine (its dose is 1/2 from effective dose) and antioxidant thiotriazoline was proved in experiments on rats.

KEY WORDS: **indomethacine, thiotriazoline, arthrosis.**

Отримано 10.10.2007 р.

Адреса для листування: О.А. Подплетня, Дніпропетровська державна медична академія, Дніпропетровськ, Україна.

ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ ЧАСТКОВО ОЧИЩЕНОГО ПРЕПАРАТУ ТИРОЗИНАЗИ З ГРИБІВ *AGARICUS BISPORUS*

І.І. Романовська, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов, В.А. Топтіков
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, ОДЕСА

З грибів *Agaricus bisporus* модифікованим методом виділено частково очищений препарат тирозинази з виходом білка 0,67 мг/г грибів, вмістом міді 0,19 %, питомою активністю 13 мкмоль пурпурогаліну/хв • мг білка і 500 од./хв • мг білка по пірогалолу й тирозину відповідно. Методом SDS-електрофорезу в поліакриламідному гелі визначено склад білкових фракцій препарату тирозинази; показано, що фракція з молекулярною масою 11,5 кДа (легка субодиниця молекули ТИР) становить 27,4 %, фракції з молекулярною масою 41-48 кДа (важка субодиниця молекули ТИР) – 26,45 %; інші фракції представлені ізоформами ТИР та баластними білками. Нативний електрофорез виявив 17 білкових фракцій у виділеному ферментному препараті, 12 з них мають виражену тирозиназну активність і становлять 92,5 % загального білка.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: тирозиназа, *Agaricus bisporus*, електрофорез, фракціонування білків.

ВСТУП. Тирозиназа (К. Ф. 1.14.18.1) – мідь-вмісний фермент класу оксидоредуктаз, що відповідає за біосинтез меланіну й інших поліфенольних сполук у тваринних і рослинних організмах [5]. Тирозиназу (ТИР) грибів *Agaricus bisporus* використовують як біокаталізатор з метою синтезу біологічно активних сполук: антиоксидантів [3], L-ДОФА (ЛЗ для лікування хвороби Паркінсона) [9] та ін. Фермент каталізує процес приєднання фенольних сполук і білків до хітозану з утворенням модифікованого полімеру, що показав позитивні результати при використанні як штучної шкіри й матриці для контрольованого вивільнення лікарських засобів [5]. Фермент може бути застосований для окиснення фенольних політантів [7], а також при створенні біосенсорів з метою визначення фенольних сполук і ароматичних амінів [4].

Проте одним з основних недоліків застосування тирозинази є висока вартість комерційного ферменту, внаслідок чого актуальним є використання частково очищеного препарату тирозинази з грибів з достатньо високим рівнем активності, який пов'язаний зі складом препарату та залежить від об'єкту і методу виділення ферменту.

Тому викликає інтерес дослідження особливостей складу виділеного модифікованим методом частково очищеного препарату тиро-

© І.І. Романовська, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов, В.А. Топтіков, 2008.

зинази з грибів *Agaricus bisporus* методом електрофорезу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували частково очищений препарат тирозинази з грибів *Agaricus bisporus*, отриманий згідно з методом [2], модифікованим додаванням у процесі виділення тирозинази полікапроаміду. 300 г грибів гомогенізували з 600 см³ охолодженого екстрагенту (водні розчини, що містять 1 % аскорбінової кислоти й 0,2 % бензойної кислоти), перемішували протягом 1 год, після чого отриманий екстракт центрифугували при 11 000 об./хв 30 хв. Осадження ферменту проводили, насичуючи надосадову рідину сульфатом амонію до 80 %, і центрифугували в аналогічних умовах. Осад розчиняли в 20 см³ розчину бензойної та аскорбінової кислот і додавали 5 г тонкого порошку полікапроаміду, суміш перемішували протягом 1,5 год, після чого відфільтровували. Отриманий осад розчиняли в 15 см³ дистильованої води й діалізували протягом 3-х днів проти води. Весь процес виділення проводили при 0 °С.

У виділеному препараті ТИР визначали вміст білка за методом Лоурі в модифікації Хартрі [6], вміст міді – методом атомно-абсорбційної спектроскопії, активність – за тирозином [7] і пірогалолом [8].

Фракційний склад препарату тирозинази досліджували методом SDS-електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі (ПААГ) в системі

Леммлі на приладі Helicon (Росія). Забарвлення здійснювали з використанням кумасі R-250.

Нативний електрофорез проводили в 10 % ПААГ за Орнстейн і Девіс [1]. Одну частину гелю забарвлювали кумасі R-250 для прояву білкових фракцій. Іншу частину обробляли субстратом тирозинази для визначення ферментативної активності.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. З грибів *Agaricus bisporus* модифікованим методом виділено частково очищений препарат тирозинази з виходом білка 0,67 мг/г грибів, вмістом міді 0,19 %, питомою активністю 13 мкмоль пурпурогаліну/хв • мг білка і 500 од./хв • мг білка по пірогалолу й тирозину відповідно. Додавання полікапроаміду в ході виділення сприяло збільшенню активності ТИР в 3 рази, що пояснюється зв'язуванням продуктів окиснення поліфенольних сполук (інгібіторів ТИР) з полікапроамідом і наступним видаленням їх з препарату.

Дослідження фракційного складу препарату ТИР методом SDS-електрофорезу показало наявність 9 білкових фракцій, які можна об'єднати в 3 зони. У швидкорухомій зоні є

одна фракція з R_f 0,97, її питома частка в спектрі становить 27,40 %. У середньорухомій зоні проявляється п'ять білкових фракцій. Цю зону можна поділити на дві підзони: середню 1 – R_f 0,67 й 0,66, частка в спектрі – 22,20 %; середню 2 – R_f 0,62, 0,58 й 0,55, частка в спектрі – 24,01 %. У малорухомій зоні виявлено три фракції з R_f 0,49, 0,46 й 0,44, частка в спектрі – 26,45 % (табл. 1, рис. 1).

У виділеному частково очищеному препараті ТИР фракція з молекулярною масою ($11,5 \pm 0,7$) кДа може відповідати легкій субодиниці молекули ТИР, фракції з молекулярною масою ($41-48 \pm 4,5$) кДа – важкій субодиниці; інші фракції є, ймовірно, ізоформами ТИР та баластними білками. Отримані дані відповідають наведеним в літературі свідченням про структуру молекули ТИР [5]; відомо, що молекулярна маса (М.м.) комерційного препарату ТИР становить 125-128 кДа, молекула ферменту складається з 2-х легких (М.м. 12-13 кДа) та 2-х важких (М.м. 43-48 кДа) субодиниць.

З використанням нативного електрофорезу в препараті тирозинази виявлено 17 білкових фракцій, кількість яких може бути зумовлена як наявністю ізоформ ферменту, так і утворен-

Таблиця 1 – Білкові фракції препарату тирозинази *Agaricus bisporus*, виявлені методом SDS-електрофорезу

№	R_f	Питома частка фракції в спектрі, %	Молекулярна маса, кДа
1	0,97	27,40	$11,5 \pm 0,7$
2	0,67	10,60	$25,0 \pm 1,5$
3	0,66	11,60	$26,0 \pm 1,3$
4	0,62	5,40	$30,0 \pm 2,9$
5	0,58	8,25	$33,0 \pm 3,0$
6	0,55	10,30	$35,0 \pm 3,2$
7	0,49	15,20	$41,0 \pm 4,2$
8	0,46	8,20	$45,0 \pm 4,5$
9	0,44	3,05	$48,0 \pm 4,0$

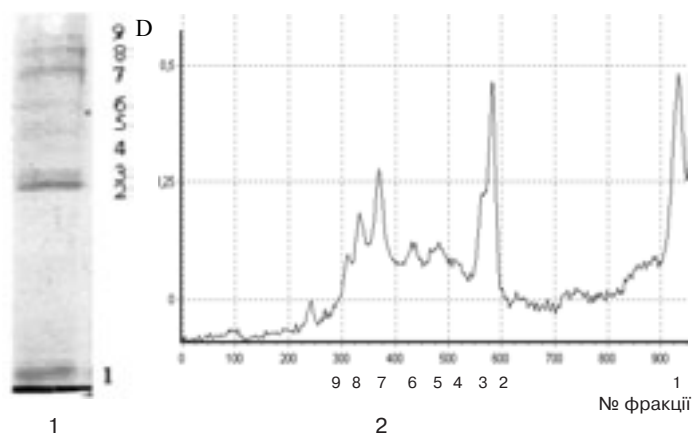


Рис. 1. Електрофореграма (1) і денситограма (2) препарату тирозинази після розділення SDS-електрофорезом.

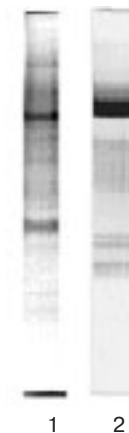


Рис. 2. Електрофореграми (нативний електрофорез) препарату тирозинази: 1 – білкові фракції; 2 – ферментативна активність фракцій.

Таблиця 2 – Вивчення фракційного складу і ферментативної активності ТИР методом нативного електрофорезу

№	R _f	Питома частка білкової фракції в спектрі, %	
		За білком (забарвлення кумасі R-250)	За ферментативною активністю
17	0,10	1,20	–
16	0,14	2,80	–
15	0,17	1,80	–
14	0,21	11,60	10,10
13	0,24	11,60	60,13
12	0,28	30,20	
11	0,30	8,20	
10	0,35	9,10	8,77
9	0,40	7,20	4,23
8	0,45	2,40	3,69
7	0,48	1,70	4,31
6	0,52	1,50	–
5	0,56	9,60	1,98
4	0,61	0,80	3,12
3	0,66	0,10	3,67
2	0,71	0,10	–
1	0,78	0,10	–

ням білкових агрегатів з присутніми поліфенолами, або пігментами [5].

Як свідчать дані таблиці 2, виражену тирозиназну активність мають 12 фракцій із вмістом загального білка 92,5 %. Максимальна активність ферменту (60,13 %) пов'язана з білками (фракції 11-13) з відносною електрофоретичною рухомістю (R_f) 0,24-0,30. Частка цих фракцій від загального білкового спектра становить 50 % (табл. 2, рис. 2).

ВИСНОВКИ. З грибів *Agaricus bisporus* отримано частково очищений препарат тирозинази з питоною активністю, збільшеною в 3 рази внаслідок модифікації методу виділення. Методом SDS-електрофорезу в ПААГ досліджено фракційний склад препарату; нативний електрофорез показав, що більшість фракцій має виражену тирозиназну активність і становить 92,5 % загального білка.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др. Методы биохимического исследования растений. – Л.: Агропромиздат, 1987. – 430 с.
2. Пат. 2956929 США, МКИ 195-68 /E.M. Cohen, L.L. Lerner. Tyrosinase concentrate and extractant and method for making same. – Заявл. 24.04.1958. Опубл. 18.10.1960.
3. Espin J.C., Soler-Rivas C., Cantos E. et al. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst // J. Agric. Food. – 2001. – **49**, № 3. – P. 1187-1193.
4. Freire R.S., Durána N., Kubota L.T. Electrochemical biosensor-based devices for continuous phenols monitoring in environmental matrices // J. Braz. Chem. Soc. – 2002. – **13**, № 4. – P. 456-462.
5. Halaoui S., Asther M., Sigoillot J.-C. et al. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications // J. Appl. Microbiol. – 2006. – **100**, № 2. – P. 219-232.
6. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method, that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. – 1972. – **48**, № 1. – P. 422-427.
7. Ikehata K., Nicell J. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols // Biotechnol. Prog. – 2000. – **16**, № 4. – P. 533-540.
8. Patra H., Mishra D. Pyrophosphatase, peroxidase and polyphenoloxidase activities during leaf development and senescence // Plant Physiol. – 1979. – **63**, № 1. – P. 318-323.
9. Seetharam G., Saville B.A. L-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite // Enzym. Microb. Technol. – 2002. – **31**, № 6. – P. 747-753.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА ЧАСТИЧНО ОЧИЩЕННОГО ПРЕПАРАТА ТИРОЗИНАЗЫ ИЗ ГРИБОВ *AGARICUS BISPORUS*

И.И. Романовская, Ю.А. Шестеренко, О.В. Севастьянов, В.А. Топтиков
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. А.В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ, ОДЕССА

Резюме

Из грибов *Agaricus bisporus* модифицированным методом выделен частично очищенный препарат тирозиназы с выходом белка 0,67 мг/г грибов, содержанием меди 0,19 %, удельной активностью 13 мкмоль пурпурогаллина/мин·мг белка и 500 ед./мин·мг белка по пирогаллолу и тирозину соответственно. Методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле определен состав белковых фракций препарата тирозиназы; показано, что фракция с молекулярной массой 11,5 кДа (легкая субединица молекулы ТИР) составляет 27,4 %, фракции с молекулярной массой 41-48 кДа (тяжелая субединица молекулы ТИР) – 26,45 %; другие фракции представлены изоформами ТИР и балластными белками. Нативный электрофорез обнаружил 17 белковых фракций в выделенном ферментном препарате, 12 из них обладают выраженной тирозиназной активностью и составляют 92,5 % общего белка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тирозиназа, *Agaricus bisporus*, электрофорез, фракционирование белков.

INVESTIGATION OF PARTIALLY PURIFIED *AGARICUS BISPORUS* TYROSINASE PREPARATION COMPOSITION

I.I. Romanovska, Yu.A. Shesterenko, O.V. Sevastyanov, V.A. Toptikov
PHYSICO-CHEMICAL INSTITUTE BY O.V. BOHATSKY OF NAS OF UKRAINE, ODESSA

Summary

From *Agaricus bisporus* mushrooms, using the modified method, was isolated the partially purified tyrosinase (TYR) preparation with protein yield 0,67 mg/g of mushrooms, copper content 0,19 %, specific activity of 13 μmol purpurogallin /min · mg of protein and 500 U/min · mg of protein for pyrogallol and tyrosine, respectively. Using the SDS-PAGE-method, the composition of protein fractions in tyrosinase preparation was determined; it was shown that fraction with molecular mass 11,5 kDa (light subunit of TYR molecule) equals 27,4 %; fractions with molecular mass range 41-48 kDa (heavy subunit of TYR molecule) – 26,45 %; other fractions are represented by TYR isoforms and lumbur proteins. Native electrophoresis had revealed the presence of 17 protein fractions in isolated enzyme preparation, 12 of them possess the marked tyrosinase activity and constitute 92,5 % of the total protein.

KEY WORDS: tyrosinase, *Agaricus bisporus*, electrophoresis, protein fractionation.

Отримано 17.03.2008 р.

Адреса для листування: І.І. Романовська, Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАНУ, Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна.

ВИВЧЕННЯ ХРОНІЧНОЇ ТОКСИЧНОСТІ КОМБІНАЦІЇ 2,4-ДИХЛОРБЕНЗОЙНОЇ КИСЛОТИ, КОФЕЇНУ ТА КАРБАМАЗЕПІНУ

Т.В. Звягінцева, Л.Т. Киричок, Г.О. Сирова,
І.В. Трутаєв, С.І. Миронченко, Т.В. Горбач, Н.І. Горголь
ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Показано, що комбінація 2,4-дихлорбензойної кислоти, кофеїну та карбамазепіну при тривалому (30 днів) регулярному (кожен день) введенні у дозі 2 г/кг не викликає негативної резорбтивної дії на загальний стан тварин, ЦНС, роботу серця, клітинний склад і формулу крові, функції печінки, нирок, що підтверджують патоморфологічні дослідження внутрішніх органів щурів. Довготривале введення комбінації позитивно впливає на трофіку внутрішніх органів. Одержані дані свідчать про можливість безпечного застосування дослідженої комбінації.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: комбінація, 2,4-дихлорбензойна кислота, кофеїн, карбамазепін, хронічна токсичність, нешкідливість.

ВСТУП. Створення нових вітчизняних ефективних протибольових препаратів з протизапальною активністю є актуальною проблемою сучасної фармакології та фармації. Больові синдроми – одні з найбільш розповсюджених і часто призводять до втрати працездатності, інвалідизації [2]. Тому фармакологічна корекція болю є однією з найактуальніших проблем сучасної медицини. Відомо, що від болю різної інтенсивності та тривалості страждає майже 40 % населення [4]. Біль – головна скарга пацієнта при різноманітних запальних захворюваннях, а запалення як типовий патологічний процес – основа понад 70 % відомих хвороб людини [3, 9].

На сьогодні існує значний арсенал протибольових та протизапальних засобів [5, 11, 12, 15]. Але ризик побічної дії (гастротоксичність, нефротоксичність, гематотоксичність, гепатотоксичність тощо) зменшує коло пацієнтів, які підлягають лікуванню [10, 13, 14].

Застосування комбінованих препаратів сприяє тому, що призначення одного лікарського засобу забезпечує фармакотерапевтичний вплив на системи, які патогенетично пов'язані однією патологією [11]. Але при використанні комбінації може спостерігатись потенціювання не тільки фармакологічних ефектів, але й загальнотоксичного впливу окремих компонентів на життєво важливі функ-

© Т.В. Звягінцева, Л.Т. Киричок, Г.О. Сирова, І.В. Трутаєв, С.І. Миронченко, Т.В. Горбач, Н.І. Горголь, 2008.

ції організму або процеси, що пов'язані з детоксикацією препарату. Тому необхідно і доцільно дослідити нешкідливість нового комбінованого лікарського засобу.

Метою роботи було вивчити хронічну токсичність комбінації похідного 2,4-дихлорбензойної кислоти, кофеїну та карбамазепіну. За даними літератури, ці інгредієнти відносно низькотоксичні, однак їх поєднання у вигляді комбінації може несприятливо вплинути на нешкідливість комбінованого препарату.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди виконано на 20 статевозрілих щурах лінії Вістар обох статей масою 170-285 г, поділених на дві групи. Тварини 1-ї (контрольної) групи (10 щурів) одержували 3 % крохмальний слиз в об'ємі 2 мл/200,0, тварини 2-ї групи (10 щурів) – досліджену комбінацію у дозі 2 г/кг (із розрахунку 2 мл 20 % зависі препарату в 3 % крохмальному слизу на одного щура масою 200,0). Комбінацію та 3 % крохмальну завись вводили кожного дня протягом 30 днів внутрішньошлунково згідно з рекомендаціями Державного фармакологічного центру [8].

Вивчали стан серцево-судинної системи за допомогою електрокардіографа; рівень артеріального тиску на хвостовій артерії електроп'єзографічним методом; функціональний стан ЦНС за сумаційно-пороговим показником (СПП) та емоційно-поведінковими реакціями у "відкритому полі"; показники периферичної крові: кількість еритроцитів і вміст гемоглобіну

на еритрогемометрі, кількість лейкоцитів у камері Горяєва.

Щурів виводили з експерименту згідно з правилами гуманного ставлення до лабораторних тварин (Страсбург, 1985; Київ, 2001). Для визначення вагових коефіцієнтів внутрішні органи (головний мозок, легені, тимус, серце, печінка, селезінка, надниркові залози, нирки, гонади) важили, фрагменти цих органів, а також шлунка і тонкої кишки підлягали патоморфологічному дослідженню (фарбування гематоксилином-еозином та пікрофуксином за Ван Гізон). Після забою визначали вміст аскорбінової кислоти у внутрішніх органах. Функціональний стан печінки оцінювали за величиною в крові загального білка, глюкози, активністю лужної фосфатази (ЛФ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), аланінамінотрансферази (АлАТ), загальної лактатдегідрогенази (ЛДГ), застосовуючи набір реактивів фірми "La Smet" (Чехія). Функціональний стан нирок визначали за показниками добового діурезу, вмістом креатиніну та сечовини у сечі й крові. Одержаний цифровий матеріал оброблено статистично методом варіаційного ряду з урахуванням t-критерію Стьюдента при $p \leq 0,05$ [1, 6, 7].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Одержані дані свідчать про те, що досліджена комбінація,

яка містить 2,4-дихлорбензойну кислоту, карбамазепін і кофеїн (2 г/кг внутрішньошлунково протягом 1 місяця), не викликає загибелі щурів, не проявляє пошкоджувального впливу на їх загальний стан, масу тіла, роботу серця, ЦНС, клітинний стан крові, функції печінки і нирок, вагові коефіцієнти внутрішніх органів, не спричиняє патоморфологічних змін внутрішніх органів і не становить загрози при тривалому лікуванні.

Тварини добре переносили тривале введення дослідженої комбінації, харчова активність не змінювалась. Маса щурів збільшувалась, їх загибель була відсутня в обох групах. За станом трофіки внутрішніх органів (вагові коефіцієнти) (табл. 1) та С-вітамінного балансу (вміст аскорбінової кислоти в органах) піддослідні тварини не відрізнялись від контрольних (табл. 2), і навпаки, у групі щурів, які одержували досліджену комбінацію, спостерігався вищий рівень вмісту аскорбінової кислоти, що свідчило про активацію окисно-відновних процесів в органах.

Досліджена комбінація не впливала на ЧСС, не порушувала скорочувальну діяльність серця (зубець R), зберігала нормальний метаболізм міокарда (зубець T) і несуттєво – на 9 % – збільшувала рівень артеріального тиску.

Під впливом дослідженої комбінації стабілізувався СПП ($4,1 \pm 0,3$) проти ($5,0 \pm 0,2$) ім/с

Таблиця 1 – Вплив комбінації 2,4-дихлорбензойної кислоти, кофеїну та карбамазепіну на вагові коефіцієнти внутрішніх органів при вивченні хронічної токсичності

Досліджувані органи	Вагові коефіцієнти	
	Контрольна група	Дослідна група
Мозок	0,78±0,02	0,8±0,03
Серце	0,37±0,09	0,36±0,03
Печінка	3,60±0,06	5,3±0,2*
Підшлункова залоза	0,36±0,02	0,3±0,03
Селезінка	0,50±0,03	0,45±0,07
Тимус	0,09±0,01	0,10±0,01
Надниркові залози	0,010±0,001	0,013±0,001
Нирки	0,32±0,02	0,38±0,02
Гонади	0,34±0,07	0,38±0,09
Легені	1,2±0,06	1,06±0,05

Примітка. * – тут і далі $p \leq 0,05$ порівняно з контрольною групою.

Таблиця 2 – Вплив комбінації 2,4-дихлорбензойної кислоти, кофеїну та карбамазепіну на вміст вітаміну С в тканинах внутрішніх органів щурів при вивченні хронічної токсичності

Органи	Вміст аскорбінової кислоти, мг %	
	Контрольна група	Дослідна група
Серце	15,7±2,4	13,7±1,3
Печінка	27,9±2,3	22,8±2,1
Підшлункова залоза	26,0±2,6	20,4±1,2
Селезінка	17,9±1,9	20,1±2,4
Надниркові залози	268,8±15,1	267,5±15,1
Нирки	23,7±3,3	27,2±1,8
Кишечник	11,3±0,9	17,6±2,2*

Таблиця 3 – Вплив комбінації 2,4-дихлорбензойної кислоти, кофеїну та карбамазепіну на функціональний стан нирок щурів у хронічному досліді

Показники	Контрольна група	Дослідна група
Діурез, мл	6,3±0,6	7,7±2,2
Ваговий коефіцієнт нирок, %	0,32±0,02	0,38±0,02
Вітамін С в нирках, мг%	23,7±3,3	27,2±1,8
Креатинін крові, ммоль/л	0,033±0,002	0,033±0,001
Креатинін сечі, ммоль/л	6,16±0,3	5,58±0,2
Сечовина крові, ммоль/л	4,08±0,3	6,6±0,2*
Сечовина сечі, ммоль/л	401,9±7,9	391,8±9,3

Таблиця 4 – Вплив комбінації 2,4-дихлорбензойної кислоти, кофеїну та карбамазепіну на функціональний стан печінки щурів у хронічному досліді

Показники	Контрольна група	Дослідна група
Ваговий коефіцієнт печінки, %	3,6±0,06	5,3±0,2*
Вітамін С в печінці, мг%	27,9±2,3	22,8±2,1
Загальний білок, г/л	77,62±1,2	71,55±0,8*
АсАТ, мк катал/л	0,25±0,02	0,28±0,015
АлАТ, мк катал/л	0,21±0,01	0,42±0,02*
ЛФ, мк катал/л	1,35±0,05	1,73±0,08*
ЛДГ, мк катал/л	1,76±0,12	2,13±0,06*
Глюкоза, ммоль/л	5,12±0,15	5,18±0,25

на початку досліді), але, порівняно з контролем ((6,0±0,2) імп/с), сумарна здатність нервової системи активувалась ($p < 0,05$). У тварин протягом досліді зберігалась горизонтальна рухова активність і проявлялась тенденція до підвищення вертикальної рухової активності (число вставань 2,7±1,0 проти 1,8±1,0 на початку досліді). Кількість обстежених отворів знижувалась і складала 0,7±0,1 проти 1,3±0,3, а порівняно з контролем (0,2±0,1) статистично вірогідно збільшувалась (30-й день). З емоційних реакцій відмічали достовірне підсилення уринацій на 15-й день досліді (0,9±0,1) порівняно з вихідними даними (0,3±0,1) і тенденцію до підсилення дефекації наприкінці досліді (0,14±0,1) порівняно як з контролем (0,4±0,2), так і з вихідним фоном (0,6±0,2).

Введення дослідженої комбінації не впливало на клітинний склад крові: у щурів зберігалась тенденція до зниження кількості лейкоцитів – $6,9 \pm 1,3 \cdot 10^9/\text{л}$ проти $7,9 \pm 0,5 \cdot 10^9/\text{л}$ (вихідний фон), а зміни з боку сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів і моноцитів були менш виражені. Усі зміни не виходили за межі видової норми, відображали відому залежність клітинного складу крові від віку, статі, утримання тварин, тому можна вважати, що до-

сліджена комбінація не впливає негативно на кров, що узгоджується з патоморфологічними дослідженнями селезінки. При введенні комбінації були відсутні зміни з боку інтегральних показників; статистично вірогідно збільшувався вміст сечовини в крові на фоні нормального рівня інших показників видільної функції нирок (табл. 3).

Відмічені зсуви з боку показників функціонального стану печінки (табл. 4) можуть бути пояснені збільшенням проникності цитоплазматичних мембран, що підтверджено патоморфологічними даними, які відображають також і посилення в печінці регенераторних процесів.

ВИСНОВКИ. 1. Комбінація 2,4-дихлорбензойної кислоти, кофеїну та карбамазепіну (2 г/кг внутрішньошлунково щоденно протягом 1 місяця) не викликає загибелі щурів, не впливає негативно на загальний стан тварин, їх масу тіла і трофіку, роботу серця, ЦНС, клітинний склад крові, функції печінки і нирок, про що свідчать дані фізіологічних, біохімічних і патоморфологічних дослідів.

2. При тривалому застосуванні (1 місяць) досліджена комбінація активує природні процеси біотрансформації в печінці й не змінює елімінацію у нирках.

ЛІТЕРАТУРА

1. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Л., 1963. – 150 с.
2. Богачик О., Светличная Н. Анализ фармацев-

- тического рынка нестероидных противовоспалительных средств и анальгетиков-антипиретиков в Украине // Провизор. – 1998. – № 5. – 18 с.
3. Курт Сигизмунд. Симптом и болезнь //

Pharmedicum. – 1995. – № 1. – С. 3.

4. Мамчур В.Й., Опришко В.І., Жилюк В.І. Патологічний стан головного мозку змінює антиноцицептивну дію ненаркотичних анальгетиків // Ліки. – 2000. – № 1-2. – С. 13-16.

5. Румянцева С.А. Современные концепции терапии ксефокамом радикулярных болевых синдромов // Русский медицинский журнал. Неврология и психиатрия. – 2003. – 11, № 25. – С. 1385-1389.

6. Саночкий И.В. Токсикометрия. – М., 1980. – С. 56-57.

7. Сидоров К.К. Токсикология новых промышленных химических веществ. – М.: Медицина, 1973. – Вып. 3. – 47 с.

8. Стефанов О.В. (ред.). Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації. К., 2001. – С. 84-90.

9. Трещинский А.И., Гсивая Л.В., Глумчер Ф.С. Нестероидные обезболивающие противовоспалительные средства. – К.: Вища школа, 1996. – 80 с.

10. Caghman J.N. The mechanism of action of NSAIDs in analgesia // Drugs. – 1996. – 52. – P. 13-23.

11. Catella-Lawson F. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 1999. – № 289. – P. 735-741.

12. Jannedohloand E.-L., Yue Q.-Y. Coxibs and the reporting of adverse reactions // Medical Products Agency. – 2000. – № 11. – P. 74-77.

13. Kolaczowska E. Cyclooxygenases I. Role in inflammation // Cell Biology. – 2002. – № 29. – P. 533-554.

14. Kolaczowska E. Cyclooxygenases. II. Non-steroidae anti-inflammatory drugs as their inhibitor // Cell Biology. – 2002. – № 29. – P. 555-578.

15. Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M. Cyclooxygenases 1 and 2 // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1998. – № 38. – P. 97-120.

ИЗУЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ КОМБИНАЦИИ 2,4-ДИХЛОРБЕНЗОЙНОЙ КИСЛОТЫ, КОФЕИНА И КАРБАМАЗЕПИНА

Т.В. Звягинцева, Л.Т. Киричек, А.О. Сыровая,
И.В. Трутаев, С.И. Миронченко, Т.В. Горбач, Н.И. Горголь
ХАРЬКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Показано, что комбинация 2,4-дихлорбензойной кислоты, кофеина и карбамазепина при длительном (30 дней) регулярном (ежедневном) введении в дозе 2 г/кг не вызывает негативного резорбтивного действия на общее состояние животных, ЦНС, работу сердца, клеточный состав и формулу крови, функции печени, почек, что подтверждают патоморфологические исследования внутренних органов крыс. Длительное введение комбинации положительно влияет на трофику внутренних органов. Полученные данные свидетельствуют о возможности безопасного применения исследованной комбинации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: комбинация, 2,4-дихлорбензойная кислота, кофеин, карбамазепин, хроническая токсичность, безвредность.

RESEARCH OF CHRONIC TOXICITY OF COMBINATION OF 2,4-DICHLORBENZOIC ACID WITH CARBAMAZEPINUM AND COFFEINUM

T.V. Zvyahintseva, L.T. Kyrychok, H.O. Syrova, I.V. Trutayev,
S.I. Myronchenko, T.V. Horbach, N.I. Horhol
KHARKIV STATE MEDICAL UNIVERSITY

Summary

It was shown that the combination of 2,4 dichlorbenzoic acid, coffeinum and carbamazepinum in a regular dose 2 g/kg daily for 30 days doesn't have any negative resorption effect on animals' general condition, CNS function, cardiac activity, blood formula and cellular contents, renal and hepatic functions. Such effects have been confirmed by pathomorphological investigations of rats, internal organs. Long-term using of such combinations has positive influence on trophics of internal organs. The data obtained show that the investigated combination can be used safely.

KEY WORDS: combination, 2,4-dichlorbenzoic acid, coffeinum, carbamazepinum, chronic toxicity, safety.

Отримано 28.01.2008 р.

Адреса для листування: Т.В. Звягинцева, Харківський державний медичний університет, просп. Леніна, 4, Харків, 61022, Україна.

ВПЛИВ ГЛЮКСИРЕНУ НА ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НЕФРИТУ ХЕЙМАНА В ЩУРІВ

І.І. Шевцов

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Досліджено вплив нового потенційного діуретика "Глюксирен" в дозі 37,1 мг/кг (ЕД₅₀) на перебіг експериментального нефриту Хеймана у щурів. Доведено ефективність субстанції при лікуванні нефриту, збільшення тривалості життя тварин, позитивний вплив на артеріальний тиск і вміст загального білка крові, перебіг оксидантного стресу в тканині нирок внаслідок зниження концентрації гідроперекисей і малонового діальдегіду в сироватці крові й гомогенаті нирок, зменшення співвідношення активності СОД/КАТ в досліджуваних структурах.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: глюксирен, діуретик, нефрит Хеймана, антиексудативна, антиоксидантна активність.

ВСТУП. Хронічний гломерулонефрит продовжує залишатись нагальною проблемою сучасної медицини. Тому актуальним є пошук нових засобів, ефективних при лікуванні цієї хвороби. Одна з основних ланок патогенезу хронічного гломерулонефриту – мембранно-деструктивний процес в нирковій тканині з вираженими явищами ексудації в гломерулах, поява яких може бути зумовлена як порушенням функціональної активності антиоксидантної захисної системи організму, так і надлишковим утворенням вільних кисневих радикалів, що призводить до підвищення проникності судинної стінки, як при будь-якому запальному процесі. Активні радикали кисню, як відомо [10], здатні порушувати структуру і функції макромолекул, що і зумовлює розвиток окиснювального стресу в клітинах та, як наслідок, може викликати численні первинні порушення в клітинах. Новий потенційний діуретик "Глюксирен" є перспективною лікарською речовиною, яка проявляє, окрім сечогінної дії, антиоксидантну, антигіпоксичну, антиексудативну та протимікробну активність [1, 7]. Для впливу на патогенез хронічного нефриту необхідний саме такий спектр ефектів. Тому ми вирішили дослідити ефективність застосування глюксирену при лікуванні експериментального хронічного нефриту.

Основною метою експерименту стала порівняльна оцінка параметрів системи антиоксидантного захисту та порушення обміну

© І.І. Шевцов, 2008.

ліпідів і білків у сироватці крові та нирках експериментальних тварин з хронічним нефритом до і після лікування глюксиреном.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експеримент проводили на 3 групах нелінійних щурів-самців масою 160,0-180,0 г по 10 тварин у кожній: 1-ша група – інтактні тварини; 2-га – щури з хронічним нефритом без лікування; 3-тя – щури, яким 1 раз на день внутрішньошлунково вводили глюксирен в ЕД₅₀ (37,1 мг/кг). Модель хронічного нефриту викликали за методикою W. Neumann, S. Hunter, D.J. Hacrel (1962) в модифікації А.М. Віхерт, Р.І. Соколової, К.Н. Биковської [2], вдосконаленою нами. Тварин імунізували 20 % емульсією кіркового шару нирок спільно з повним стимулятором Фрейнда у співвідношенні 1:1. Для отримання тканинного антигену нирки щурів після промивання методом перфузії стерильним фізіологічним розчином розтирали в гомогенізаторі з фізіологічним розчином у співвідношенні 5:1. Імунізацію тварин проводили одноразово в дозі 1 мл по 0,2 мл в 5 ділянках тіла тварини: в природні складки тіла і внутрішньоочеревинно. Щури контрольної групи були евтаназовані на 3, 6, 14, 21 доби після введення глюксирену, а також через 3 тижні після імунізації. Досліджували основні ферменти-антиоксиданти супероксиддисмутази (СОД) [4] і каталази (КАТ) [5], а також гідроперекиси і малоновий діальдегід (МДА) [8]. Активність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) аналізували за вмістом субстанцій в си-

роватці крові й постмітохондріальному супернатанті нирок, попередньо відмитих від крові в охолодженому 0,9 % розчині хлориду натрію [9] в ході експерименту до та після лікування гліоксиреном, спостерігали за загальним станом тварин, вимірювали артеріальний тиск (АТ) [6], проводили клінічні аналізи сечі.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Після закінчення імунізації тварини не з'їдали добову норму кормів, худнули, ставали малорухливими, шерсть втрачала свій звичайний блиск та набувала жовтого кольору. В сечі хворих тварин з'явилися білок від 0,66 до 2 % та вилужені еритроцити. Артеріальний тиск до кінця першого місяця підвищився на 35-40 мм рт.ст. Рівень білка в сечі збільшився до 5-11 %. В осаді сечі було виявлено гіалінові та зернисті циліндри. У щурів виникли набряки на передній частині голови та лапках, у 40 % тварин розвинувся асцит. З 10 щурів дослідної групи, без лікування, загинуло 70 % щурів (7 тварин з 10). При визначенні активності основних ферментів-антиоксидантів було встановлено, що при нефриті без лікування рівень активності каталази сироватки крові та нирок різко знижувався майже в 2 рази порівняно з контрольними тваринами. В свою чергу, активність СОД віро-

гідно зростала (в 1,3 раза) в нирках та мала тенденцію до збільшення (на 5 %) в сироватці крові щурів з хронічним нефритом (табл. 1).

Відомо, що підвищення співвідношення активності СОД/КАТ є однією з ознак окиснювального стресу в клітинах. Дисбаланс активності цих ферментів призводить до накопичення активних форм кисню (зокрема, перекису водню) і виходу їх у міжклітинний простір та плазму крові. Міграція активних форм кисню від місця утворення може стати ще одним з додаткових факторів ініціації процесів окиснювальної деструкції біополімерів тканин, особливо ліпідів. Під час оцінювання ПОЛ при експериментальному нефриті за вмістом МДА показано вірогідне підвищення його концентрації в нирках та сироватці крові хворих тварин (див. табл. 1). Таким чином, виявлене нами більш ніж 4-разове зростання вмісту малонового діальдегіду в тканині нирок тварин, хворих на нефрит ((139,08±13,07) нмоль/г), порівняно з щурами контрольної групи ((27,15±2,38) нмоль/г) свідчить про активацію перекисних процесів в уражених тканинах. Дані процеси відбувалися на фоні вірогідного зниження вмісту загального білка в тканині нирок та сироватці крові дослідних тварин. Як видно, отримані нами дані можна пояснити тим, що окиснювальна моди-

Таблиця 1 – Вплив гліоксирену на показники ПОЛ і активність антиоксидантних ферментів за умов хронічного нефриту ($\bar{x} \pm S_x$)

Умови досліджу	Строки забору матеріалу	Вміст продуктів ПОЛ у сироватці крові		Активність ферментів				Показники	
		Гідроперекиси ОД ₄₈₀	Малоновый діальдегід, нмоль/г	в гомогенаті нирок		в сироватці крові		АТ, мм рт.ст.	Загальний білок крові, г/л
				СОД, ум. од./г	каталаза, ум. од./г/хв	СОД, ум. од./мл	каталаза, мкат/мл		
Інтактні щури		0,186±0,013	27,15±2,38	699,9±164,6	836,4±262,7	13,67±4,84	14,46±3,80	108,0±1,3	58,67±0,83
Хронічний нефрит нелікований (контроль)	через 3 тижні	0,255±0,018*	139,08±13,07*	904,9±180,2	387,9±207,4*	14,08±3,92	12,29±3,62*	132,0±1,4*	51,94±0,91*
Хронічний нефрит, лікований гліоксиреном	через 3 дні лікування	0,249±0,016*	130,04±12,08*	890,1±178,2	365,9±206,8*	13,98±3,02	11,90±2,90	128,0±1,2*	51,00±0,89*
Хронічний нефрит, лікований гліоксиреном	через 6 днів лікування	0,232±0,018*	119,06±13,00*	860,3±168,2	596,8±250,4	14,00±2,68	13,02±2,58	126,0±1,6**	52,32±0,82*
	через 14 днів лікування	0,208±0,027**	49,41±4,95**	773,8±172,4	779,6±258,3	13,92±4,09	14,16±3,94	118,0±1,9**	53,29±0,72*
	через 21 день лікування	0,192±0,014**	28,25±2,30**	710,0±160,2	821,2±260,6**	13,61±4,68	14,00±3,68	110,0±1,2**	57,8±0,78**

Примітка. * – p<0,05 порівняно з інтактними тваринами; ** – p<0,05 порівняно з нефритом без лікування.

фікація білків призводить до їх агрегації або фрагментації. Такі окиснювальні білки стають субстратом для протеолітичних ферментів, що і зумовлює зниження концентрації загального білка [3].

Через 3 дні лікування хронічного нефриту гліоксиреном нами виявлено покращення загального стану тварин, артеріальний тиск практично нормалізувався. Клінічний аналіз сечі показав, що зникли гіалінові та зернисті циліндри і спостерігалася незначна кількість білка. Відзначено вірогідне ($p < 0,05$) зниження концентрації МДА в 1,06 раза, СОД і КАТ в сироватці крові й гомогенаті нирок в 1,01 і 1,06 раза відповідно. Зменшення вмісту гідроперекисей, показників АТ і загального білка було статистично невірогідним. З 3-го по 6-й день лікування концентрація гідроперекисей знизилась в 1,07 раза, вміст МДА зменшився в 1,09 раза, СОД – в 1,03 раза, КАТ – в 1,09 раза. З 6-го по 14-й день стан тварин продовжував покращуватися, що відбивалося і на результатах аналізів сироватки крові й гомогенату нирок: концентрація гідроперекисей зменшувалася в 1,2 раза, МДА – 2,4 раза, а порівняно з нелікованим нефритом – в 2,82 раза. Таку ж тенденцію ми спостерігали і з вмістом антиоксидантних ферментів. Так, СОД в гомогенаті нирок з 6-го по 14-й день лікування гліоксиреном зменши-

лася в 1,1 раза, КАТ – в 1,3 раза, а в сироватці крові СОД і КАТ знизились в 1,01 і 1,08 раза відповідно. На 21-й день лікування гліоксиреном вміст продуктів ПОЛ і антиоксидантних ферментів наближався до рівня інтактного контролю (див. табл. 1). Зменшення співвідношення активності СОД/КАТ в процесі лікування нефриту гліоксиреном свідчило про зниження, а надалі й про відсутність окиснювального стресу в тканині нирок. Артеріальний тиск та кількість загального білка крові до цього строку лікування нормалізувалися (див. табл. 1). Слід також відзначити, що в групі щурів, лікованих гліоксиреном, загинула одна тварина (10 %) в перші 3 дні лікування, інші 9 щурів (90 %) залишалися живими до кінця експерименту.

ВИСНОВКИ. 1. Гліоксирен в дозі 37,1 мг/кг (ED_{50}) ефективний при лікуванні хронічного нефриту.

2. В процесі лікування гліоксирен зменшує вміст гідроперекисей і малонового діальдегіду в сироватці крові й гомогенаті нирок, співвідношення активності СОД/КАТ в досліджуваних структурах, нормалізує артеріальний тиск і вміст загального білка крові.

3. Гліоксирен збільшує тривалість життя експериментальних щурів з хронічним нефритом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Березнякова М.Є., Торянік Е.Л., Шевцов І.І., Болотов В.В. Антиоксидантна активність нового похідного 2-оксоіндолін-3-гліоксилової кислоти // Пробл. екол. та мед. – 2005. – **9**, № 3-4. – С. 14-16.
2. Вихерт А.М., Соколова Р.И., Быковская К.Н. Экспериментальная модель аутоиммунного гломерулонефрита // Арх. патологии. – 1973. – **35**, № 11. – С. 15-21.
3. Колб В.Г., Камышников В.С. Определение белковых фракций турбидиметрическим методом // В кн.: Клиническая биохимия. – Мн.: Беларусь, 1986. – С. 21-24.
4. Костюк В.А., Попович А.Н., Ковалева Ж.В. Простой чувствительный метод для определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. – 1990. – **36**, № 2. – С. 88-91.
5. Меерсон Ф.З. Роль перекисного окисления липидов в патогенезе ишемического повреждения

и антиоксидантная защита сердца // Кардиология. – 1982. – № 2. – С. 89-93.
6. Саркисов Д.С., Ремезов П.И. Воспроизведение болезней человека в эксперименте. – М.: Медицина, 1960. – С. 221-222.
7. Шевцов І.І., Торянік Е.Л., Березнякова М.Є. Вплив ефіру – нового похідного 2-оксоіндолін-3-гліоксилової кислоти на видільну функцію нирок після водного і сольового навантаження // Одес. мед. журн. – 2005. – № 5 (91). – С. 34-35.
8. El-Saadani M., Esterbauer H., Sayed M. A spectrophotometric assay for lipid peroxides in serum lipoproteins using a commercially available reagent // J. Lipid Res. – 1989. – **30**. – P. 627-630.
9. Flercher B.L., Dillard C.J., Tappel A.Y. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues // Anal. Biochem. – 1973. – **52**, № 5. – P. 1-9.
10. Fulbert J.S., Cals M.J. Free radicals and clinical biology // Pathologic Biology. – 1992. – №1. – P. 66-67.

ВЛИЯНИЕ ГЛИОКСИРЕНА НА ТЕЧЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО НЕФРИТА ХЕЙМАНА У КРЫС

И.И. Шевцов

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Исследовано влияние нового потенциального диуретика "Глиоксирен" в дозе 37,1 мг/кг (ED_{50}) на течение экспериментального нефрита Хеймана у крыс. Доказано эффективность субстанции при лечении нефрита, увеличение длительности жизни животных, положительное влияние на артериальное давление и содержание общего белка крови, течение оксидантного стресса в ткани почек вследствие снижения концентрации гидропероксидов и малонового диальдегида в сыворотке крови и гомогенате почек, уменьшение соотношения активности СОД/КАТ в исследуемых структурах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глиоксирен, диуретик, нефрит Хеймана, антиэкссудативная, антиоксидантная активность.

INFLUENCE OF GLYOXIREN ON COURSE OF EXPERIMENTAL HAYMANN NEPHRITIS AT RATS

I.I. Shevtsov

NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

Influence of new potential diuretic "Glyoxiren" in a doze 37,1 mg/kg (ED_{50}) on the course of experimental Haymann nephritis at rats was researched. Efficiency of a substance in treatment of nephritis, increase in duration of animal life, positive influence on arterial pressure and the maintenance of the general blood protein, course of oxidation stress in a tissue of kidneys owing to reduction in concentration of hydroperoxides and malonic dialdehyde in blood serum and kidney homogenate, reduction in ratio of SOD/CAT activity in researched structures was proved.

KEY WORDS: glyoxiren, diuretic, Haymann nephritis, antiexudation, antioxydation activity.

Отримано 11.03.2008 р.

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

**Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua**

УДК 616.342-002.44-02:612.015.11:616.12-008.3]-085.322

ДОСЛІДЖЕННЯ КОРЕЛЯЦІЙНИХ ЗВ'ЯЗКІВ МІЖ ПАРАМЕТРАМИ АЕРОБНОГО МЕТАБОЛІЗМУ ТА ВАРІАБЕЛЬНОСТІ РИТМУ СЕРЦЯ У ХВОРИХ НА ПЕПТИЧНУ ВИРАЗКУ ДВАНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ: ЕФЕКТ ОЛІЇ З НАСІННЯ АМАРАНТУ

О.П. Єлісеєва, А.П. Черкас, Д.В. Камінський, Х.О. Семен
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

У роботі вивчені кореляційні зв'язки між параметрами аеробного метаболізму та варіабельності серцевого ритму (ВСР) у хворих на пептичну виразку дванадцятипалої кишки до лікування, після стандартної і модифікованої (з додаванням олії з насіння амаранту (ОАм)) схем лікування. Вираховували коефіцієнти лінійної кореляції (r) та їх достовірність (p). Найбільш виражені кореляції (прямі) виявлено між більшістю параметрів ВСР та активністю супероксиддисмутази (СОД), що свідчить про важливу роль пригнічення активності даного ферменту в зниженні ВСР. Використання стандартної потрібної схеми лікування посилило ці тенденції. Застосування ОАм забезпечило активацію аеробного обміну через формування помірної прооксидантної ситуації і модуляцію кореляційних зв'язків: домінування прямих між параметрами ВСР і активністю СОД (до та після стандартного лікування) змінилося на переважно зворотні між параметрами ВСР і рівнем ТБК-активних продуктів. Таким чином, вищу ВСР виявлено у хворих з ефективнішою утилізацією продуктів ліпопероксидації, що є необхідною умовою підвищення стресостійкості організму.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **варіабельність серцевого ритму, аеробний метаболізм, кореляційний аналіз, олія амаранту, окисний стрес, пептична виразка.**

ВСТУП. Варіабельність серцевого ритму (ВСР), як традиційно вважається, відображає активність механізмів, які регулюють діяльність системи кровообігу. Параметри ВСР поділяють на часові (стандартне відхилення нормальних RR інтервалів (SDNN), корінь квадратний середньої від квадратів різниці послідовних RR інтервалів (RMSSD), відсоток більшої ніж 50 мс різниці між послідовними кардіоінтервалами (pNN50)) та спектральні (загальна спектральна потужність (TP, 0,01-0,40 Гц), потужність хвиль високої (HF, 0,15-0,40 Гц), низької (LF, 0,04-0,15 Гц) та дуже низької частоти (VLF, 0,01-0,04 Гц)). Встановлено, що SDNN, RMSSD, pNN50 та HF відображають активність переважно парасимпатичної, SDNN та LF – симпатичної, а VLF – кортикальної та гуморальної ланок регуляції. Окрім оцінки активності нейрогуморальної та автономної систем регуляції, зниження ВСР вважається достовірним і незалежним фактором ризику раптової коронарної смерті, прогностичним критерієм у хворих після інфаркту міокарда [23], надійним методом

© О.П. Єлісеєва, А.П. Черкас, Д.В. Камінський, Х.О. Семен, 2008.

оцінки тяжкості автономної нейропатії серця у хворих на цукровий діабет [37] тощо. З кожним роком кількість наукових публікацій, що стосуються ВСР, стрімко зростає і розширюється спектр застосування цієї доступної неінвазивної технології. З'являються результати досліджень взаємозв'язків ВСР із багатьма функціями організму – порушенням моторної функції та толерантністю до аеробних навантажень у хворих, які перенесли гострі розлади мозкового кровообігу [31], надмірна симпатична активність асоціюється із підвищенням рівня лептину в крові пацієнтів з ожирінням [19], зниження ВСР може відображати ознаки психоемоційного стресу, свідчити про синдром перетренованості у спортсменів [22]. Останнім часом показано кореляційні взаємозв'язки ВСР із параметрами в'язкості крові [24]. Отже, трактування результатів дослідження ВСР лише як відображення активності систем регуляції (переважно автономної) є неповним і, на нашу думку, не враховує чутливість синусового вузла до впливів, залежних від метаболічного стану організму, а саме: інтенсивності окисно-відновних реакцій, енергетичного та мембранного

потенціалів клітин організму і провідної системи серця. Ефективний аеробний метаболізм (висока інтенсивність окисно-відновних реакцій, насамперед в дихальному ланцюзі мітохондрій, внутрішньоклітинні флуктуації кисню метаболічного походження, краща утилізація продуктів окисної деструкції макромолекул) забезпечує вищу спряженість катаболічної та анаболічної фаз обміну, а отже, зростання енергетичного та мембранного потенціалів [14]. На фізіологічному рівні це проявляється зменшенням ЧСС з одночасним підвищенням ВСР (переважно за рахунок активності парасимпатичних впливів), а отже, оптимізацією функції системи кровообігу. Підходи до метаболічної інтерпретації ВСР [4, 13] розширюють уявлення про природу коливань ритму серця і відкривають нові перспективи застосування цієї методики в науково-практичній роботі. Серед них індивідуальна оцінка функціонально-метаболічного резерву організму та контроль за ефективністю використання засобів корекції аеробного обміну є, на нашу думку, надзвичайно актуальними. Звертає на себе увагу те, що чинники, які підвищують/знижують ВСР, аналогічним чином впливають на енергетичну функцію мітохондрій (омега-3 поліненасичені жирні кислоти, інтервальне гіпоксичне тренування, олія амаранту, помірні фізичні навантаження, короткотермінове обмеження калорійності дієти – позитивно, а цукровий діабет, ішемічна хвороба серця, запальні процеси, інші тяжкі захворювання, вік, фізичне виснаження тощо негативно).

Пептична виразка дванадцятипалої кишки (ПВДПК) є захворюванням із мультифакторним патогенезом, у якому важливу роль відіграють мікробний чинник (*Helicobacter pylori*), запалення, що спричиняє порушення мікроциркуляції, тканинну гіпоксію та розвиток окисного стресу і проявляється порушенням балансу в системі “пероксидне окиснення ліпідів/антиоксидантний захист” [10, 21]. Одночасно у більшості хворих спостерігається зниження ВСР, зокрема компонент, які відображають автономні впливи (LF- та HF-хвиль) [9, 15, 17]. Індивідуальна стійкість до окисного стресу визначає результат взаємодії організму з ульцерогенними чинниками, і її підвищення є необхідною умовою ефективного лікування. До перспективних засобів, здатних підвищувати стійкість організму до окисного стресу, належать природні, рослинного походження олії, серед яких олія з насіння амаранту (ОАм) має виражені цитопротекторні властивості [7]. Унікальність хімічного складу цієї олії пов’язана з наявністю, поряд із ліноленою (ЛК), оле-

їною та пальмітиною кислотами, таких міночних компонентів, як сквален, токофероли, токотрієноли, каротиноїди, фітостероли тощо з високою біологічною активністю [20, 41]. Синергізм впливу даних компонентів забезпечує багатогранність метаболічних ефектів ОАм: омега-3 міметична дія [25], активація PPAR-рецепторів (стимуляція пероксисомального окиснення) [26], вплив на регуляцію запалення (модуляція метаболізму простагландинів через збільшення співвідношення простагландинів I₃/тромбоксан A₂) [39], антигелікобактерна активність поліненасичених жирних кислот [28, 36], помірні прооксидантна дія [5, 6], ліпідознижуючий, антиатерогенний, антиоксидантний ефекти [20, 32]. Таким чином, метою нашої роботи було встановлення можливих взаємозв’язків між параметрами ВСР та аеробного метаболізму у хворих на ПВДПК, а також їх зміни після лікування із застосуванням стандартної та модифікованої (з додаванням ОАм) схем.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Обстежено 28 хворих на ПВДПК (вік – (32,2±2,2) років). Усім обстеженим (1-ша група) проведено ендоскопію з біопсіями слизової оболонки шлунка. Інфікованість *H. pylori* визначали за допомогою уреазного тесту та гістологічним методом до і через 4-5 тижнів після проведеного лікування. Хворі 7 днів отримували стандартне потрійне лікування за Маастрихтським консенсусом II 2000 р. Після ерадикації всіх пацієнтів поділили на дві групи. Хворі 2-ї групи (n=12) протягом післяерадикаційного періоду (4 тижні) приймали препарат із групи інгібіторів протонної помпи “Лансопразол” (30 мг на ніч). Хворі 3-ї групи (n=12), крім вказаного препарату, приймали концентровану ОАм (1 мл конц. олії/60 кг маси) 1 раз на добу натще щоденно. Олія для досліджень надана НВФ “Даніка” (Харків, Україна). Активність каталази (КАТ) (М.А. Корольок и др., 1988), супероксиддисмутази (СОД) (В.А. Костюк и др., 1990), рівні продуктів, що зв’язуються з тіобарбітуровою кислотою (ТБК-АП) (Р.А. Тимирбулатов, В.И. Селезнев 1986), гідропероксидів (ГП) (В.Б. Гаврилов, М.И. Мишкорудная, 1983), ліпопротеїнів низької густини (β-ЛП) (А.Н. Климов, 1966), окисномодифікованих білків (ОМБ) (Е.Е. Дубинина и др., 1995) та середньомолекулярних пептидів (СМП) (Н.И. Габриелян, 1984) визначали спектрофотометрично у сироватці крові. Часові та спектральні параметри ВСР – за допомогою комп’ютерного електрокардіографа “ВНС-Мікро”, Нейрософт® (Росія), відповідно до міжнародних стандартів [29]. Для

оцінки взаємозв'язків параметрів аеробного метаболізму та ВСП використовували коефіцієнти лінійної кореляції (r) та їх достовірність (p), обрахунки здійснювали із застосуванням програмного пакета MATLAB (версія R2006a). Роботу було погоджено з Етичною комісією Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Інформовану згоду отримано від усіх обстежуваних осіб перед початком дослідження.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як показано нами, у хворих на ПВДПК типовими є ознаки окисного стресу на рівні слизової оболонки шлунка (значне нагромадження вторинного продукту ліпопероксидації – 4-гідроксіноненалу, маркера окисного стресу, в ядрах клітин власних залоз) [16, 42], а також на рівні організму (за параметрами, які характеризують стан системи “прооксиданти/антиоксиданти”) у сироватці крові [11]. Було встановлено підвищення рівня первинних продуктів ліпопероксидації гідропероксидів та $ОМБ_{430}$ на тлі співмірних із нормальними значеннями активності каталази, СОД та рівня ТБК-АП і $ОМБ_{370}$. Зіставивши ці результати з істотно зменшеним вмістом обох фракцій СМП, порівняно зі здоровими особами, тенденцією до збільшення β -ЛП, можна говорити про низьку інтенсивність окис-

но-відновних реакцій і, як наслідок, про пригнічення протеолізу [11]. Слід відзначити, що нагромадження продуктів окисної деструкції є результатом не стільки їх надмірного утворення, скільки недостатньої утилізації [14]. Нами також показано, що поглиблення окисного стресу і пов'язаних з ним метаболічних порушень супроводжується зниженням основних параметрів ВСП [3, 5, 17], однак особливості механізмів такого взаємозв'язку на сьогодні не є чітко зрозумілими і потребують вивчення.

У ході досліджень кореляційних зв'язків між параметрами аеробного метаболізму та ВСП у хворих на ПВДПК було виявлено певні закономірності (табл. 1). Щодо активності СОД встановлено найбільшу кількість таких зв'язків: прямі й достовірні зв'язки для показників, які характеризують парасимпатичну активність (RMSSD, pNN50 та HF), причому як у фоновій, так і в ортостатичній пробі. Разом із тим, негативна кореляція з ЧСС (достовірна під час ортостатичної проби) підтверджує виявлені тенденції. Таким чином, вища ВСП у групі хворих підтримується через активацію СОД. Однак негативна кореляція з коефіцієнтом реактивності $K_{30/15}$ свідчить про залучення переважно центральних та симпатичних регуляторних механізмів у підтримання ВСП за умов окисного стресу. Щодо каталази виявлено лише пряму

Таблиця 1 – Коефіцієнти лінійної кореляції між параметрами ВСП та аеробного метаболізму у хворих на ПВДПК до лікування (n=28)

	КАТ	СОД	ТБК-АП	ЛП	ГП	СМП ₂₅₄	СМП ₂₈₀	ОМБ ₃₇₀	ОМБ ₄₃₀
Фонові проба									
ЧСС	-	-0,355	-	-	-	-	-	-	-
SDNN	-	0,370	-	-	-	-	0,378*	-	0,359
RMSSD	-	0,489*	-	-	-	-	-	-	-
pNN50	-	0,472*	-	-	-	-	-	-	-
TP	-	0,324	-	-	-	-	-	-	-
VLF	-0,373	-0,322	-	-	-	-	0,314	-	0,323
LF	-	-	-	-	-	-	0,358	-	0,368
HF	-	0,590**	-	-	-	-	-	-	-
LF/HF	0,558**	-	-	-	-	-	-	0,334	-
Ортостатична проба									
ЧСС	-	-0,375*	-	-	-	-	-	-0,394*	-0,352
SDNN	-	0,346	-	-	-	0,394*	0,395*	-	0,453*
RMSSD	-	0,516**	-	-	-	-	0,330	-	0,496**
pNN50	-	0,580**	-0,336	-	-	-	-	-	-
$K_{30/15}$	-	-0,409*	-	-	-	0,548**	0,556**	-	0,403*
TP	-	0,348	-	-	-	0,314	-	-	0,327
VLF	-0,563**	-	-	-	-	-	-	-	-
LF	-	0,315	-	-	-	0,355	-	-	-
HF	0,359	0,477*	-	-	-	-	-	-	-
LF/HF	-	-0,336	-	-	-0,366	-	-	-	-

Примітка. Тут і в наступних таблицях: коефіцієнт кореляції $r < 0,3$ до уваги не брали (-); * – коефіцієнт кореляції достовірний ($p < 0,05$); ** – коефіцієнт кореляції достовірний ($p < 0,01$); *** – коефіцієнт кореляції достовірний ($p < 0,001$).

кореляцію із автономним балансом LF/HF ($p < 0,01$) та обернену з потужністю VLF-хвиль під час ортостатичної проби ($p < 0,01$), що може вказувати на роль модуляції активності цього ферменту у підтриманні певного потоку пероксиду водню, який, як було встановлено [27, 40], відповідає за тривалість відкриття K^+ -каналів у мембранах хеморецепторів каротидного синуса. Це зменшує аферентну стимуляцію дихального центру, що сприяє підвищенню тону парасимпатичної ланки автономної нервової системи і, як наслідок, зниженню ЧСС з одночасним наростанням ВСР, насамперед завдяки HF-коливанням. Слід зазначити, що для ефективного функціонально-метаболического стану здорової людини характерна саме фізіологічна синусова (дихальна) брадиаритмія [1, 4, 6].

Цікаво, що для ТБК-АП, β -ЛП та ГП у хворих на ПВДПК до лікування жодних достовірних кореляцій з параметрами ВСР не виявлено. Разом із тим, $СМП_{280}$ достовірно і прямо корелює з показниками SDNN ($p < 0,05$) та $K_{30/15}$ ($p < 0,01$). Для $СМП_{254}$ виявлено позитивні достовірні кореляції із SDNN ($p < 0,05$) лише в ортостатичній пробі. Для продуктів окисної деструкції білків також встановлено достовірні кореляції: $ОМБ_{430}$ – позитивна кореляція із SDNN, RMSSD ($p < 0,05$) та $K_{30/15}$ ($p < 0,01$) і $ОМБ_{370}$ – негативна із ЧСС ($p < 0,05$) в ортостатичній пробі. З кореляційного аналізу випливає, що хворим із нижчим вмістом СМП та ОМБ притаманна менша ВСР, що свідчить про недостатню інтенсивність окисно-відновних реакцій загалом і протеолізу зокрема у пацієнтів із ПВДПК. До того ж, численні достовірні кореляції параметрів ВСР із активністю СОД вказують на те, що її зниження може бути одним із механізмів пригнічення парасимпатичного тону, і, відповідно, вища активність дисмутації надмірного потоку супероксиданіона є відповідальною за підтримання ефективнішої ВСР. Усі ці ознаки у хворих на ПВДПК добре вкладаються у сучасне трактування окисного стресу, за яким накопичення продуктів ліпопероксидації може відбуватися не стільки на тлі високої інтенсивності їх утворення, скільки на фоні пригнічення їх утилізації [14, 35].

Лікування, спрямоване на ерадикацію *H. pylori*, спричинило ліквідацію гістологічних проявів запалення, а також клінічне загоєння виразки. Проте ознаки окисного стресу в слизовій оболонці шлунка та на рівні організму не зменшилися, а за деякими параметрами навіть збільшилися (посилення нагромадження 4-гідроксинафеналь-гістидинових кон'югат у ядрах клітин власних залоз, достовірне змен-

шення активності каталази, вмісту ОМБ нижче значень контрольної групи та підвищення рівня β -ЛП) [12, 16]. Майже повна нормалізація вмісту ГП і СМП у сироватці хворих після стандартного лікування (2-га група) виявилась недостатньою і не змогла запобігти подальшому зниженню основних часових і спектральних параметрів ВСР у спокої (фонова проба) – SDNN, RMSSD, pNN50, TP, VLF, LF та HF. Під час ортостатичної проби параметри ВСР до та після лікування практично не змінилися, що свідчить про їх деяку позитивну динаміку [3].

У ході дослідження кореляційних зв'язків між біохімічними параметрами та ВСР у хворих 2-ї групи після лікування (табл. 2) було виявлено, що більшість відзначених до лікування тенденцій збереглися і навіть дещо посилювалися (позитивна кореляція між СОД і більшістю параметрів ВСР, але негативна із ЧСС та автономним балансом). Щодо активності каталази було показано посилення негативних кореляційних зв'язків з багатьма параметрами ВСР (достовірна з TP, VLF, LF у спокої та LF під час ортостатичної проби), що вказує на посилення компенсаторної ролі зниженої каталазної активності з метою забезпечення флуктуацій H_2O_2 , необхідних для підтримання вищої ВСР [27, 40]. Показово, що з'явилися позитивні кореляції між автономним балансом (LF/HF) і ТБК-АП, ГП та β -ЛП під час ортостатичної проби, що свідчить про автономний дисбаланс (симпатикотонію) у хворих із вищим нагромадженням продуктів ліпопероксидації. Такі зміни, разом із суттєвим збільшенням вмісту β -ліпопротеїнів після лікування, вказують на проатерогенний метаболічний зсув, який за умови тривалої персистенції може трансформуватися у дисліпопротеїнемію і, в подальшому, атеросклероз [30]. Щодо СМП та ОМБ нами виявлено деяке наростання кореляційних зв'язків з багатьма параметрами ВСР, однак їх характер змінив свій знак на негативний (див. табл. 2) порівняно зі станом до лікування.

Ці зв'язки, проте, були переважно недостовірними, і лише автономний баланс (LF/HF) із $СМП_{254}$ у фоновій пробі та з обома фракціями СМП і ОМБ під час ортостатичної проби мав достовірні негативні кореляції (див. табл. 2). Інтерпретація таких змін, звичайно, не однозначна, однак проявляється чіткий зв'язок покращання автономного балансу із наростанням продуктів окисної деструкції білків, що, на нашу думку, є однією з ознак вільнорадикальної активації.

Таким чином, можна підсумувати, що традиційна схема лікування не призводить до

Таблиця 2 – Коефіцієнти лінійної кореляції між параметрами ВСП та аеробного метаболізму у хворих на ПВДПК після стандартного лікування (n=12)

	КАТ	СОД	ТБК-АП	ЛП	ГП	СМП ₂₅₄	СМП ₂₈₀	ОМБ ₃₇₀	ОМБ ₄₃₀
Фонова проба									
ЧСС	0,315	-0,974***	–	–	0,377	–	–	–	–
SDNN	-0,534	0,874***	–	–	–	–	–	-0,347	–
RMSSD	-0,547	0,881***	–	–	–	–	–	-0,371	-0,305
pNN50	–	0,984***	–	–	-0,459	–	–	–	–
TP	-0,619 [†]	0,812**	–	–	–	–	–	-0,422	-0,351
VLF	-0,779**	0,545	–	–	–	–	-0,365	-0,549	-0,473
LF	-0,716**	0,730**	–	–	–	–	-0,321	-0,519	-0,448
HF	-0,507	0,889***	–	–	–	–	–	-0,323	–
LF/HF	–	-0,891***	0,486	–	0,761**	-0,595 [†]	-0,488	-0,303	-0,356
Ортостатична проба									
ЧСС	0,372	-0,976***	–	–	0,303	–	–	–	–
SDNN	-0,430	0,795**	–	–	–	–	–	–	–
RMSSD	-0,370	0,914***	–	–	-0,353	–	–	–	–
pNN50	–	0,956***	–	–	-0,435	–	–	–	–
K30/15	–	0,835***	-0,409	–	-0,587 [†]	0,509	0,340	–	–
TP	-0,518	0,803**	–	–	–	–	–	–	–
VLF	-0,458	0,704 [†]	–	–	–	–	–	–	–
LF	-0,579 [†]	0,834***	–	–	–	–	–	-0,381	-0,310
HF	-0,348	0,878***	–	–	-0,380	–	–	–	–
LF/HF	-0,366	-0,307	0,878***	0,799**	0,780**	-0,903***	-0,783 [†]	-0,649 [†]	-0,715**

зменшення, а за деякими показниками навіть викликає поглиблення окисного стресу і, відповідно, зниження інтенсивності окисно-відновних реакцій. Це, у свою чергу, спричиняє порушення фізіологічних систем регуляції ритму серця, зменшення його варіабельності, а отже, посилення ознак дезадаптації у хворих на ПВДПК. Вважаємо, що наростання окремих кореляційних зв'язків, які відображають напруженість метаболічної системи, лише підтверджує вищенаведені висновки.

На відміну від стандартного лікування, застосування ОАм спричинило зниження проявів окисного стресу у хворих (суттєве зменшення нагромадження 4-ГН у ядрах гланулоцитів, зростання активності каталази та зниження СОД, зменшення рівня гідропероксидів з одночасним помірним підвищенням ТБК-АП, СМП₂₅₄, СМП₂₈₀, ОМБ₃₇₀). Одночасно ОАм запобігала зростанню рівня β-ЛП, яке спостерігалось у хворих на ПВДПК після стандартної схеми лікування (неопубліковані дані). Відзначимо, що така сприятлива метаболічна ситуація забезпечується через механізми помірної прооксидантної активації і супроводжується підвищенням більшості параметрів ВСП [2, 5, 6], на відміну від пацієнтів, які отримували стандартне лікування.

Під час дослідження кореляційних зв'язків було виявлено певні особливості у хворих 3-ї групи, які приймали ОАм (табл. 3). Встановлено наявність негативних зв'язків більшості пара-

метрів ВСП з активністю каталази (достовірні з показниками LF у кліностатичній та TP, LF під час ортостатичної проби) і позитивних – з автономним балансом (LF/HF). Такий характер взаємозв'язків, притаманний також пацієнтам 1-ї і 2-ї груп, вказує на особливу роль H₂O₂ у механізмах підтримання вищої ВСП у хворих на ПВДПК. Натомість, звертає на себе увагу відсутність кореляційних взаємозв'язків параметрів ВСП та активності СОД, за винятком прямої кореляції з K_{30/15}, тоді як у пацієнтів 1-ї і, особливо, 2-ї груп дані зв'язки були досить сильними і часто достовірними. На нашу думку, це вказує на суттєве зменшення критичної ролі СОД-активності й, відповідно, дисмутації супероксиду в підтриманні параметрів ВСП. Протилежна ситуація спостерігалась у випадку з ТБК-АП – повна відсутність кореляцій у 2-й групі після лікування змінилася на негативні кореляції з більшістю параметрів ВСП (достовірні коефіцієнти з SDNN, RMSSD, pNN50, TP, VLF та HF у спокої і SDNN, RMSSD, pNN50, VLF та HF під час ортостатичної проби) під дією ОАм (див. табл. 3). Одночасно позитивні достовірні зв'язки було виявлено для ЧСС (в спокої) та автономного балансу (у спокої та ортопроби), що вказує на більше нагромадження продуктів ліпопероксидації у хворих з нижчою ВСП і, навпаки, ефективнішу утилізацію цих продуктів у пацієнтів з вищою ВСП. Такі результати свідчать, на нашу думку, про активацію аеробного метаболізму, навіть на тлі достовірно

Таблиця 3 – Коефіцієнти лінійної кореляції параметрів ВСР та аеробного метаболізму у хворих на ПВДПК після лікування із застосуванням ОАм (n=12)

	КАТ	СОД	ТБК-АП	ЛП	ГП	СМП ₂₅₄	СМП ₂₈₀	ОМБ ₃₇₀	ОМБ ₄₃₀
Фонові проба									
ЧСС	–	–	0,718**	0,500	–	-0,686*	-0,413	-0,436	-0,449
SDNN	-0,502	–	-0,785**	–	-0,465	0,420	–	0,560	0,539
RMSSD	-0,390	–	-0,837***	–	-0,432	0,513	–	0,474	0,463
pNN50	-0,549	–	-0,809**	–	-0,394	0,420	–	0,549	0,532
TP	-0,489	–	-0,771**	–	-0,487	0,410	–	0,564	0,541
VLF	–	–	-0,767**	–	-0,416	0,531	–	–	–
LF	-0,778**	–	-0,500	–	-0,444	–	–	0,797**	0,770**
HF	-0,489	–	-0,776**	–	-0,472	0,415	–	0,559	0,537
LF/HF	0,763**	–	0,681*	-0,326	–	–	0,379	–	–
Орто статична проба									
ЧСС	–	–	0,495	0,625*	–	-0,609*	-0,460	-0,321	-0,330
SDNN	-0,571	–	-0,600*	–	-0,583*	0,326	–	0,750**	0,726**
RMSSD	-0,307	–	-0,772**	–	-0,501	0,549	–	0,528	0,519
pNN50	–	–	-0,822**	–	-0,448	0,579*	–	0,374	0,367
K30/15	–	0,610*	-0,840***	–	-0,339	0,752**	0,364	–	–
TP	-0,721**	–	-0,477	–	-0,575	–	–	0,793**	0,752**
VLF	-0,354	–	-0,816**	–	-0,453	0,536	–	0,494	0,485
LF	-0,808***	-0,331	–	–	-0,462	-0,362	-0,511	0,791**	0,735**
HF	-0,354	–	-0,834***	–	-0,461	0,499	–	0,440	0,425
LF/HF	0,302	–	0,721**	–	-0,317	–	–	0,334	0,358

зниженої активності СОД та помірного (в межах норми), але достовірного зростання ТБК-АП у хворих 3-ї групи після лікування. Також виявлено позитивні кореляції β-ЛП із ЧСС у фоновій та ортостатичній пробах та негативні між ГП і SDNN в ортопробі. У випадку із СМП (особливо фракції СМП₂₅₄), на відміну від ТБК-АП, мали місце позитивні кореляції з більшістю параметрів ВСР (достовірні з pNN50 та K_{30/15} в ортопробі) і негативні – з ЧСС в спокої та ортопробі. Подібні, проте значно виразніші зв'язки, спостерігалися між ОМБ та більшістю параметрів ВСР (див. табл. 3). Таким чином, у пацієнтів 3-ї групи після лікування звертають на себе увагу дві головні особливості кореляційних зв'язків між параметрами ВСР і аеробного метаболізму. По-перше, найбільш чисельні та виражені достовірні кореляції у цій групі виявлені між параметрами ВСР і ТБК-АП (негативні кореляції), тоді як у 2-й групі (стандартне лікування) – позитивні з активністю СОД. Така різниця свідчить, на нашу думку, про якісно різні механізми взаємозв'язків між параметрами аеробного метаболізму і ВСР: виражені ознаки окисного стресу на тлі зниженої інтенсивності аеробного метаболізму (1-ша і 2-га групи) та зменшення напруження метаболізму за рахунок активації окисно-відновних реакцій і формування помірної прооксидантної ситуації під дією ОАм (3-тя група), як показано нами раніше [2, 5, 6]. По-друге, позитивні кореляції СМП, ОМБ з параметрами ВСР у 3-й

групі підтверджують реалізацію помірного прооксидантного впливу ОАм, здатного забезпечити ефективніші відновні процеси і регенерацію слизової. Очевидно, з цієї причини у пацієнтів 3-ї групи не спостерігалось залежності ВСР від активності СОД. Тоді як у 1-й і, особливо, 2-й групах мало місце подальше зниження інтенсивності аеробного метаболізму з одночасним зменшенням ВСР, що проявилось посиленням кореляцій СОД з більшістю параметрів ВСР.

Іншими словами, для підвищення параметрів ВСР у хворих на ПВДПК необхідно є активація аеробного метаболізму, результатом чого насамперед є ефективніша утилізація продуктів окисної деструкції в аеробних перетвореннях, генерація ендogenous кисню і ліквідація клітинної гіпоксії, а отже підвищення антиоксидантної ємності організму і зменшення проявів окисного стресу. Позитивні ефекти олії з насіння амаранту пов'язані із синергізмом впливу її складників, які забезпечують омега-3 міметичну дію, підвищуючи мембранний вміст ейкозопентаєнової кислоти, а отже, синтез простагландинів I та III класів [8, 25]. Крім того, лінолева кислота (близько 50 % у складі ОАм) є найкращим субстратом для ліпоксигенази, а також гемоглобіну, який в її присутності проявляє ліпоксигеназну активність [33], що у цьому випадку сприяє синтезу прозапальних лейкотрієнів і формуванню прооксидантної ситуації. Разом із тим, мінорні компоненти ОАм

(токотрієноли, токофероли, сквален, каротиноїди та ін.), маючи дуалістичні властивості, сприяють як активації вільнорадикальних реакцій, так і обмеженню їх надмірної інтенсивності [18, 34, 38]. Таким чином, помірні стимуляція та підвищення інтенсивності вільнорадикальних реакцій сприяють збільшенню потенціалу антиоксидантного захисту і формують надійну метаболічну основу для зростання показників ВСР та оптимізації функцій системи кровообігу.

ВИСНОВКИ. Нами встановлено наявність певних кореляційних зв'язків між параметрами ВСР та аеробного метаболізму. Їх сила та характер залежать від функціонально-метаболічного стану організму. Застосування олії з насіння амаранту, що має помірну прооксидантну дію, підвищує параметри варіабельності ритму серця, зменшує напруженість аеробного метаболізму і модулює кореляційні зв'язки між досліджуваними параметрами.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баевский Р.М., Кириллов О.И., Клецкин С.Э. Математический анализ изменений сердечного ритма при стрессе. – Москва: Наука, 1984. – 214с.
2. Єлісєєва О.П., Камінський Д.В., Черкас А.П. та ін. Особливості впливу олії з насіння амаранту на стан антиоксидантної системи печінки та крові мишей за розвитку в них злоякісної лімфоми // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 1. – С. 117-123.
3. Єлісєєва О.П., Семен Х.О., Черкас А.П. та ін. Ефективність інтервальної гіпоксії у післяерадикаційному комплексному лікуванні виразкової хвороби дванадцятипалої кишки: оцінювання за допомогою варіабельності серцевого ритму // Вісник проблем біології та медицини. – 2007. – № 4. – С. 113-124.
4. Єлісєєва О.П., Сергієнко О.О., Черкас А.П. та ін. Варіабельність серцевого ритму у хворих на цукровий діабет: спроба метаболічної інтерпретації // Пробл. ендокр. патол. – 2005. – № 1. – С. 95-110.
5. Єлісєєва О.П., Сергієнко О.О., Черкас А.П. та ін. Комплексна оцінка впливу олії амаранту на функціонально-метаболічний резерв у хворих на цукровий діабет 1-го типу // Вісник Львів. ун-ту. Серія: Біологія. – 2007. – № 44. – С. 135-145.
6. Єлісєєва О.П., Черкас А.П., Семен Х.О. та ін. Оптимізація параметрів аеробного метаболізму, варіабельності серцевого ритму та посилення кореляційних зв'язків між ними під впливом олії з насіння амаранту в атлетів // Експерим. та клін. фізіол. і біохім. – 2006. – № 1. – С. 68-77.
7. Камінський Д.В., Єлісєєва О.П., Черкас А.П. та ін. Фізико-хімічна характеристика амаранту і особливості його метаболічного впливу // Мед. хімія. – 2002. – № 4. – С. 77-85.
8. Кулакова С.Н., Поздняков А.Л., Корф И.И. и др. Масло амаранта: особенности химического состава и влияние на показатели липидного обмена крыс // Вопрос питания. – 2006. – № 3. – С. 36-42.
9. Линник С.А., Наурбиева Е.Н., Пономарева Е.П. Вариабельность сердечного ритма у пациентов с ишемической болезнью сердца в сочетании с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки // Клин. медицина. – 2006. – № 1. – С. 31-34.
10. Подопригорова В.Г. Оксидативный стресс и язвенная болезнь. – М.: Медицина, 2004. – 176 с.
11. Семен Х.О., Єлісєєва О.П., Абрагамович О.О. та ін. Ефективність корекції аеробного метаболізму за допомогою інтервальної гіпоксії у пацієнтів з виразковою хворобою дванадцятипалої кишки у післяерадикаційний період // Львів. мед. часопис. – 2007. – **13**, № 3. – С. 36-42.
12. Семен Х.О., Єлісєєва О.П., Черкас А.П. та ін. Зміни морфофункціонального стану слизової оболонки шлунка під дією інтервального гіпоксичного тренування у хворих на пептичну дуоденальну виразку // Світ медицини та біології. – 2007. – № 3. – С. 76-82.
13. Соболев А.В. Анализ вариабельности сердечного ритма на длительных промежутках времени. I. Обоснование применения новой методологии // Функциональная диагностика. – 2006. – № 2. – С. 6-16.
14. Тимочко М.Ф., Єлісєєва О.П., Кобилінська Л.І. та ін. Метаболічні аспекти формування кисневого гомеостазу в екстремальних станах. – Львів: Місіонер, 1998. – 142 с.
15. Ушакова Л.Ю., Мрочек А.Г., Платошин Э.Н. Вариабельность сердечного ритма больных, страдающих ишемической болезнью сердца в сочетании с дуоденальными язвами // Здоровье. – 2004. – № 1. – С. 18-20.
16. Черкас А.П., Семен Х.О., Єлісєєва О.П. та ін. Вияви окисного стресу в слизовій оболонці шлунка хворих із пептичною виразкою дванадцятипалої кишки після успішної ерадикації *Helicobacter*

- pylori // Сучасна гастроентерологія. – 2007. – № 5. – С. 13-17.
17. Черкас А.П., Семен Х.О., Єлісєєва О.П. та ін. Особливості параметрів варіабельності ритму серця та гістологічної структури слизової оболонки шлунка залежно від інфікованості *Helicobacter pylori* у хворих на виразкову хворобу дванадцятипалої кишки та умовно здорових волонтерів // Сучасна гастроентерологія. – 2006. – № 4 (30). – С. 44-49.
18. Aioi A., Shimizu T., Kuriyama K. Effect of squalene on superoxide anion generation induced by a skin irritant, lauroylsarcosine // *Int. J. Pharm.* – 1995. – **113**. – P. 159-164.
19. Ashida T., Ono C., Sugiyama T. Effects of short-term hypocaloric diet on sympatho-vagal interaction assessed by spectral analysis of heart rate and blood pressure variability during stress tests in obese hypertensive patients // *Hypertens. Res.* – 2007. – **30**, № 12. – P. 1199-1203.
20. Berger A., Gremaud G., Baumgartner M. et al. Cholesterol-lowering properties of amaranth grain and oil in hamsters 1 // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* – 2003. – **73**, № 1. – P. 39-47.
21. Bi L.C., Kaunitz J.D. Gastrointestinal mucosal defense: an integrated protective response 1 // *Curr. Opin. Gastroenterol.* – 2003. – **19**, № 6. – P. 526-532.
22. Bosquet L., Mekari S., Arvisais D. et al. Is heart rate a convenient tool to monitor overreaching? A systematic review of the literature // *Br. J. Sports Med.* – 2008. (in press).
23. Christensen J. H. n-3 fatty acids and the risk of sudden cardiac death. Emphasis on heart rate variability // *Dan. Med. Bull.* – 2003. – **50**, № 4. – P. 347-367.
24. Connes P., Hue O., Hardy-Dessources M.D. et al. Hemorheology and heart rate variability: is there a relationship? // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2008. – **38**, № 4. – P. 257-265.
25. Das U.N. Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how? // *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* – 2000. – **63**, № 6. – P. 351-362.
26. Forman B.M., Chen J., Evans R.M. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta // *Proc. Nat. Ac. Sci.* – 1997. – **94**, № 9. – P. 4312-4317.
27. Guzy R.D., Schumacker P.T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: The paradox of increased ROS during hypoxia // *Exp. Physiol.* – 2006. – **91**, № 5. – P. 807-819.
28. Hazell S.L., Graham D.Y. Unsaturated fatty acids and viability of *Helicobacter* (*Campylobacter*) *pylori* // *J. Clin. Microbiol.* – 1990. – **28**, № 5. – P. 1060-1061.
29. Heart Rate Variability Standards of Measurement, Physiological Interpretation, and Clinical Use // *Circulation.* – 1996. – **93**, № 5. – P. 1043-1065.
30. Kamada T., Hata J., Kusunoki H. et al. Eradication of *Helicobacter pylori* increases the incidence of hyperlipidaemia and obesity in peptic ulcer patients // *Dig. Liver Dis.* – 2005. – **37**, № 1. – P. 39-43.
31. Katz-Leurer M., Shochina M. The influence of autonomic impairment on aerobic exercise outcome in stroke patients // *Neurorehabilitation.* – 2007. – **22**, № 4. – P. 267-272.
32. Kim H., Kim M., Cho H. et al. Antioxidative and anti-diabetic effects of amaranth (*Amarantus esculantus*) in streptozotocin-induced diabetic rats // *Cell Biochem. Funct.* – 2006. – **24**. – P. 195-199.
33. Kuhn H., Gotze R., Schewe T. et al. Quasilipoxygenase activity of haemoglobin a model for lipoxygenases // *Eur. J. Biochem.* – 1981. – **120**. – P. 161-168.
34. O'sullivan L., Woods J.A., O'brien N.M. Squalene but not n-3 fatty acids protect against hydrogen peroxide-induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cells // *Nutr. Res.* – 2002. – **22**, № 7. – P. 847-857.
35. Packer L., Cadenas E. Oxidants and antioxidants revisited. New concepts of oxidative stress // *Free Radic. Res.* – 2007. – **41**, № 9. – P. 951-952.
36. Petschow B.W., Batema R.P., Ford L.L. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids // *Antimicrob. Agents & Chemother.* – 1996. – **40**, № 2. – P. 302-306.
37. Risk M., Bril V., Broadbridge C. et al. Heart rate variability measurement in diabetic neuropathy: review of methods // *Diabetes Technol. Ther.* – 2001. – **3**, № 1. – P. 63-76.
38. Sen C.K., Khanna S., Roy S. Tocotrienols in health and disease: the other half of the natural vitamin E family // *Mol. Aspects Med.* – 2007. – **28**, № 5-6. – P. 692-728.
39. Simopoulos A.P. Omega-3 Fatty Acids in Inflammation and Autoimmune Diseases // *J. Am. Coll. Nutr.* – 2002. – **21**, № 6. – P. 495-505.
40. Weir K.E., Lopez-Barneo J., Buckler K.J. et al. Acute oxygen-sensing mechanisms // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – **10**. – P. 2042-2055.
41. Westerman D., Santos R.C.D., Bosley J.A. et al. Extraction of Amaranth seed oil by supercritical carbon dioxide // *J. Supercritical Fluids.* – 2006. – **37**, № 1. – P. 38-52.
42. Yelisyyeva O., Cherkas A., Zarkovic K. et al. The distribution of 4-hydroxynonenal-modified proteins in gastric mucosa of duodenal peptic ulcer patients // *Free Radic. Res.* – 2008. – **42**, № 3. – P. 205-211.

**ИССЛЕДОВАНИЕ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ ПАРАМЕТРАМИ
АЭРОБНОГО МЕТАБОЛИЗМА И ВАРИАбельНОСТИ РИТМА СЕРДЦА
У БОЛЬНЫХ С ПЕПТИЧЕСКОЙ ЯЗВОЙ ДВЕНАДЦАТИПЕРСТНОЙ КИШКИ:
ЭФФЕКТ МАСЛА ИЗ СЕМЯН АМАРАНТА**

О.П. Елисеева, А.П. Черкас, Д.В. Каминский, Х.О. Семен
Львовский национальный медицинский университет имени Данила Галицкого

Резюме

В работе изучены корреляционные связи между параметрами аэробного метаболизма и вариабельности сердечного ритма (ВСР) у больных с пептической язвой двенадцатиперстной кишки до лечения, после стандартной и модифицированной (с добавлением масла из семян амаранта (Мам)) схем лечения. Вычисляли коэффициенты линейной корреляции (r) и их достоверность (p). Наиболее выраженные корреляции (прямые) выявлены между большинством параметров ВСР и активностью супероксиддисмутазы (СОД), что свидетельствует о важной роли угнетения активности данного фермента в снижении ВСР. Применение стандартной тройной схемы лечения усилило эти тенденции. Использование Мам способствовало активации аэробного обмена за счет формирования умеренной прооксидантной ситуации и переключению прямых корреляций между параметрами ВСР и активностью СОД (до и после стандартного лечения) на обратные между параметрами ВСР и уровнем ТБК-активных продуктов. Таким образом, высшую ВСР выявлено у больных с более эффективной утилизацией продуктов липопероксидации, что является необходимым условием повышения устойчивости организма к окислительному стрессу.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: вариабельность сердечного ритма, аэробный метаболизм, корреляционный анализ, масло амаранта, окислительный стресс, пептическая язва.

**THE STUDY OF CORRELATIONS BETWEEN AEROBIC METABOLISM
AND HEART RATE VARIABILITY IN DUODENAL PEPTIC ULCER PATIENTS:
AN EFFECT OF AMARANTH OIL**

O.P. Yeliseyeva, A.P. Cherkas, D.V. Kaminsky, Kh.O. Semen
LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY DANYLO HALYTSKY

Summary

The correlations between aerobic metabolism parameters and HRV in duodenal peptic ulcer (DPU) patients, before and after standard and modified (treatments with Amaranth oil (AmO) supplementation), were studied. Linear correlation coefficients (r) and their significance (p) were calculated. The most valuable were positive correlations of many HRV parameters with SOD-activity. This means that inhibited SOD activity could be responsible for the depression of parasympathetic tone and overall HRV decrease. Standard treatment scheme strengthened the tendencies observed before treatment. Supplementation with AmO caused activation of aerobic exchange by the means of mild prooxidant influence and shifted correlations of HRV from positive with SOD-activity (before and after standard treatment) to negative with TBARS levels. Thus, higher HRV parameters were observed in patients with more effective TBARS utilization, which, in general, supports increase of HRV and oxidative stress resistance.

KEY WORDS: heart rate variability, aerobic metabolism, correlations, Amaranth seeds oil, oxidative stress, peptic ulcer.

Отримано 12.03.2008 р.

Адреса для листування: О.П. Єлисеєва, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, вул. Пекарська, 69а, Львів, 79001, Україна.

УДК 615.07:54.062:543.422.7

ВАЛІДАЦІЯ ТИТРИМЕТРИЧНОЇ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ НАТРІЮ САЛІЦИЛАТУ В ЛІКАРСЬКІЙ ФОРМІ АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ

В.А. Георгіянец¹, Є.І. Бисага², О.А. Євтіфєєва¹, Н.В. Гарна¹, Н.Б. Бурд¹
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ¹, ХАРКІВ
УЖГОРОДСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ²

Проведено валідацію аналітичної методики кількісного визначення аптечної лікарської форми на основі натрію саліцилату, яку виготовляють в аптеці про запас та найчастіше використовують в різних індивідуальних прописах. Валідацію виконували за схемою, яка наведена в Державній Фармакопеї України (ДФУ). Було розглянуто такі параметри, як діапазон застосування, специфічність, лінійність, збіжність, правильність та відтворюваність в умовах двох різних лабораторій, що дозволило визначити придатність даної методики для розв'язання поставлених завдань в умовах аптек та лабораторій з контролю якості лікарських засобів при розширенні допусків вмісту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фармацевтичний аналіз, валідація аналітичних методик, екстемпоральна рецептура, натрію саліцилат.

ВСТУП. Метою даної роботи було проведення валідації аналітичної методики кількісного визначення натрію саліцилату в лікарській формі аптечного виготовлення, яка на сьогодні користується попитом, такого складу [1]:

Натрію саліцилату 3,0 г
Натрію метабісульфіту 0,1 г
Води очищеної до 100 мл.

Оскільки критерієм вибору методики аналізу була доступність проведення аналізу в умовах аптеки, для проведення експерименту обрали титриметричну методику аналізу [3, 7, 8, 9].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. При проведенні дослідження використовували субстанцію натрію саліцилату (фірма "Lachema a.s.", Чехія), яка відповідає вимогам BP 98, Eur. Ph. 2000. Для роботи застосовували мірний посуд класу А, реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги AB 204 S/A METTLER TOLEDO.

Методика визначення поправкового коефіцієнта до 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти: 0,1 г (точна наважка) натрію карбонату розчиняють у 20 мл води, додають 0,1 мл розчину метилового оранжевого і титрують розчином кислоти хлористоводневої до появи червонувато-жовтого забарвлення. Кип'ятять протягом 2 хв; розчин знову набуває жовтого

© В.А. Георгіянец, Є.І. Бисага, О.А. Євтіфєєва, Н.В. Гарна, Н.Б. Бурд, 2008.

забарвлення, охолоджують і продовжують титрування до появи червонувато-жовтого забарвлення. 1 мл 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти відповідає 5,30 мг натрію карбонату. Визначення проводили п'ять разів.

Методика кількісного визначення натрію саліцилату в лікарській формі: до 2,00 мл лікарської форми додають дві краплі індикатора метилового оранжевого, 6,00 мл дітилового ефіру і титрують 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти при постійному збовтуванні до появи червонувато-жовтого забарвлення водного шару. 1 мл 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти відповідає 16,01 мг натрію саліцилату.

Випробуваний та модельні розчини готували в умовах аптеки за правилами аптечної технології, використовуючи однаково віддалений розкид концентрації натрію саліцилату (точна наважка, м, г) на всьому діапазоні застосування методики $\pm 20\%$ (відповідно, 0,40; 0,45; 0,50; 0,55; 0,60 г). Кількість стабілізатора в усіх модельних розчинах однакова та відповідає пропису. Кожну лікарську форму титрували тричі (три аліквоти).

Контрольний дослід проводили таким же чином, але без додавання наважки натрію саліцилату.

Валідацію аналітичної методики виконували відповідно до ДФУ [4]. У процесі валідації було розглянуто такі характеристики, як діапазон

застосування, специфічність, лінійність, збіжність, правильність, відтворюваність. При цьому використовували рекомендації [4, 6].

Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до статті ДФУ "Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту" [5].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Перед початком досліджень проводили перевірку молярності титрованого 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти в умовах двох різних лабораторій, а також оцінку невизначеності концентрації стандартного розчину. Ця характеристика регламентується ДФУ і є важливою для отримання коректних результатів [4]. Визначення проводили за методикою ДФУ. Титрування виконували п'ять разів, використовуючи наважку в діапазоні $\pm 5\%$ від рекомендованої в методиці, щоб запобігти мимовільній "підгонці" результатів. Отримані результати наведено в таблиці 1. Як видно з даних, обидва титровані розчини (лаб. № 1 і лаб. № 2), які використовували, відповідають вимогам ДФУ [4] щодо концентрації, а також відносно відтворюваності (точності) зазначеної молярності, що дозволяло отримувати коректні й точні результати.

Далі було проведено теоретичний розрахунок критеріїв прийнятності метрологічних характеристик методики аналізу [2, 6], враховуючи обраний діапазон застосування методики та симетричні допуски вмісту натрію саліцилату в лікарській формі $\pm 4\%$ за АНД [7]: максимальної допустимої повної невизначеності – $\max \Delta_{As} = 1,28\%$, максимальної систематичної похибки – $\max \delta = 0,41\%$, критичного значення залишкового стандартного відхилення –

$RSD_0 = 0,72\%$ та критичного індексу кореляції $R_c = 0,9988$, а також критичного значення практичної невизначеності вільного члена лінійної залежності – $a = 2,05\%$.

При використанні титриметричного методу необхідно зазначити, що дія факторів, які впливають на титрування діючої речовини, є незначною [10]. Оцінку впливу плацебо проводили шляхом вимірювання об'єму титрованого розчину (V_0), який пішов на титрування аліквоти, що не містила досліджуваної речовини (натрію саліцилату). Визначення проводили три рази. Середнє значення цього об'єму становило $\bar{V}_0 = 0,02$ мл, що складало 1 краплю титрованого розчину та дорівнювало одному діленню мірної бюретки. За методикою, на титрування аліквоти лікарської форми (2,00 мл) потрібно $V_{HCl} = 3,75$ мл. Критерієм незначущості впливу плацебо є виконання нерівності [2, 6, 10] $\delta_{exc} \leq 0,32 \cdot \max \delta = 0,32 \cdot 0,41 \rightarrow \delta_{exc} \leq 0,13\%$. У нашому випадку вклад плацебо в сумарний об'єм титранту $V_{HCl} = 3,75$ мл, який пішов на титрування аліквоти препарату, складав

$$\delta_{exc} = \frac{100 \cdot 0,02}{3,75} = 0,533 \approx 0,53\%, \text{ тобто нерівність}$$

$\delta_{exc} = 0,53\% \leq 0,13\%$ не виконувалась. Тобто в даному випадку вклад плацебо перевищував критерій невизначеності $0,53 \geq 0,13$ на величину $0,4\%$, що свідчило про значущість цієї похибки порівняно з максимально припустимою невизначеністю аналізу $\max \Delta_{As} = 1,28\%$. Для нівелювання цього ефекту можна запропонувати два підходи: перший – збільшити допуски вмісту аналізованої речовини ($100 \pm B\%$) від приписаного значення, другий – збільшити аліквоту препарату, щоб на її титрування витрачався

Таблиця 1 – Визначення поправкового коефіцієнта до титру 0,1 М розчину хлористоводневої кислоти

№ з/п	Лаб. № 1			Лаб. № 2		
	Наважка натрію карбонату, m (г)	Об'єм 0,1 М розчину HCl, V_1 (мл)	K_1	Наважка натрію карбонату, m (г)	Об'єм 0,1 М розчину HCl, V_2 (мл)	K_2
1	0,1001	18,70	1,0101	0,1001	19,05	0,9916
2	0,1005	18,75	1,0115	0,1003	19,10	0,9910
3	0,1000	18,65	1,0118	0,1000	19,05	0,9906
4	0,0984	18,40	1,0092	0,0972	18,50	0,9915
5	0,1032	19,25	1,0117	0,1028	19,60	0,9898
середнє значення \bar{K}_1			1,0109	\bar{K}_2		0,9907
стандартне відхилення SD_{K_1}			0,0012	SD_{K_2}		0,0007
відносне стандартне відхилення $RSD_{K_1}, \%$			0,1143	$RSD_{K_2}, \%$		0,0751
відносний довірчий інтервал середнього значення $\Delta st_1, (\%)$			0,14	$\Delta st_2, (\%)$		0,0933
відповідність вимогам ДФУ $\Delta_{st} \leq 0,2\%$			$0,14 \leq 0,2\%$			$0,09 \leq 0,2\%$

більший об'єм стандартного розчину. Наприклад, мінімальний об'єм стандартного розчину за даних вимог ($\delta_{\text{exc}} \leq 0,13\%$) буде дорівнювати

$$V_{\text{Tmin}} = \frac{100 \cdot 0,02}{0,13} = 15,39 \text{ мл, аліквота для аналізу}$$

становитиме $V_{\text{л.ф.}} = 8,2$ мл. Однак цей об'єм від загального об'єму лікарської форми складає 8,2 %, що значно перевищувало вимоги, які висуваються АНД [7] до припустимих відхилень в загальному об'ємі рідких лікарських засобів при відпуску (± 3 %, тобто $V_{\text{л.ф.макс}} = 3,00$ мл).

Врахувати дану похибку (0,4 %) можна, зменшивши максимально припустиму невизначеність: $\max \Delta_{\text{As}} = 1,28 - 0,4 = 0,88$ %, що водночас висуває більш жорсткі вимоги до результатів експерименту: $\max \Delta_{\text{As}} = 0,88$ %, $\max \delta = 0,28$ %, $\text{RSD}_0 = 0,38$ %, $R_0 = 0,9997$, $a = 1,4$ %. Провести кількісне визначення титриметричної методики в умовах аптеки відповідно до даних вимог неможливо [6, 10].

Тому перший підхід значно коректніший. До того ж, відповідно до фармакопейної практики [4, 5], допуски вмісту окремих інгредієнтів у промислових готових лікарських препаратах, як правило, регламентуються від ± 5 до ± 10 % і вище.

Для визначення валідаційних характеристик обраної методики було використано найбільш простий підхід, що базується на дослідженні субстанції з відомим вмістом речовини, яка аналізується та відповідає вимогам якості за ДФУ.

Перед початком експерименту з валідації ми провели декілька пробних титрувань лікарської форми. На основі отриманих результатів дійшли висновку, що кількість діетилового ефіру значно впливає на результати титрування. Тому кількість діетилового ефіру повинна приблизно відповідати сумі об'єму аліквоти лікарської форми й об'єму титрованого розчину, який витрачається на титрування.

Для проведення валідації було обрано мінімальний, за ДФУ [4], діапазон застосування методики ± 20 % з урахуванням симетричних допусків вмісту натрію саліцилату в лікарській формі відповідно до АНД [7] ($B = \pm 4$ %).

Дослідження лінійності аналітичної методики проводили на п'яти модельних лікарських формах, які були виготовлені за правилами аптечної технології з урахуванням рівномірного розкиду концентрації натрію саліцилату від номінального вмісту за прописом на всьому діапазоні застосування методики (80, 90, 100, 110, 120 %) в умовах двох лабораторій (лаб. № 1 і лаб. № 2) за схемою, яка детально описана в роботі [6]. Кожну лікарську форму титрували тричі. Отримані результати оброб-

ляли методом найменших квадратів для прямої $Y_i = b \cdot x_i + a$, отримуючи величини b , a , коефіцієнт кореляції r і остаточне стандартне відхилення S_{rest} . Одержані результати наведено у таблиці 2.

Дослідження правильності та збіжності аналітичної методики проводили за результатами аналізу тих самих модельних розчинів. Концентрацію натрію саліцилату в лікарській формі встановлювали як середнє з результатів аналізу п'ятнадцяти визначень ($n=15$). Відносне стандартне відхилення S_z % розраховували за

$$\text{формулою: } S_z \% = \frac{1}{\sqrt{3}} \cdot \sqrt{\frac{\sum (z_i - \bar{z})^2}{n-1}}, \text{ враховуючи,}$$

що кожна лікарську форму титрували тричі (три паралельних визначення). Відносний довірчий інтервал вмісту натрію саліцилату встановлювали за співвідношенням: $\Delta_{\text{As}} \% = t(95\%, 14) \cdot S_z$. Отримані результати наведено в таблиці 3.

Для визначення відтворюваності методики в умовах двох різних лабораторій, тобто визначення впливу внутрішньолабораторних варіацій (різні дні, різні аналітики, різний мірний посуд та ін.), розраховували середнє значення концентрації натрію саліцилату в лікарській формі за експериментальними даними двох лабораторій Z_{intra} , об'єднане відносне стандартне відхилення $\text{RSD}_{\text{intra}}$, міжлабораторну систематичну погрішність δ_z , відносний довірчий інтервал середнього значення Δ_{intra} . Отримані результати наведено в таблиці 4.

Оцінку одержаних валідаційних характеристик методики проводили шляхом порівнювання з критеріями прийнятності, які наведено вище. Як бачимо (табл. 2-4), отримані показники метрологічних характеристик методики є граничними (тобто перебувають на межі) порівняно з зазначеними критеріями, до того ж, без урахування похибки, яка вноситься розчином плацебо. Це, почасти, пов'язано з тим, що у фармації метрологічні вимоги заздалегідь обумовлені не можливостями методу аналізу, а вимогами специфікації, тобто нормується максимально припустима невизначеність, при якій результати є припустимими для даного нормування вмісту. В нашому випадку, визначення проводили на межі можливостей титриметричного методу через вузькі допуски вмісту натрію саліцилату.

ВИСНОВКИ. 1. В умовах двох лабораторій з контролю якості лікарських засобів проведено валідацію титриметричної методики кількісного визначення аптечної лікарської форми, яка містить натрію саліцилат.

Таблиця 2 – Результати вивчення лінійності модельних розчинів та отримані параметри лінійної залежності

№ модельного розчину	Введено x_i (%)	Лаб. № 1				Лаб. № 2			
		Об'єм титранту V_i (мл)	Знайдено y_i (%) $K_1=1,0109$	Значення	$Y_i=bx_i+a$	Об'єм титранту V_2 (мл)	Знайдено y_i (%) $K_2=0,9907$	Значення	$Y_i=bx_i+a$
1	80,02	2,95	79,57		80,45	3,05	80,63		79,91
2		3,00	80,92		80,45	3,00	79,31		79,91
3		2,95	79,57		80,45	3,00	79,31		79,91
4	90,01	3,30	89,01		90,25	3,35	88,56		89,73
5		3,30	89,01		90,25	3,40	89,88		89,73
6		3,35	90,36		90,25	3,40	89,88		89,73
7	100,1	3,80	102,5		100,14	3,80	100,45		99,64
8		3,75	101,15		100,14	3,75	99,13		99,64
9		3,75	101,15		100,14	3,80	100,45		99,64
10	110,01	4,10	110,59		109,85	4,15	109,71		109,38
11		4,15	111,94		109,85	4,15	109,71		109,38
12		4,10	110,59		109,85	4,20	111,03		109,38
13	120,02	4,40	118,69		119,67	4,50	118,96		119,21
14		4,35	117,34		119,67	4,45	117,64		119,21
15		4,40	118,69		119,67	4,50	118,96		119,21
кутовий коефіцієнт лінійної залежності b				0,9803				0,9825	
S_b				0,03				0,02	
вільний член лінійної залежності a				2,01				1,29	
S_a				2,57				1,6	
критичне значення для вільного члена лінійної залежності				2,05				2,05	
залишкове стандартне відхилення S_{res}				1,39				0,88	
критичне значення залишкового стандартного відхилення RSD_0				0,72				0,72	
коефіцієнт кореляції методики r				0,9957				0,9983	
критерій лінійного коефіцієнта кореляції R_c				0,9988				0,9988	

Таблиця 3 – Результати аналізу модельних розчинів та їх статистична обробка

№ модельного розчину	Введено x_i (%)	Лаб. № 1			Лаб. № 2		
		Об'єм титранту V_i (мл)	Знайдено y_i (%) $K_1=1,0109$	Знайдено в % до введеного $Z_i=100(Y_i/X_i)$	Об'єм титранту V_i (мл)	Знайдено y_i (%) $K_2=0,9907$	Знайдено в % до введеного $Z_i=100(Y_i/X_i)$
1	80,02	2,95	79,57	99,45	3,05	80,63	100,76
2		3,00	80,92	101,13	3,00	79,31	99,11
3		2,95	79,57	99,45	3,00	79,31	99,11
4	90,01	3,30	89,01	98,90	3,35	88,56	98,39
5		3,30	89,01	98,90	3,40	89,88	99,86
6		3,35	90,36	100,40	3,40	89,88	99,86
7	100,1	3,80	102,5	102,40	3,80	100,45	100,35
8		3,75	101,15	101,05	3,75	99,13	99,03
9		3,75	101,15	101,05	3,80	100,45	100,35
10	110,01	4,10	110,59	100,53	4,15	109,71	99,72
11		4,15	111,94	101,76	4,15	109,71	99,72
12		4,10	110,59	100,53	4,20	111,03	100,93
13	120,02	4,40	118,69	98,89	4,50	118,96	99,12
14		4,35	117,34	97,77	4,45	117,64	98,01
15		4,40	118,69	98,89	4,50	118,96	99,12
середнє $Z\%$				100,07			99,56
відносне стандартне відхилення $S_z\%$				0,74			0,48
відносний довірчий інтервал $\Delta as\%$				1,30			0,84
критичне значення для збіжності результатів $\Delta as\%$						1,28	
систематична погрішність $\delta\%$				0,07			-0,44
критерій невизначеності систематичної погрішності 1) статистична невизначеність; 2) якщо не виконується 1), то практична невизначеність $\delta \leq 0,41$						0,11	

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 4 – Результати дослідження міжлабораторної точності вивчення

об'єднане середнє Z_{intra}	99,82	
відносне стандартне відхилення S_{intra}	0,75	0,48
об'єднане відносне стандартне відхилення RSD_{intra}	1,12	
критичне значення для збіжності результатів $\Delta_{as}\%$	1,28	
міжлабораторна систематична погрішність δ_z	0,18	
критерій невизначеності систематичної погрішності $\delta \leq 0,41$	0,41	
відносний довірчий інтервал окремого результату Δ_z	1,14	
відносний довірчий інтервал середнього значення $\Delta_{intra} = t[95\%, m \cdot (n-1)] \cdot RSD_{intra} / \sqrt{15} = 1,7613 \cdot RSD_{intra} / \sqrt{15}$	0,51	
загальний висновок про методику	коректна	

2. Отримані метрологічні характеристики методики свідчать про можливість використання титриметричного методу для аналізу даної лікарської форми в умовах аптек, але при розширенні допусків вмісту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек: Методичні рекомендації (затверджено наказом МОЗ України від 3 серпня 2005 р. № 391). – 2-ге вид. – К.: МОЗ України, 2005. – 98 с.
2. Гризодуб А.И. Стандартные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // Фармаком. – 2006. – № 1/2. – С. 35-44.
3. Государственная Фармакопея СССР. – 10-е изд. – М.: Медицина, 1968. – 1080 с.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-ше вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – 556 с.
5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – Доповнення 1. – Харків: PIPEГ, 2004. – 520 с.
6. Евтифеева О.А., Георгиянц В.А. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения экстенпоральных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества // Фармаком. – 2007. – № 1. – С. 69-81.
7. Максютин Н.П., Каган Ф.Е., Кириченко Л.А., Митченко Ф.А. Методы анализа лекарств. – К.: Здоров'я, 1984. – 224 с.
8. Про затвердження Правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки: Наказ МОЗ України від 15.12.2004 р. №626.
9. Справочник провизора-аналитика / Под ред. Д.С. Волоха, Н.П. Максютинной. – К.: Здоров'я, 1989. – 200 с.
10. Technical Guide for the Elaboration of Monographs, European Pharmacopoeia. – 4th Edition. – 2005. – 67 p.

ВАЛИДАЦІЯ ТИТРИМЕТРИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАТРИЯ САЛИЦИЛАТА В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ АПТЕЧНОГО ПРИГОТОВЛЕНИЯ

В.А. Георгиянц¹, Е.У. Бисага², О.А. Евтифеева¹, Н.В. Гарная¹, Н.Б. Бурд¹
 НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ¹, ХАРЬКОВ
 УЖГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ²

Резюме

Проведено валидацію аналітичної методики кількісного визначення аптечної лікарської форми на основі натрія салицилату, яку виготовляють в аптеці про запас і найбільше часто використовують в різних індивідуальних прописях. Валидацію виконували по схемі, яка приводиться в Государственной Фармакопее України (ГФУ). Были рассмотрены такие параметры, как

диапазон применения, специфичность, линейность, сходимость, правильность и воспроизводимость в условиях двух различных лабораторий, что позволило определить пригодность данной методики для решения поставленных задач в условиях аптек и лабораторий по контролю качества лекарственных средств при расширении допусков содержания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фармацевтический анализ, валидация аналитических методик, экстермпоральная рецептура, натрия салицилат.

VALIDATION OF TITRIMETRIC METHOD OF THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF SODIUM SALICYLATE IN MEDICINAL FORM OF PHARMACY MANUFACTURING

V.A. Heorhiyants¹, Y.I. Bysaha², O.A. Yevtifeyeva¹, N.V. Harna¹, N.B. Burd¹
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY¹, KHARKIV
UZHHOROD STATE UNIVERSITY²

Summary

The validation of analytical method of quantitative determination of the pharmacy medicinal form on the basis of sodium salicylate has been conducted. Investigated medicinal form is made in a pharmacy for emergency and it is most often used in different individual prescriptions. The validation was conducted by the scheme which is adduced in the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU). Such parameters as range of application, specificity, linearity, repeatability, accuracy and reproducibility were studied under conditions of two different laboratories, that has allowed to determine the suitability of the given method under conditions of drugstores and laboratories.

KEY WORDS: pharmaceutical analysis, validation of analytical methods, extemporal prescriptions, sodium salicylate.

Отримано 26.03.2008 р.

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

Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

УДК 615.451.16:581.45:581.821.2:577.1123

АМІНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД СИРОВИНИ ТА СУБСТАНЦІЙ ЯСЕНА ЗВИЧАЙНОГО

В.В. Малий, Я.С. Кічимасова, О.П. Хворост
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Вивчено якісний склад та кількісний вміст амінокислот (АК) в листі й корі ясена звичайного і густих екстрактах з цих видів сировини. В усіх об'єктах вміст замісних АК вищий за вміст незамінних в 1,2-1,9 раза. Листя містить значну кількість глутамінової та аспарагінової кислот, тирозину та фенілаланіну (відповідно, 1545, 1330, 1130, 1070 мкг/100 мг), кора – тирозину та метіоніну (905 і 580 мкг/100 мг); густий екстракт листя – аргініну (650 мкг/100 мг), кори – тирозину та метіоніну (385 і 380 мкг/100 мг відповідно). За вмістом тирозину в листі домінуючими АК є глутамінова кислота (1545 мкг/100 мг) та фенілаланін (1070 мкг/100 мг), в густому екстракті листя – аргінін (650 мкг/100 мг), в корі та субстанціях кори – тирозин (905 і 385 мкг/100 мг відповідно). Дані результати буде враховано в подальших дослідженнях сировини та субстанцій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **листя, кора, амінокислотний склад, субстанція, ясен звичайний.**

ВСТУП. Вивчення амінокислотного складу є досить розповсюдженим аспектом дослідження рослинної сировини [1, 2, 6].

Рослини роду ясен (*Fraxinus* L.) родини маслинових (*Oleaceae*) досить поширені в нашій країні [3, 7]. Найбільш розповсюджений ясен звичайний (*F. excelsior* L.). Рослина не-офіційна, але широко застосовується в народній медицині для лікування артритів, подагри, запалень суглобів як протизапальний, протиревматичний та імуномодулюючий засіб [4, 5, 8, 9].

Метою роботи було встановити якісний склад амінокислот (АК) та їх кількісний вміст в сировині й субстанціях ясена звичайного.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження стали листя та кора ясена звичайного, а також густі екстракти, отримані з даних видів сировини. Сировину було заготовлено в Харківській області: кору – в лютому 2007 р. на початку сокоруху, листя – в травні 2007 р. після повного розгортання листової пластинки. Для визначення АК із сировини отримували водну витяжку, після концентрування якої проводили гідроліз проби в присутності хлористоводневою

з подальшим видаленням останньої. Густі екстракти розчиняли у воді. Якісний склад та кількісний вміст АК визначали за допомогою амінокислотного аналізатора ААА-339. Умови хроматографування: стандартна скляна колонка (виробництво ЧРСП), набивка – іонообмінна смола LG-AND, автоматичне дозування проб, температурний режим 18-32 °С. Кількісну оцінку проводили за площею піків, порівнюючи зі стандартними зразками АК.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Відомості про якісний склад та вміст окремих АК наведено в таблиці 1. Так, найвищий вміст АК при-таманний листю ясена звичайного (13657 мкг/100 мг), що майже втричі більше за вміст АК в корі (4645 мкг/100 мг). У процесі отримання густого екстракту (ГЕ) листя в субстанцію переходить приблизно 1/4 від вмісту АК в сировині, а в ГЕ кори – 1/2 від вмісту АК в сировині. Вміст замісних АК вищий порівняно з незамінними в усіх об'єктах, які вивчали. Так, в листі вміст суми замісних АК в 1,5 раза більший за вміст суми незамінних, у корі – в 1,2 раза, в ГЕ листя – в 1,9, в ГЕ кори – в 1,5 раза.

Із замісних АК в листі міститься значна кількість глутамінової (1545 мкг/100 мг) та

© В.В. Малий, Я.С. Кічимасова, О.П. Хворост, 2008.

аспарагінової кислот (1330 мкг/100 мг). Вміст останньої майже в 1,2 раза нижчий за вміст глутамінової кислоти. У листі міститься 1130 мкг/100 мг тирозину, що в 1,4 раза менше за вміст глутамінової кислоти та в 1,2 раза – за вміст аспарагінової. У процесі отримання густого екстракту листя в субстанцію переходить 1/5 від вмісту в сировині глутамінової кислоти (310 мкг/100 мг) та 1/5 від вмісту в сировині тирозину (290 мкг/100 мг). У густому екстракті листя ясена звичайного міститься майже в 7 разів менше аспарагінової кислоти – 200 мкг/100 мг. У корі міститься 905 мкг/100 мг тирозину, субстанція кори містить в 2,3 раза менше цієї АК (385 мкг/100 мг) та, разом із тим, найбільше містить аргініну – 650 мкг/100 мг в густому екстракті листя.

Із незамінних АК в листі міститься значна кількість фенілаланіну (1070 мкг/100 мг). 220 мкг/100 мг даної АК (близько 1/5 від вмісту в сировині) переходить у субстанцію. У корі найвищий вміст (із незамінних АК) притаманний метіоніну (580 мкг/100 мг), при цьому

в густий екстракт переходить більше половини даної АК (380 мкг/100 мг).

ВИСНОВКИ. 1. Вивчено якісний склад та кількісний вміст АК в листі та корі ясена звичайного і густих екстрактах з цих видів сировини. В усіх об'єктах вміст замісних АК вищий за вміст незамінних в 1,2-1,9 раза.

2. Листя містить значну кількість глутамінової та аспарагінової кислот, тирозину та фенілаланіну (відповідно, 1545, 1330, 1130, 1070 мкг/100 мг), кора – тирозину та метіоніну (905 і 580 мкг/100 мг). Густий екстракт листя – аргініну (650 мкг/100 мг), кори – тирозину та метіоніну (385 і 380 мкг/100 мг відповідно).

3. За вмістом тирозину в листі домінуючими АК є глутамінова кислота (1545 мкг/100 мг) та фенілаланін (1070 мкг/100 мг), в густому екстракті листя – аргінін (650 мкг/100 мг), в корі та субстанціях кори – тирозин (905 і 385 мкг/100 мг відповідно). Дані результати буде враховано в подальших дослідженнях сировини та субстанцій.

Таблиця 1 – Кількісний вміст та якісний склад амінокислот у сировині й густих екстрактах сировини ясена звичайного

№ з/п	Назва АК	Кількісний вміст АК, мкг/100 мг			
		листя	кора	ГЕ листя	ГЕ кори
Незамінні АК					
1	Валін	880	350	65	50
2	Ізолейцин	590	290	135	160
3	Лейцин	890	350	170	160
4	Лізин	555	100	55	60
5	Метіонін	820	580	390	380
6	Треонін	715	180	90	35
7	Фенілаланін	1070	250	220	125
Замінні АК					
8	Аланін	710	105	75	28
9	Аргінін	870	610	650	340
10	Аспарагінова кислота	1330	200	200	100
11	Гістидин	390	230	180	140
12	Гліцин	640	70	150	50
13	Глутамінова кислота	1545	150	310	130
14	Пролін	860	170	150	155
15	Серин	680	105	115	95
16	Тирозин	1130	905	290	385
17	Цистеїн	сліди	сліди	–	–
	Сума незамінних АК	5520	2100	1125	970
	Сума замісних АК	8155	2545	2120	1423
	Загальна сума АК	13657	4645	3245	2393

ЛІТЕРАТУРА

1. Дьяконова Я.В., Кисличенко В.С., Самородов В.М., Поспелов С.В. Встановлення амінокислотного та мінерального складу плодів ехінацеї блідої // Мед. хімія. – 2007. – 9, № 3. – С. 97-99.

2. Жусупова Г.Е. Аминокислотный и минеральный состав субстанций, полученных из надземной

части и корней *Limonium gmelini* // Химия природ. соедин. – 2006. – № 1. – С. 97.

3. Кожно М.А. Каталог дендрофлоры Украины. – К.: Фітосоціоцентр, 2001. – 72 с.

4. Куркин В.А. Фенилпропаноиды лекарственных растений. Распространение, классификация,

- структурный анализ, биологическая активность // Химия природ. соедин. – 2003. – № 2. – С. 87-110.
5. Куркин В.А., Авдеева Е.В., Запесочная Г.Г. и др. Исследования по созданию иммуномодулирующего средства на основе коры сирени обыкновенной // Актуальные проблемы современной химии: Тез. междунар. конф. – Пятигорск, 2000. – С. 35-36.
6. Наумова О.А. Определение аминокислот в плодах бархата амурского // "Современные вопросы теории и практики лекарствоведения": Сб. мат. науч.-практич. конф. с междунар. уч., посвящ. 25-летию фармфакультета ЯГМИ. – Ярославль, 2007. – С. 251-253.
7. Определитель высших растений Украины // Ред. коллегия: Прокудин Ю.Н., Заверуха Б.В., Чопик В.И. – К.: Наукова думка, 1987. – 546 с.
8. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Rutaceae – Elaeagnaceae. – Л.: Наука, 1998. – 357 с.
9. Чекман І.С. Клінічна фітотерапія. – К.: Вид-во А.С.К., 2003. – 290 с.

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ СЫРЬЯ И СУБСТАНЦИЙ ЯСЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО

В.В. Малый, Я.С. Кичимасова, О.П. Хворост
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Изучено качественный состав и количественное содержание аминокислот (АК) в листьях и коре ясеня обыкновенного и густых экстрактах с этих видов сырья. Во всех объектах содержание заменимых АК выше содержания незаменимых в 1,2-1,9 раза. Листья содержат значительное количество глутаминовой и аспарагиновой кислот, тирозина и фенилаланина (соответственно, 1545, 1330, 1130, 1070 мкг/100 мг), кора – тирозина и метионина (905 и 580 мкг/100 мг); густой экстракт листьев – аргинина (650 мкг/100 мг), коры – тирозина и метионина (385 и 380 мкг/100 мг соответственно). По содержанию тирозина в листьях доминирующими АК являются глутаминовая кислота (1545 мкг/100 мг) и фенилаланин (1070 мкг/100 мг), в густом экстракте листьев – аргинин (650 мкг/100 мг), в коре и субстанциях коры – тирозин (905 и 385 мкг/100 мг соответственно). Данные результаты будут учтены в дальнейших исследованиях сырья и субстанций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: листья, кора, аминокислотный состав, субстанция, ясень обыкновенный.

AMINO ACID COMPOSITION OF RAW MATERIAL AND SUBSTANCES OF FRAXINUS EXCELCIOR

V.V. Malyi, Ya.S. Kichymasova, O.P. Khvorost
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

The amino acids qualitative composition and quantitative content in leaves and bark of *Fraxinus excelsior* and dense extracts from these types of raw material has been determined. All the objects contain more nonessential amino acids in 1,2-1,9 times than essential ones. Leaves contain valuable quantity of glutamine acid, aspartic acid, tyrosine and phenylalanine (respectively 1545, 1330, 1130, 1070 mkg/100 mg), bark contains tyrosine and methionine (905 and 580 mkg/100 mg respectively). Leaves dense extract contains arginine (650 mkg/100 mg), bark dense extract contains tyrosine and methionine (385 and 380 mkg/100 mg respectively). By the tyrosine content in leaves glutamine acid (1545 mkg/100 mg) and phenylalanine (1070 mkg/100 mg) dominate. In dense extract of leaves there are 650 mkg/100 mg of arginine, in bark and bark substances there are 905 and 385 mkg/100 mg of tyrosine respectively. The present results will be accounted in the further research of raw material and substances.

Отримано 18.03.2008 р.

KEY WORDS: amino-acid composition, leaves, bark, substance, *Fraxinus excelsior*.

Адреса для листування: В.В. Малый, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.

УДК 612.233+612.176:577.151.6

АНТИОКСИДАНТНІ ЕФЕКТИ ГЛУТАРГІНУ ЗА УМОВ ПЕРЕРИВЧАСТОЇ ТА ГОСТРОЇ ГІПОКСИЧНОЇ ГІПОКСІЇ

О.О. Гончар, Н.Н. Стешенко

ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ НАН УКРАЇНИ, КИЇВ

Профілактичне застосування донатора оксиду азоту глутаргіну за умов переривчастого гіпоксичного тренування посилює антиоксидантний захист та підвищує стійкість до гострої гіпоксії. Було показано, що формування адаптаційних антиоксидантних реакцій при фармацевтичній корекції є тканинспецифічним процесом.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: глутаргін, гіпоксія, антиоксидантна система.

ВСТУП. Останнім часом в медичній та спортивній практиці широко застосовують гіпоксичне тренування з метою підвищення адаптаційного потенціалу організму і його захисту від екстремальних впливів [2]. Вважається, що протекторна дія переривчастої гіпоксії опосередкована періодичною низькоінтенсивною індукцією активних форм кисню (АФК) [7]. Однак при різних режимах гіпоксичних тренувань у деяких тканинах відсутня повна компенсація вільнорадикальних процесів з боку антиоксидантної системи [1]. Підсилити ефекти адаптаційних тренувань дозволяє використання фармакологічних препаратів з швидким стимулювальним впливом на метаболічні процеси. Глутаргін (L-аргінін-L-глутамат) (фармацевтична фірма "Здоров'я", Харків) широко застосовують в медичній практиці при лікуванні гострих і хронічних гепатитів, отруень, метаболічних інтоксикацій. Глутаргіну притаманна антигіпоксична та мембраностабілізуюча активність, а наявний у його складі L-аргінін може бути попередником синтезу оксиду азоту [5, 6]. Згідно із сучасними даними, система оксиду азоту (NO) відіграє суттєву роль у патогенезі гіпоксичних станів. Показано, що позитивні адаптаційні ефекти можуть нівелюватися інгібіторами NO-синтази та посилюватися при застосуванні NO-донорів [4]. Метою дослідження було встановлення впливу глутаргіну на перебіг прооксидантно-антиоксидантних процесів у тканинах щурів за умов гострої та довготривалої переривчастої гіпоксії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проведено на щурах-самцях лінії Вістар масою © О.О. Гончар, Н.Н. Стешенко, 2008.

200-220 г, які перебували на стаціонарному раціоні. Перед дослідженням тварин поділили на групи (по 6 у кожній): 1-ша – контроль (нормоксія); 2-га – гостра гіпоксія (тварини дихали гіпоксичною газовою сумішшю, що містила 7 % O₂ в азоті, протягом 45 хв) (ГГ); 3-тя – переривчасте гіпоксичне тренування (тварини дихали гіпоксичною газовою сумішшю, що містила 12 % O₂ в азоті, протягом 5 хв із 15-хвилинними нормоксичними інтервалами), чергування періодів гіпоксія/нормоксія тривали 65 хв кожен день протягом 3 тижнів (ПГТ); 4-та – гостра гіпоксія на першу добу після адаптаційних гіпоксичних тренувань (ПГТ+ГГ); 5-та – переривчасте гіпоксичне тренування з одночасним застосуванням глутаргіну (ПГТ+Глут.), 4 % розчин глутаргіну вводили внутрішньоочеревинно раз на добу протягом 3 тижнів гіпоксичних тренувань в дозі 100 мг/кг маси тварин (60 мг/кг у перерахунку на L-аргінін) [5]; 6-та – гостра гіпоксія на першу добу після довготривалої переривчастої гіпоксії з одночасним застосуванням глутаргіну (ПГТ+Глут.+ГГ).

Одноразовий гострий гіпоксичний вплив після закінчення 3-тижневого циклу гіпоксичних тренувань використовували як тестуючий для оцінки загальної резистентності тварин, адаптованих до гіпоксії. З тканин міокарда, легень та печінки виготовляли гомогенати на 0,025 М Трис-буфері (рН-7,4;1:9). Процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за вмістом у тканинах активних продуктів 2-тіобарбітурової кислоти (ТБК-АП) [8], антиоксидантний захист – за активністю супероксиддисмутази (СОД) [9], каталази (КАТ) [3], глутатіонпероксидази (ГП) [10]. Вміст білка визначали за методом Лоурі. Отримані результати обробляли

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

статистично, використовуючи t-критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Довготривала переривчаста гіпоксія призводила до зростання в тканинах печінки і легень активності КАТ при збереженні активності СОД і ГП в межах норми. Такі зміни в антиоксидантній системі відбувалися на тлі підвищеного вмісту ТБК-АП, що свідчить про напругу прооксидантно-антиоксидантного балансу в тканинах печінки і легень за умов тривалого впливу періодів гіпоксія/реоксигенація. Іншу реакцію відмічали з боку міокарда, де активність СОД зростала на 23 % ($p < 0,05$), тоді як активність КАТ і ГП, а також вміст ТБК-АП залишалися на рівні контролю. При дії гострої гіпоксії у тканинах тварин, адаптованих до нестачі кисню, мали місце зниження вмісту вторинних продуктів ПОЛ на 14-18 % ($p < 0,05$), підвищення активності ГП на 15-20 % ($p < 0,05$) при тенденції до зростання активності СОД і КАТ на відміну від стану гострої гіпоксії (2-га група) (табл. 1).

Застосування глутаргіну впродовж усього циклу гіпоксичних тренувань не викликало значних змін в ліпопероксидазних процесах та активності досліджуваних антиоксидантних ферментів у тканинах щурів порівняно з тваринами, які мали лише тренувальний цикл. Однак при дії надзвичайного подразника в тканині печінки таких тварин реєстрували значне зменшення вмісту ТБК-АП (на 29 %, $p < 0,05$), підвищення активності СОД, ГП (на 20-

21 %, $p < 0,05$), зниження активності КАТ (на 21%, $p < 0,05$) порівняно з гострою гіпоксією. Попередні дослідження антигіпоксичних властивостей прекурсора синтезу оксиду азоту L-аргініну показали, що препарат нормалізує стан біомембран, гальмує процеси ПОЛ за умов високогірної гіпоксії [11], проявляє позитивний вплив на антиоксидантні та енергозабезпечувальні процеси клітин при гострій циркуляторно-гемічній гіпоксії [5] та гострій гемічній гіпоксії, спричиненій монооксидом вуглецю [6]. Результати досліджень показників прооксидантно-антиоксидантного балансу в тканинах серця і легень при дії гострої гіпоксії у тренуваних на фоні препарату щурів вказують на те, що ці показники значно не відрізнялися від таких у тренуваних без фармакологічної підтримки тварин (4-та група). Таким чином, у тканинах серця і легень при застосуванні глутаргіну антиоксидантні ефекти гіпоксичних тренувань зберігалися, але не підсилювалися, як це було в печінці, що свідчить про наявність тканинної специфічності при формуванні адаптаційних реакцій за умов фармацевтичної корекції.

ВИСНОВКИ. 1. Підвищення потужності NO-продуруючих систем при профілактичному застосуванні глутаргіну сприяє зменшенню зумовлених гострою гіпоксією порушень прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу в печінці, міокарді та легенях тварин.

2. За умов надзвичайного подразника, що призводить до інтенсифікації вільноради-

Таблиця 1 – Показники прооксидантно-антиоксидантної системи щурів за умов переривчастої, гострої гіпоксичної гіпоксії та введення глутаргіну ($M \pm m$, $n=6$)

Показники		ТБК-АП, нмоль/мг білка	КАТ, МО/мг білка	СОД, ум. од./ мг білка	ГП, мкмоль глутатіону/ хв/мг білка
Контроль (нормоксія)	1	22,18±1,01	43,16±1,18	4,01±0,30	9,50±0,40
	2	10,94±1,00	22,16±1,10	3,35±0,15	5,25±0,36
	3	16,01±0,80	39,48±2,46	2,42±0,28	4,23±0,28
ГГ	1	36,82±2,14 [*]	57,00±2,09 [*]	3,33±0,21 [*]	7,35±0,41 [*]
	2	17,81±1,13 [*]	28,07±0,86 [*]	2,70±0,16 [*]	4,31±0,24 [*]
	3	24,70±1,31 [*]	50,03±2,21 [*]	1,92±0,10 [*]	3,30±0,22 [*]
ПГТ	1	25,30±0,78 [*]	47,27±0,96 [*]	3,80±0,28	8,85±0,39
	2	11,06±0,94	21,68±1,04	4,12±0,35 [*]	5,60±0,19
	3	18,05±1,15	45,42±1,70 [*]	2,16±0,34	4,62±0,40
ПГТ+ГГ	1	30,24±1,14 ^{*#}	50,08±1,07 [#]	3,66±0,19	8,47±0,27 [#]
	2	15,25±0,74 ^{*#}	27,06±0,69 [*]	3,09±0,10 [#]	4,86±0,20 [#]
	3	20,16±1,10 ^{*#}	47,20±1,21 [*]	2,09±0,11	3,97±0,18 [#]
ПГТ+глутаргін	1	24,66±1,22	46,13±1,67	3,86±0,31	9,13±0,52
	2	12,13±1,08	22,47±1,16	3,60±0,22	5,19±0,33
	3	17,88±0,82	46,11±1,30 [*]	2,20±0,25	4,45±0,35
ПГТ+глутаргін+ГГ	1	26,18±1,04 ^{*#}	45,01±1,10 [#]	3,98±0,17 [#]	9,54±0,36 [#]
	2	14,46±0,80 ^{*#}	26,17±0,77 [#]	3,11±0,12	5,04±0,20 [#]
	3	19,39±1,01 ^{*#}	48,00±2,16 [*]	1,97±0,16	3,78±0,21

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно гострої гіпоксії; ^ – $p < 0,05$ порівняно з групою "ПГТ+ГГ"; 1 – печінка; 2 – міокард; 3 – легені.

кальних процесів, глутаргін здатен посилювати адаптаційні антиоксидантні реакції гіпоксичних

тренувань, при цьому ефективність цих процесів зумовлена тканинною специфічністю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гончар О.А., Розова Е.В. Влияние разных режимов интервальных гипоксических тренировок на морфологические характеристики и антиоксидантный статус тканей сердца и легких // Бюл. экспер. биол. и мед. – 2007. – № 8. – С. 216-221.
2. Колчинская А.Э., Цыганова Т.Н., Остапенко Л.А. Нормобарическая интервальная гипоксическая тренировка в медицине и спорте. – М.: Наука, 2003. – 408 с.
3. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
4. Кургалюк Н.М., Ткаченко Г.М. Функціональний стан мітохондрій міокарда щурів за адаптації до інтервальної гіпоксії під впливом L-аргініну // Укр. біохім. журн. – 2004. – № 3. – С. 79-84.
5. Посохова К.А., Ніколаєва В.В. Вплив глутаргину та пірацетаму на перебіг циркуляторно-гемічної гіпоксії // Ліки. – 2003. – № 5-6. – С. 42-46.
6. Посохова К.А., Гриців О.В., Олещук О.М. Вплив аргініну на прояви гіпоксичної гіпоксії та

немічної гіпоксії, спричиненої чадним газом // Вісн. наук. досліджень. – 2004. – № 1. – С. 93-96.

7. Сазонова Т.Г., Архипенко Ю.В. Роль свободнорадикальных процессов и редокс-сигнализации в адаптации организма к изменению уровня кислорода // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2005. – **91**, № 6. – С. 636-655.

8. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М., 1977. – С. 66-68.

9. Misra H., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of Epinephrine and a simple assay superoxide dismutase // J. Biol. Chem. – 1972. – **247**. – P. 3170-3175.

10. Olinescu R., Nita S. Influence of hemoproteins on glutathione peroxidase activity // Rev. Roum. Biochem. – 1973. – **10**, № 2. – P. 119-129.

11. Schneider J., Blazy I., Dechaux M., Rabier D. Response of nitric oxide pathway to L-arginine infusion at the altitude of 4,350 m // Eur. Respir. J. – 2001. – **18**, № 2. – P. 286-292.

АНТИОКСИДАНТНЫЕ ЭФФЕКТЫ ГЛУТАРГИНА В УСЛОВИЯХ ПЕРЕРЫВИСТОЙ И ОСТРОЙ ГИПОКСИИ

О.А. Гончар, Н.Н. Стешенко

ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. А.А. БОГОМОЛЬЦА НАН УКРАИНЫ, КИЕВ

Резюме

Профилактическое применение донатора оксида азота глутаргина в условиях прерывистой гипоксической тренировки усиливает антиоксидантную защиту и повышает стойкость к острой гипоксии. Было показано, что формирование адаптационных антиоксидантных реакций при фармацевтической коррекции является тканеспецифическим процессом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **глутаргин, гипоксия, антиоксидантная система.**

ANTIOXIDATIVE EFFECTS OF GLUTARGIN UNDER INTERMITTENT AND ACUTE HYPOXIA

O.O. Honchar, N.N. Steshenko

INSTITUTE OF PHYSIOLOGY BY O.O. BOHOMOLET'S OF NAS OF UKRAINE, KYIV

Summary

The prophylactic introduction of the precursor of nitric oxide glutargin during intermittent hypoxic training strengthens antioxidative defence and increases resistance to acute hypoxia. It is determined that the forming of adaptive antioxidative reactions under conditions of pharmaceutical correction is a tissue-specific process.

KEY WORDS: **glutargin, hypoxia, antioxidative system.**

Отримано 26.03.2008 р.

Адреса для листування: О.О. Гончар, вул. М. Залка, 8, кв. 46, Київ, 04211, Україна.

Медицина хімія – т. 10, № 2, 2008

АНАЕРОБНИЙ ГЛІКОЛІЗ У СЕРЦІ ДОРΟΣЛИХ І СТАРИХ ЩУРІВ ЗА УМОВ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОГО СТРЕСУ

В.М. Швець

ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

З метою визначення причин вікової зміни чутливості серця до стресу було вивчено вміст лактату та пірувату в серцевому м'язі дорослих і старих щурів при імобілізаційному стресі. Отримані дані свідчать про те, що інтенсивність гліколізу в серці старих щурів нижча, ніж у дорослих тварин, хоча в них зростає інтенсивність анаеробної фази процесу. Імобілізація щурів обох вікових груп супроводжується стимуляцією анаеробного гліколізу. Ця стимуляція у старих тварин більш виражена, ніж у дорослих.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: імобілізаційний стрес, гліколіз, серце, старіння, лактат, піруват.

ВСТУП. Під час старіння відбувається зниження стійкості серця до дії пошкоджувальних факторів стресу [7, 9], що є однією з причин виникнення вікової патології в пізньому онтогенезі. Однак тонкі механізми цього феномена досі залишаються недостатньо вивченими.

Стійкість тканин внутрішніх органів до дії пошкоджувальних факторів стресу багато в чому визначається рівнем їх енергетичного забезпечення [1, 8, 12]. Важливу роль в енергетичному забезпеченні серцевого м'яза відіграє гліколіз [11]. Враховуючи це, з метою подальшого розвитку уявлень про механізми вікового зниження стійкості серця до стресу в даній роботі було вивчено вплив імобілізаційного стресу на стан анаеробного гліколізу в міокарді дорослих і старих щурів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 30 щурах-самцях лінії Вістар двох вікових груп – дорослих (10-12 місяців) і старих (22-24 місяці). Тварин обох груп, у свою чергу, поділили на 3 підгрупи: 1-ша – інтактні; 2-га – щури, яких піддавали імобілізаційному стресу шляхом фіксації на спині протягом 30 хв; 3-тя – тварини, котрим за 15 хв до імобілізації внутрішньочеревно вводили диметилсульфоксид (ДМСО) у дозі 175 мг/100 г маси.

Ефективність відтворення стресу контролювали за концентрацією адреналіну та 11-оксикортикостероїдів у крові [6]. Тварин декапітували, негайно з грудної клітки виймали серце та поміщали у рідкий азот. Заморожений

© В.М. Швець, 2008.

міокард лівого шлуночка гомогенізували з охолодженою 0,4 н. хлорною кислотою. Гомогенати центрифугували в отриманих безбілкових екстрактах, після їх нейтралізації за допомогою ензимологічних методів проводили визначення вмісту молочної та піровиноградної кислот [3].

Отримані результати піддавали статистичній обробці за методом Вількоксона-Манна-Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані результати наведено в таблиці 1. Вони свідчать про те, що в міокарді старих щурів вміст пірувату на 53 % нижчий, а величина показника співвідношення лактат/піруват на 85 % вища, ніж у дорослих тварин (рис. 1). Одержані дані відповідають результатам досліджень інших авторів [8], згідно з якими під час старіння зростає інтенсивність анаеробного гліколізу в міокарді.

Під час імобілізаційного стресу в міокарді тварин обох вікових груп різко підвищувались концентрація молочної кислоти та величина показника співвідношення лактат/піруват. При цьому вміст молочної кислоти в серці старих щурів зростав в 1,4 раза інтенсивніше, ніж у дорослих тварин. Проте, незважаючи на вікові відмінності в накопиченні молочної кислоти в серцевому м'язі щурів під час імобілізаційного стресу, величина показника співвідношення концентрацій молочної та піровиноградної кислот у серці дорослих і старих тварин даної вікової групи підвищувалась однаково.

Попереднє введення ДМСО не впливало на зміну величини цих показників під час імобілізації.

Таблиця 1 – Вплив іммобілізаційного стресу на вміст анаеробного гліколізу в серці дорослих і старих щурів (M±m)

Вік	Дорослі			Старі		
	Інтактн.	Стрес	ДМСО+ стрес	Інтактн.	Стрес	ДМСО+ стрес
Лактат	3,4±0,2	4,7±0,2*	4,4±0,3*	2,8±0,1	4,3±0,2*	4,5±0,3*
Піруват	0,17±0,03	0,15±0,01	0,16±0,02	0,08±0,01**	0,08±0,01	0,09±0,01

Примітки: 1. У досліджах використовували по 5-6 щурів.
2. Вміст метаболітів виражено в мкмоль/г тканини.
3. * – p<0,05 щодо інтактних; ** – p<0,05 щодо інтактних старих.

Аналіз отриманих даних вказує на те, що під час старіння у серці відбувається зростання інтенсивності анаеробного гліколізу. Це свідчить про підвищення ролі анаеробного метаболізму глюкози в енергетичному забезпеченні серцевого м'яза в пізньому онтогенезі, що, цілком ймовірно, є пристосувальною реакцією, спрямованою на підтримку адекватного енергетичного забезпечення кардіоміоцитів за умов вікового обмеження коронарного кровотоку в серці.

При іммобілізаційному стресі в міокарді щурів обох вікових груп відбувалось підвищення інтенсивності анаеробного гліколізу. Такі зрушення є неспецифічною активною реакцією метаболізму, спрямованою на компенсацію енергетичної потреби міокардіальних клітин, яка зростає за умов стресорної стимуляції симпатoadреналової системи [2].

Характерно, що підвищення інтенсивності анаеробного гліколізу в серці щурів обох вікових груп не попереджувалось введенням антиоксиданту (ДМСО). Цей факт свідчить про те, що механізм стимуляції даного процесу не пов'язаний зі стресорною стимуляцією вільнорадикальних реакцій у міокарді. Важливу роль у його виникненні може відігравати зміна

концентрації алостеричних регуляторів ключових ферментів гліколізу, а також збільшення швидкості їх утворення в кардіоміоцитах під впливом фактора HIF-1, що активується в серці за умов тканинної гіпоксії [4, 10].

Інтенсивність стимуляції анаеробного гліколізу в серці має визначені вікові особливості. Значно більшою мірою вона виражена у старих щурів. Оцінюючи причини виявлених вікових відмінностей, можна висловити припущення про їх взаємозв'язок з неоднаковим рівнем тканинної гіпоксії, що виникає в міокарді під час іммобілізації дорослих і старих щурів. В основі їх виникнення можуть бути вікові відмінності у стані адренореактивності серця [5].

Підвищення ефективності стресорної стимуляції анаеробного гліколізу в серці під час старіння відображає особливу роль цього процесу в енергетичному забезпеченні серцевого м'яза за умов впливу негативних зовнішніх факторів на організм у пізньому онтогенезі. У дорослих тварин, цілком ймовірно, разом зі стимуляцією анаеробного гліколізу важливого значення в компенсації енергетичних затрат серцевого м'яза під час стресу набувають і інші шляхи метаболізму, до яких належать аеробні процеси. Усе це може бути проявом у них вищої ефективності реалізації компенсаторних механізмів, що зумовлюють значну адаптацію міокарда до дії пошкоджувальних факторів стресу порівняно зі старими тваринами. Проте висловлене припущення вимагає проведення експериментальної перевірки в подальших наших дослідженнях.

ВИСНОВКИ. 1. Іммобілізаційний стрес супроводжується підвищенням інтенсивності анаеробного гліколізу в серці більшою мірою у старих, ніж у дорослих, щурів.

2. Стимуляція анаеробного гліколізу в серці дорослих і старих іммобілізованих щурів не пов'язана зі стресорним підвищенням інтенсивності вільнорадикальних процесів у серцевому м'язі.

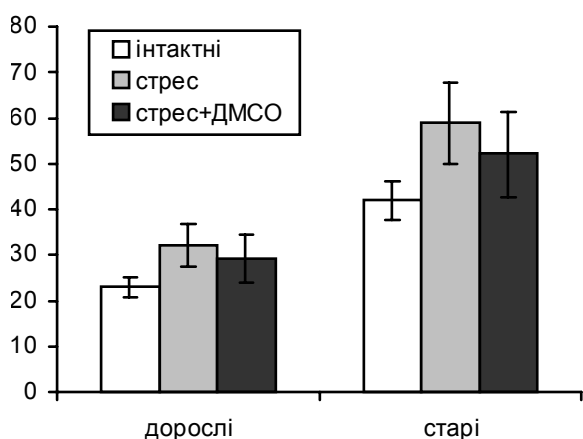


Рис. 1. Співвідношення лактат/піруват у серці дорослих і старих щурів, яких піддавали 30-хвилинній іммобілізації (в експериментах використовували по 5-6 тварин).

ЛІТЕРАТУРА

1. Богацкая Л.Н., Кульчицкий О.К. Энергетическая обеспеченность функций при старении // Вопросы геронтологии. – К., 1986. – 8. – С. 23-56.
2. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. – М.: Медицина, 1984. – 270 с.
3. Мильман Л.С., Юровицкий Ю.Г., Ермолаева Л.П. Определение активности важнейших ферментов энергетического обмена // Методы биологии развития. – М.: Наука, 1974. – С. 321-323.
4. Мінченко О.Г., Мінченко Д.О., Бабарикіна А.Ю. та ін. Молекулярні механізми адаптації клітин до гіпоксії // В сборнике тезисов IX Украинского биохимического съезда (24-27 октября 2006 г., Харьков). – Харьков, 2006. – 1. – С. 22.
5. Фролькис В.В., Безруков В.В., Кульчицкий О.К. Старение и экспериментальная патология сердечно-сосудистой системы. – К.: Наукова думка, 1994. – 215 с.
6. Davydov V.V., Shvets V.N. Age-dependent differences in the stimulation of lipid peroxidation in the heart of rats during immobilization stress // Exp. Gerontol. – 2003. – 38, № 4. – P. 693-998.
7. Docherty I.R. Cardiovascular responses in aging // Pharmacol. Rev. – 1990. – 42. – P. 103-126.
8. Linnane A.W., Kovalenko S., Gingold E.B. The universality of bioenergetic disease. Age-associated cellular bioenergetic degradation and amelioration therapy // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1998. – 854. – P. 202-213.
9. Locke M., Tanguay R.M. Diminished heat shock response in the aged myocardium // Cell Stress Chaperones. – 1996. – 1. – P. 251-260.
10. Minchenko D.O., Hoenner M., Esumi H. et al. Cell-specific regulation of the p53 gene expression by hypoxia // В сборнике тезисов IX Украинского биохимического съезда (24-27 октября 2006 г., Харьков). – Харьков, 2006. – 1. – С. 22-23.
11. Stryer L. Biochemistry. – N.Y.: W.H. Freeman and Company, 1995. – 1064 p.
12. Young A. Aging and physiological functions // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 1997. – 352, № 1363. – P. 1837-1843.

АНАЭРОБНЫЙ ГЛИКОЛИЗ В СЕРДЦЕ ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

В.Н. Швець

ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

С целью определения причин возрастного изменения чувствительности сердца к стрессу было изучено содержание лактата и пирувата в сердечной мышце взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе. Полученные данные свидетельствуют о том, что интенсивность гликолиза в сердце старых крыс ниже, чем у взрослых животных, хотя у них возрастает интенсивность анаэробной фазы процесса. Иммобилизация крыс обеих возрастных групп сопровождается стимуляцией анаэробного гликолиза. Эта стимуляция у старых животных более выражена, чем у взрослых.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: иммобилизационный стресс, гликолиз, сердце, старение, лактат, пируват.

ANAEROBIC GLYCOLYSIS IN THE HEART OF ADULT AND OLD RATS DURING IMMOBILIZATION STRESS

V.M. Shvets

ZAPORIZHYAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Summary

The concentration of lactate and pyruvate in myocardium of adult and old Wistar rats during immobilization stress was studied in order to learn the causes of age-related changes of heart resistance to stress. Obtained data proved that intensity of anaerobic glycolysis in the heart of old rats was lower than in adult ones. Immobilization of adult and old animals was accompanied by the stimulation of anaerobic glycolysis. Intensity of this stimulation in myocardium of old animals was more pronounced than in adult ones.

KEY WORDS: immobilization stress, glycolysis, heart, aging, lactate, pyruvate.

Отримано 19.02.2008 р.

Адреса для листування: В.М. Швець, Запорізький державний медичний університет, пр. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.

АНАБОЛІЧНА ДІЯ ХІНОБОЛІНУ НА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ АЛІМЕНТАРНОЇ БІЛКОВОЇ ДИСТРОФІЇ

А.І. Березнякова, І.Ю. Тіщенко, О.Ф. Тацький, Е.Л. Торянік
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

У роботі наведено результати дослідження анаболічної активності хіноболіну при аліментарній білковій дистрофії. Показано, що хіноболін в дозі 42 мг/кг має активну анаболічну дію на моделі білкового голодування. Механізм анаболічної дії хіноболіну можна, мабуть, пояснити його активним впливом на білковосинтезувальний апарат клітини, активацією процесів трансамінування, затримкою азоту в організмі (створення позитивного азотистого балансу) та прискоренням включення ¹⁴C-мічених амінокислот у знову синтезовані білки.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хіноболін, анаболічна дія, аліментарна білкова дистрофія.

ВСТУП. У скринінгових дослідженнях з пошуку речовин, що мають анаболічну дію серед похідних хінолон-карбонових кислот, нами виявлено амід, умовно названий хіноболіном, який за анаболічним ефектом не поступається оротату калію, але в 1,43 раза менш токсичний і в 1,3 раза перевищує за широтою терапевтичної дії препарат порівняння.

Метою даної роботи стало вивчення анаболічної дії хіноболіну на моделі аліментарної білкової дистрофії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Аліментарну дистрофію викликали за методом Е.А. Васильченко та співавт. [2], згідно з яким протягом 14 днів щурята отримували безбілкову їжу.

Експерименти було поставлено на 100 щурках-самцях масою 170,0-180,0 г, розподілених на 4 групи: 1-ша група – інтактні тварини (біологічний контроль); 2-га – здорові тварини, які отримували на фоні повноцінного харчування хіноболін в дозі ED₅₀ (42 мг/кг); 3-тя група – щури, яким протягом 14 днів голодування давали тільки звичайну водопровідну воду; 4-та група – тварини, які виходили з голодування на повноцінній дієті та одержували хіноболін в дозі 42 мг/кг (ED₅₀) 1 раз на добу.

Дослідження біохімічних показників крові та додавання ¹⁴C-мічених амінокислот в білок м'язів проводили на 7 і 14 дні годування щурів, а також на 14 день голодування тварин [1].

© А.І. Березнякова, І.Ю. Тіщенко, О.Ф. Тацький, Е.Л. Торянік, 2008.

Тварини 1-ї, 2-ї, 4-ї груп отримували однаково повноцінну білкову їжу.

Протягом експерименту зі щурами поведилися відповідно до міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986).

Статистичну обробку отриманих результатів проводили методами непараметричної статистики з використанням t-критерію Стьюдента [3].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані дані свідчать про те, що в період голодування порушується білковий обмін (табл. 1 і 2).

Однак вже на 7 добу виходу з голодування показники білкового обміну в групі щурів, які виходили зі стану аліментарної дистрофії, поступово вирівнювалися з показниками білкового обміну інтактних тварин, а на 14 добу їх відмінність була незначною (p>0,05).

Поряд із цим відмічали значні зміни в білковому обміні тварин, які отримували хіноболін. Так, вміст загального білка в сироватці крові збільшувався вже на 7 день годування субстанцією: в групі щурів, що виходили з голодування, – на 15,8 % (відносно контролю), в групі здорових тварин, які одержували препарат, – на 14,5 %.

Вміст азоту амінокислот зростав на 11,2 і 20 % відповідно. Значно збільшувався вміст залишкового азоту в сироватці крові: на

Таблиця 1 – Показники білкового обміну в щурів на моделі аліментарної дистрофії (на 14 день голодування) ($\bar{X} \pm Sx$, $n=10$)

Показники	Загальний білок, г/л	Сечовина, ммоль/л	Азот амінокислот, мг/л	Залишковий азот, мг/л	Креатинін, мкмоль/л	Серомукоїди, г/л	Додаток ^{14}C -аміноамінів, т
1-ша група Інтактні щури (біологічний контроль, без введення субстанції)	62,3±2,048	1,857±0,408	94,5±3,73	170,0±19,3	117,3±11,2	2,5±0,264	
2-га група Здорові тварини, які отримували хіноболін (контроль)	67,4±3,71*	1,97±0,316**	99,8±4,71*	197,4±6,3*	116,4±8,3**	2,31±0,215**	
3-тя група Щури з моделлю аліментарної дистрофії, без лікування	52,6±0,945*	9,067±0,03*	101,44±6,7*	306,1±23,4*	127,5±4,1*	2,93±0,32*	

Примітка. * – $p < 0,05$; ** – $p > 0,05$ відносно контролю.Таблиця 2 – Динаміка показників білкового обміну в щурів на моделі аліментарної дистрофії ($\bar{X} \pm Sx$, $n=10$)

Показники впливу	Загальний білок, г/л	Сечовина, ммоль/л	Залишковий азот, мг/л	Азот амінокислот, мг/л	Креатинін, ммоль/л	Серомукоїди, г/л	Додаток ^{14}C в тис.
1-ша група	60,53±0,403	1,93±0,271	169,3±12,7	93,6±6,8	113,7±5,4	2,34±0,132	
Інтактні тварини (біологічний контроль)	59,24±1,72	1,835±0,157	170,0±19,3	94,2±4,73	114,5±3,1	2,47±0,127	
2-га група	63,95±4,56**	1,518±0,124*	235,83±11,51*	91,3±4,5**	114,3±7,7	1,92±0,113*	
Тварини, які виходили з голодування на стандартній дієті, без лікування	62,3±2,33**	1,913±0,405**	223,1±12,4*	95,1±8,13*	112±12,8	2,12±0,136**	
3-тя група	70,1±1,75*	2,017±0,34**	261,2±18,4*	104,5±8,9*	122,12±11,3	2,52±0,396**	
Тварини, які виходили з голодування на стандартній дієті з хіноболіном	73,7±3,51*	2,81±0,311*	250,4±11,6*	110,3±5,71*	120,17±12,6	2,43±0,291**	
4-та група	69,3±2,71*	2,75±0,256*	230,3±13,7*	112,3±9,23*	119,31±10,1	2,73±0,413**	
Здорові тварини, які отримували хіноболін	71,6±2,84*	3,121±0,314*	265,3±18,4*	127,4±7,9*	117,4±8,7	2,56±0,323**	

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно контролю; ** – $p > 0,05$ відносно контролю; в чисельнику результати на 7 день "виходу" тварин з голодування, в знаменнику – на 14 день виходу тварин з голодування.

54,3 % – в групі щурів, які виходили з голодування з хіноболіном, на 36 % – в інтактній групі тварин, годуваних субстанцією. Особливо зріс такий показник анаболічних процесів, як додавання ¹⁴C-мічених амінокислот в білок м'язів: у 4-й групі щурів, які виходили з голодування із субстанцією хіноболін, він дорівнював 30,4 тис. імп. на 1 мг тканини, що на 92,4 % перевищувало дані в контролі (1-ша група), а в 2-й групі здорових тварин, які отримували препарат, зріс на 56,3 %. Крім того, відмічено деяке збільшення вмісту сечовини в крові тварин цих двох груп.

Тенденція до підсилення анаболічних процесів спостерігалася на 14 день виходу тварин з голодування, особливо в 4-й групі щурів, які виходили з голодування з хіноболіном, і в 2-й групі інтактних тварин, які отримували хіноболін.

Рівень загального білка зростав на 24,4 % в 4-й групі тварин і на 21 % – у 2-й; вміст сечовини збільшувався, відповідно, на 53,1 і 70 %, залишкового азоту – на 47 і 56,1 % в 4-й і 3-й

групах; вміст амінного азоту підвищувався на 17,1 % в 4-й групі й на 35,2 % – у 3-й.

Додавання мічених ¹⁴C-амінокислот в білок м'язів збільшувалося: на 95,4 % сильніше відбувалось захоплення в білок м'язів тварин 4-ї групи і на 77,1 % сильніше – в щурів 2-ї групи.

Вміст серомукоїдів і креатиніну в сироватці крові дослідних тварин вірогідно не змінювався в жодному етапі експерименту. Отримані нами результати збігаються з даними інших авторів [1, 4].

ВИСНОВКИ. 1. Хіноболін має активну анаболічну дію на моделі білкового голодування.

2. Механізм анаболічної дії хіноболіну можна, мабуть, пояснити його активним впливом на білковосинтезувальний апарат клітини, активацією процесів трансамінування, затримкою азоту в організмі (створення позитивного азотистого балансу) та прискоренням додавання ¹⁴C-мічених амінокислот у знову синтезовані білки.

ЛІТЕРАТУРА

1. Быков И.Л. Вальпроат-зависимые изменения фонда свободных аминокислот у крыс; эффекты L-карнитина // Эксперим. и клин. фармакол. – 2005. – 68, № 2. – С. 36-39.

2. Васильченко Е.А., Хромова Т.О., Васильева Л.Н., Измайлова И.К. Об экспериментальных моделях нарушений белкового обмена для поиска и изучения средств анаболического действия //

Всесоюз. научн. конф. "Оценка фармакологической активности химических соединений: Тез. докл. – М., 1989. – С. 58-61.

3. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. – М., 2000. – С. 318-320.

4. Яковлева Л.В., Марчишин С.М. Экстракт пирю повзучого – перспективный анаболічний засіб // Вісник фармації. – 2006. – № 2 (46). – С. 74-77.

АНАБОЛИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ХИНОБОЛИНА НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ АЛИМЕНТАРНОЙ БЕЛКОВОЙ ДИСТРОФИИ

А.И. Березнякова, И.Ю. Тищенко, А.Ф. Тацкий, Э.Л. Торяник
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

В работе представлены результаты исследования анаболической активности хиноболина при алиментарной белковой дистрофии. Показано, что хиноболин в дозе 42 мг/кг обладает активным анаболическим действием на модели белкового голодания. Механизм анаболической активности хиноболина можно, наверное, объяснить его активным влиянием на белоксинтезирующий аппарат клетки, активи-

зацией процессов трансаминирования, задержкой азота в организме (создание положительного азотистого баланса) и ускорением включения ^{14}C -меченных аминокислот во вновь синтезированные белки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **хиноболин, анаболическое действие, алиментарная белковая дистрофия.**

ANABOLIC ACTION OF CHINOBOLIN ON EXPERIMENTAL MODEL OF ALIMENTARY PROTEIN DYSTROPHY

A.I. Bereznyakova, I.Yu. Tishchenko, A.F. Tatsky, E.L. Toryanik
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

The results of reseach of anabolic activity of chinobolin at alimentary protein dystrophy are presented in work. It is shown that chinobolin in a doze 42 mg/kg possesses active anabolic action on the model of protein starvation. The mechanism of anabolic activity of chinobolin it is possible to explain, probably, by its active influence on protein-synthesizing apparatus of a cell, activization of transamination processes, nitrogen delay in the organism (creation of positive nitrogenous balance) and acceleration of ^{14}C -labeled amino acids inclusion into again synthesized proteins.

KEY WORDS: **chinobolin, anabolic action, an alimentary protein dystrophy.**

Отримано 19.01.2008 р.

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

**Для отримання оперативної інформації звертайтеся до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua**

РОЗРОБКА НОВОГО ПРЕПАРАТУ З КОМПОЗИЦІЇ ЛІКАРСЬКИХ ТРАВ

Ю.Г. Пісковацький, Л.І. Вишневська, В.А. Георгіянець, В.К. Яковенко, К.О. Хохлова
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

У результаті проведених досліджень з вивчення протизапальних антипроліферативних властивостей препарату "Простатофіт" нами було встановлено, що у дозах 0,5 і 1 мл/кг він достовірно пригнічує розвиток фіброзно-грануляційної тканини навколо чужорідного тіла, порівняно з позитивним контролем, на 24,3 та 54,1 % відповідно, а також не поступається за ступенем пригнічення референтному препарату.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: лікарська рослинна сировина, настойка, специфічна активність.

ВСТУП. Тисячолітній досвід застосування рослинних засобів заклав основи наукового пошуку фітопрепаратів різного характеру фармакологічної дії. Важливим є той факт, що різноманітний і багатий склад біологічно активних речовин у рослинах дозволяє комплексно впливати на організм людини [3, 4].

Нами розроблений склад комплексного препарату з рослинної сировини "Простатофіт" у вигляді складної 70° спиртової настойки: кореня кропиви – 40 г, кореневищ айру – 20 г, квіток ромашки – 20 г, трави буркуну – 20 г, трави чистотілу – 20 г, трави собачої кропиви – 20 г, бруньок березових – 20 г, плодів софори – 20 г, листя шавлії – 20 г, спирту етилового 70° – до 1 л [2, 4, 5].

Водно-спиртова витяжка цієї композиції містить понад 35 біологічно активних речовин (алкалоїди, кумарини, ефірні олії, фенолкарбонові кислоти, вітаміни, флавоноїди, органічні кислоти та ін.). Найбільш значимими з них, з огляду на фармакологічну дію (вплив на обмін речовин у передміхуровій залозі та корекція уродинаміки), є кумарини, алкалоїди і поліфенольні сполуки [3, 4, 5].

Метою нашої роботи було вивчення протизапальної активності препарату "Простатофіт".

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Протизапальну активність "Простатофіту" вивчали на моделі запалення "ватної гранульоми" (антипроліферативна дія) [1].

Експерименти проводили на щурах-самцях масою 180-200 г, яким під шкіру спина

© Ю.Г. Пісковацький, Л.І. Вишневська, В.А. Георгіянець, В.К. Яковенко, К.О. Хохлова, 2008.

імплантували стерильний рулончик фільтрувального паперу, насичений 1 % розчином карагеніну [1].

Маса кожного сухого рулончика складала 45-50 мг. Рулончики та навколишню грануляційну тканину вилучали через 7 днів після операції. Визначали масу вологої та висушеної до постійної маси гранульоми протягом 130 год.

Досліджувані речовини вводили внутрішньошлунково профілактично протягом 7 днів, за годину до імплантації рулончика та щоденно двічі на добу протягом наступних 7 днів після операції.

Було сформовано 5 дослідних груп: 1-ша – тварини, яким вводили препарат "Простатофіт" у дозі 1 мл/кг (n=7); 2-га – "Простатофіт" у дозі 0,5 мл/кг (n=7); 3-тя – "Простатофіт" у дозі 0,1 мл/кг (n=7); 4-та – референтний препарат "Простапол" у дозі 1 мл/кг (n=6); 5-та – спиртовий (негативний) контроль (тварини отримували спирт в адекватній дозі) (n=6); 6-та – позитивний контроль (n=6).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати досліджень наведено у таблиці 1.

Результати експериментів показали, що імплантація ватного рулончика, насиченого карагеніном, викликає розвиток грануляції тканин навколо імплантату.

Спостерігалась виражена залежність ступеня фіброзно-грануляційного процесу від групи дослідів.

Так, у групі позитивного контролю маса вологої і сухої гранульоми була значно більшою, ніж у групах тварин, які отримували ліку-

вання препаратами "Простатофіт" і "Простапол". У групі спиртового контролю спостерігалось збільшення маси вологої гранульоми навіть порівняно з позитивним контролем (що, напевно, викликано набряком тканини під дією спирту), але після висушування маса сухої гранульоми у даної групи тварин на 2 % була нижчою, ніж у групі позитивного контролю.

Було встановлено, що "Простатофіт" у дозах 0,5 та 1 мл/кг достовірно пригнічував розвиток фіброзно-грануляційної тканини навколо чужорідного тіла, порівняно з позитивним контролем, на 24,3 та 54,1 % відповідно. Застосування даного препарату в дозі 0,1 мл/кг не приводило до зменшення гранульоми: маса сухої гранульоми практично не відрізнялась від маси гранульоми у групі позитивного контролю, і різниця складала 5,3 %.

Референтний препарат "Простапол" у дозі 1 мл/кг також проявляв антипроліферативні властивості, практично на тому самому рівні, що і досліджуваний препарат в аналогічній дозі. Маса сухої гранульоми після застосування простаполу на 44,3 % менша, ніж у групі позитивного контролю, та на 9,8 % більша порівняно з препаратом "Простатофіт".

Таким чином, у результаті проведених досліджень з вивчення протизапальних антипроліферативних властивостей препарату "Простатофіт" було встановлено, що він достовірно пригнічує розвиток фіброзно-грануляційної тканини навколо чужорідного тіла і не поступається за ступенем пригнічення референтному препарату. Вираження фармакологічного ефекту "Простатофіту" мало дозозалежний характер: від відсутності пригнічувальної дії (доза 0,1 мл/кг) до максимального ефекту при застосуванні у дозі 1 мл/кг. Тобто використання препарату в дозі 0,1 мл/кг у подальших серіях дослідів можна вважати недоцільним.

ВИСНОВКИ. 1. Встановлено, що "Простатофіт" у дозах 0,5 і 1 мл/кг достовірно пригнічує розвиток фіброзно-грануляційної тканини навколо чужорідного тіла, порівняно з позитивним контролем, на 24,3 та 54,1 % відповідно та не поступається за ступенем пригнічення референтному препарату.

2. Результати досліджень дозволяють розглядати настойку складну "Простатофіт" як перспективний препарат для застосування у комплексній терапії хворих з доброякісною гіперплазією передміхурової залози.

Таблиця 1 – Антипроліферативна дія препарату "Простатофіт" на моделі "ватної гранульоми" у щурів (M±m)

Дослідна група	Маса гранульоми, мг	
	вологої	сухої
"Простатофіт" 1 мл/кг	300,6±50,18	46,0±3,14*,**
"Простатофіт" 0,5 мл/кг	495,7±50,84	75,9±8,44*,**
"Простатофіт" 0,1 мл/кг	503,9±96,23	94,9±7,24
"Простапол" 1 мл/кг (референтний препарат)	386,0±47,12	55,8±8,40*,**
Спиртовий контроль	635,7±59,38	98,8±8,11
Позитивний контроль	606,2±76,36	100,2±16,93

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з групою позитивного контролю; ** – $p \leq 0,05$ порівняно з групою спиртового контролю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
2. Вишнеvsька Л.І. Розробка методик визначення якості настойки складної "Простатофіт" // Журнал органічної і фармацевтичної хімії. – 2008. – 6, вип. 1 (21). – С. 76-80.
3. Ковальов В.М., Павлій О.І., Ісакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин. – Харків, Прапор, 2000. – С. 188-189.
4. Чекман І.С. Клінічна фітотерапія. – К.: Видавництво А.С.К., 2003. – 552 с.
5. Urtica: therapeutic and nutritional aspects of stinging nettles / Edited by Gulsei Kavalali. – London, New York: Taylor Francis Group, 2003. – 83 p.

РАЗРАБОТКА НОВОГО ПРЕПАРАТА ИЗ КОМПОЗИЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ТРАВ

Ю.Г. Писковацкий, Л.И. Вишневская, В.А. Георгиянц, В.К. Яковенко, Е.А. Хохлова
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

В результате проведенных исследований по изучению противовоспалительных антипролиферативных свойств препарата "Простатофит" было установлено, что в дозах 0,5 и 1 мл/кг он достоверно угнетает развитие фиброзно-грануляционной ткани вокруг инородного тела, по сравнению с позитивным контролем, на 24,3 и 54,1 % соответственно, а также не уступает по степени угнетения референтному препарату.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лекарственное растительное сырье, настойка, специфическая активность.

CREATION OF NEW DRUG FROM MEDICINAL HERBS COMPOSITION

Yu.H. Piskovatsky, L.I. Vyshnevskya, V.A. Heorhiyants, V.K. Yakovenko, K.O. Khokhlova
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

As a result of conducted research on studying of antiinflammatory and antiproliferative properties of "Prostatophyte" drug it has been determined that in dosage 0,5 and 1 ml/kg it reliably inhibits the development of fibrous-granulation tissue around foreign body in comparison with the positive control on 24,3 and 54,1 % relatively, and it's not inferior to the referential preparation by the level of inhibition.

KEY WORDS: medicinal plant raw material, tincture, specific activity.

Отримано 26.03.2008 р.

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

Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua

ВИЗНАЧЕННЯ НІМЕСУЛІДУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

О.С. Азаров, Я.П. Вербіловський, Н.І. Волощук, О.В. Ільченко
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА

Розроблено простий та швидкий метод визначення німесулід у плазмі крові. 0,2 мл сироватки крові підкислювали 0,02 мл 1 М соляної кислоти. До проби додавали внутрішній стандарт (індометацин) та 0,6 мл ацетонітрилу. Суміш струшували протягом 1 хв. Після завершення однофазної екстракції пробу центрифугували при 3000 об./хв протягом 30 хв. Надосадову рідину після фільтрування на фільтрі з розміром пор 0,45 мкм вводили в хроматографічну колонку (20 мкл). Колонку розміром 125x4 мм було заповнено сорбентом Hypersil BDS C18 з розміром гранул 5 мкм. Застосовано ізократичне елюювання зі складом мобільної фази – 50 % 0,03 М цитратного буфера (рН=3,1) і 50 % ацетонітрилу, швидкість елюювання – 600 мкл/хв, температура колонки – 20 °С. Детектування німесулід проводили при довжині хвилі 240 нм. За цих умов час виходу німесулід з колонки складав 5,9 хв, а час виходу внутрішнього стандарту (індометацину) – 8,5 хв. У діапазоні концентрацій німесулід в сироватці від 0,2 до 50 мкг/мл зберігалась пропорційна залежність між площею хроматографічного піку та кількістю препарату в пробі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: німесулід, вискоефективна рідинна хроматографія.

ВСТУП. Німесулід (4-нітро-2-феноксиметансульфонанлід) належить до широко застосовуваних в клініці нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП). Фармакологічний ефект більшості НПЗП тісно пов'язаний з особливістю їх фармакокінетики. У чисельних дослідженнях було виявлено кореляцію між величиною протизапальної дії НПЗП та параметрами їх фармакокінетики: стаціонарною концентрацією препаратів у крові пацієнтів, періодом їх напіввиведення, площею під фармакокінетичною кривою, середнім часом утримання препаратів у плазмі крові [2, 5, 10].

Головним метаболітом німесулід є продукт його гідроксилювання – 4-гідроксинімесулід [4, 9, 11]. Ідентифіковано також продукти відновлення німесулід по нітрогрупі, ацетилювання по аміногрупі та інші кон'юговані похідні. Слід взяти до уваги, що метаболіти німесулід, порівняно з незміненою формою препарату, проявляють незначні протизапальну та знеболювальну дії [3].

Розробка нових лікарських форм цього препарату потребує визначення концентрації німесулід з метою вивчення його розподілу по органах та дослідження параметрів його фармакокінетики, що, у свою чергу, є необхід-

© О.С. Азаров, Я.П. Вербіловський, Н.І. Волощук, О.В. Ільченко, 2008.

ним для відпрацювання частоти призначення препарату і величини його дози.

Звідси стає зрозумілим, що для визначення індивідуальних параметрів фармакокінетики німесулід (а це необхідно, щоб підтримувати концентрацію препарату в терапевтичних межах) існує потреба в швидкому та дешевому методі визначення його концентрації в біологічних рідинах.

Існуючі методи визначення німесулід базуються на екстракції речовини з плазми в гідрофобний розчинник (найчастіше галогеналкани) з подальшою реекстракцією і наступним хроматографічним визначенням [6-8].

Однак, як показали наші дослідження, ступінь екстракції німесулід з біологічних рідин досить низький (не перевищує 70 %) і, до того ж, значно варіює. Для дослідження фармакокінетики даного препарату було розроблено власний метод із застосуванням вискоефективної рідинної хроматографії, який дозволяє відмовитись від попередньої екстракції німесулід в гідрофобний розчинник. Замість двофазної екстракції використовували однофазну, коли один з компонентів рухливої хроматографічної фази (ацетонітрил) додавали безпосередньо до сироватки крові. Як стандартний зразок застосовували німесулід фірми "Sigma" (USA).

При розробці методу відому кількість препарату додавали до сироватки, яка не містила німесулід. При цьому було встановлено, що сироватка крові не містить речовин, час виходу яких з колонки збігався б з часом виходу німесулід.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. 0,2 мл сироватки крові підкисляли 0,02 мл 1 М соляної кислоти, після перемішування додавали внутрішній стандарт – 0,05 мл індометацину (фірми “Sigma”, USA) з концентрацією 5 мкг/мл, після перемішування – 0,6 мл ацетонітрилу. Пробу енергійно струшували протягом 1 хв. За цей час практично весь доданий німесулід (приблизно 90 %) переходив у розчин. Далі пробу центрифугували при 3000 об./хв протягом 30 хв. Надосадову рідину фільтрували на мембранному фторопластовому фільтрі МФФКГ-3 (НПФ “Біохром”) з розміром пор 0,45 мкм.

Кількісне визначення німесулід проводили на високоефективному рідинному хроматографі HP-1100 на колонці розміром 125×4 мм, заповненій твердою фазою Hypersil BDS C18 з розміром гранул 5 мкм. У колонку вводили 20 мкл відфільтрованої надосадової рідини. Застосовано ізократичне елюювання зі складом мобільної фази – 50 % 0,03 М цитратного буфера (рН=3,1) і 50 % ацетонітрилу, швидкість елюювання – 600 мкл/хв, температура колонки – 20 °С. Детектування німесулід проводили при довжині хвилі 240 нм. За цих умов час виходу німесулід з колонки складав 5,92 хв, а час виходу внутрішнього стандарту (індометацину) – 8,45 хв. В діапазоні концентрацій німесулід від 0,2 до 50 мкг/мл зберігалась пропорційна залежність між площею хроматографічного піку та кількістю препарату в пробі. Встановлено, що відношення площі піків індометацину (внутрішнього стандарту) до площі піків німесулід є величиною сталою і дорівнює 1,77 за умови рівності їх концентрацій, виражених в одиницях маси на одиницю об’єму

(мкг/мл). Концентрацію німесулід в сироватці крові розраховували за такою формулою:

$$C = \frac{S_H \cdot K_1 \cdot K_2 \cdot C_i}{S_i}$$

де S_H – площа піку німесулід;

S_i – площа піку індометацину;

K_1 – калібрувальний коефіцієнт – відношення площі піків індометацину до площі піків німесулід, взятих в однакових концентраціях (за нашими даними, $K_1=1,77$);

K_2 – коефіцієнт розведення – відношення об’єму проби після додавання всіх компонентів до вихідного об’єму проби (в наших умовах $K_2=4,35$);

C_i – концентрація внутрішнього стандарту в кожній пробі ($C_i=5,75$ мкг/мл).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Нами досліджені також метрологічні параметри методу визначення німесулід. Було виявлено, що запропонований метод характеризується точністю, достатньою відтворюваністю та високою чутливістю.

Так, при визначенні німесулід, доданого до сироватки у концентраціях від 0,50 до 4,00 мкг/мл (серіями по 5 паралельних проб), величина відносної похибки середнього результату не перевищувала 3,5 % для довірчого інтервалу $P=0,95$. Нижня межа визначення даного препарату складала 25 нг/мл (відношення “сигнал/шум” > 10).

Метод був використаний для визначення німесулід в деяких роботах (наприклад, [1]) та виявився швидким, зручним у виконанні, потребуючи мінімальної ручної праці.

ВИСНОВОК. Розроблено чутливий, простий у виконанні та відтворюваний метод визначення німесулід в біологічних рідинах, який полягає в екстракції препарату ацетонітрилом і його визначенні методом високоефективної рідинної хроматографії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волощук Н.І., Ільченко О.В., Пентюк О.О., Гунько І.П. Вплив статевого диморфізму на фармакокінетику та анальгезуючий ефект німесулід // Ліки. – 2003. – № 1-2. – С. 51-59.
2. Станіславчук М.А. Оптимізація фармакотерапії хворих на ревматоїдний артрит нестероїдними протизапальними та анальгетичними препаратами. Фармакокінетичні та фармакодинамічні підходи: Дис. ... д-ра мед. наук. – К., 1997. – 48 с.
3. Bernareggi A. The pharmacokinetic profile of

nimesulide in healthy volunteers // Drugs. – 1993. – **46**, Suppl. 1. – P. 64-72.

4. Carini M., Aldini G., Stefani R. et al. Mass spectrometric characterization and HPLC determination of the main urinary metabolites of nimesulide in man // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1998. – **18**, № 1-2. – P. 201-211.

5. Davies N.M., Anderson K.E. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls // Clin. Pharmacokinetic. – 1997. **33**, № 3. – P. 184-213.

6. Giachetti C., Tenconi A. Determination of nimesulide and hydroxynimesulide in human plasma by high performance liquid chromatography // Biomed. Chromatogr. – 1998. – **12** (2). – P. 50-56.

7. Jaworowicz D.J., Filipowski M.T., Boje K.M. Improved high-performance liquid chromatographic assay for nimesulide // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. – 1999. – **723** (1-2). – P. 293-299.

8. Khaksa G., Udupa N. Rapid and sensitive method for determination of nimesulide in human plasma by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl. – 1999. – **727**

(1-2). – P. 241-244.

9. Maffei Facino R., Carini M., Aldini G. Differential inhibition of superoxide, hydroxyl and peroxy radicals by nimesulide and its main metabolite 4-hydroxynimesulide // Arzneimittelforschung. – 1995. – **45**, № 10. – P. 1102-1109.

10. Orme M.L. Plasma concentration and therapeutic effect of antiinflammatory and rheumatic drugs // Pharmacol. Ther. – 1982. – **16**. – P. 167-180.

11. Sarkar P., McIntosh J.M., Leavitt R., Gouthro H. A unique metabolite of nimesulide // J. Anal. Toxicol. – 1997. – **21**, № 3. – P.197-202.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НИМЕСУЛИДА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.С. Азаров, Я.П. Вербиловский, А.В. Ильченко
ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ПИРОГОВА

Резюме

Разработан простой и быстрый метод определения нимесулида в плазме крови. 0,2 мл сыворотки крови подкисляли 0,02 мл 1 М соляной кислоты. К пробе добавляли внутренний стандарт (индометацин) и 0,6 мл ацетонитрила. Смесь встряхивали на протяжении 1 мин. По завершении однофазной экстракции пробу центрифугировали при 3000 об./мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость после фильтрования на фильтре с размером пор 0,45 мкм вводили в хроматографическую колонку (20 мкл). Колонку размером 125×4 мм было заполнено сорбентом Hypersil BDS C18 с размером гранул 5 мкм. Применено изократическое элюирование с составом мобильной фазы – 50 % 0,03 М цитратного буфера (pH=3,1) и 50 % ацетонитрила, скорость элюирования – 600 мкл/мин, температура колонки – 20 °С. Детекцию нимесулида проводили при длине волны 240 нм. При этих условиях время выхода нимесулида с колонки составляло 5,9 мин, а время выхода внутреннего стандарта (индометацина) – 8,5 мин. В диапазоне концентраций нимесулида в сыворотке от 0,2 до 50 мкг/мл сохранялась пропорциональная зависимость между площадью хроматографического пика и количеством препарата в пробе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нимесулид, высокоэффективная жидкостная хроматография.

DETERMINATION OF NIMESULIDE IN BLOOD SERUM BY METHOD OF HIGHLY-EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY

O.S. Azarov, Ya.P. Verbilovsky, N.I. Voloshchuk, O.V. Ilchenko
VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY M.I. PYROHOV

Summary

An easy and rapid method for nimesulide determination in blood plasma was developed. 0,2 ml of blood serum acidified with 0,02 ml 1 M chloric acid. The internal standard (indometacine) and 0,6 ml of acetonitrile were added to the sample. The mixture was shaken for 1 min. After finishing the one-phase extraction the sample was centrifugated at 3 000 rpm during 30 min. The above-sediment liquid was administered into chromatographic column after its filtration through the filter with the pore size 0,45 mcm. The column sized 125×4 mm was filled in with sorbent Hypersil BDS c 18 with the size of granules 5 mcm. The isocratic elutriation with the next composition of mobile phase: 50 % 0,03 M citrate buffer (pH=3,1) and 50 % acetonitrile, the flow-rate – 600 mcl/min, the column temperature – 20 °C. Nimesulide detection was performed at the wavelength 240 nm. Under such conditions the time of nimesulide output from the column was 5,9 min and the time of internal standard (indomethacine) output was 8,5 min. In the range of nimesulide concentration in serum from 0,2 to 50 mkg/ml remained the proportional dependence between the area of chromatographic peak and amount of medication in the sample.

Key words: nimesulide, highly-effective liquid chromatography.

Отримано 19.02.2008 р.

Адреса для листування: О.С. Азаров, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна.

Медицина хімія – т. 10, № 2, 2008