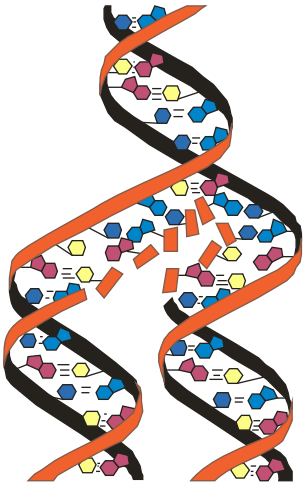
Академія медичних наук України
Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського
Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

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

1 ТОМ 11
2009

- ***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***

Ì ÅÄÈ × Í À Õ² Ì ² ß

Науковий журнал

MEDICAL CHEMISTRY

Scientific Journal

ISSN 1681-2557

Виходить з 1999 року
Published since 1999

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

Передплатний індекс: 22869
Subscription index: 22869

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

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

Рекомендовано до видання вченою радою Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського (протокол № 11 від 24 березня 2009 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

ÎÐÈÃ²ÍÀËÜÍ² ÄÎÑË²ÄÆÅÍÍß

Гончарук О.І. (Харків) ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ ТА ЛІКУВАЛЬНОГО ЕФЕКТУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КЛІТИН ХОРІОНА 5

Грищук В.І., Чернишенко Т.М., Горницька О.В. (Київ) РОЛЬ ПРОТЕЇНУ С У СИСТЕМІ ГЕМОСТАЗУ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЙОГО АКТИВНОСТІ ЗА РІЗНИХ ПАТОЛОГІЙ 11

Губський Ю.І., Вельчинська О.В., Скибюк Г.В. , Кобко О.С. (Київ) СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВИХ N-ЗАМІЩЕНИХ СУКЦИНІМІДІВ З ПОТЕНЦІЙНОЮ БІОЛОГІЧНОЮ АКТИВНІСТЮ 18

Геращенко І.І., Гунько В.М., Ніцак О.В. (Київ) ПОРІВНЯННЯ МЕМБРАНОТРОПНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СИЛІКСУ Й ЕНТЕРОСГЕЛЮ 25

Посохова К.А., Яремчук О.З. (Тернопіль) СТАН ПЕЧІНКИ І НИРОК ПРИ ГОСТРОМУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ПАНКРЕАТИТІ ТА ЗАСТОСУВАННІ ПРЕПАРАТУ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ 30

Георгіянц В.А., Банна Н.І., Савченко В.М., Банний І.П. (Харків) СИНТЕЗ, ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ТА ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ γ-(4-N-R-СУЛЬФАМІДОБЕНЗОЛОКСАМІДО)-БУТАНОВИХ КИСЛОТ 34

Кислова О.В., Іванова І.В., Соловйов А.І. (Київ) ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ ПРЕПАРАТОМ "ЛІПОФЛАВОН" СУДИННОЇ ДИСФУНКЦІЇ, ЩО ВИКЛИКАНА ВПЛИВОМ ІОНІЗУЮЧОГО ОПРОМІНЕННЯ 40

Данченко О.П. (Вінниця) МЕХАНІЗМИ РЕНОПРОТЕКТОРНОЇ АКТИВНОСТІ СИМВАСТАТИНУ ПРИ ЙОГО ПОЄДНАННІ З ТРИМЕТАЗИДИНОМ, ТІОТРИАЗОЛІНОМ, ТАУРИНОМ ТА УБІХІНОНОМ У ЩУРІВ З ГІПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМІЄЮ 45

Дарвіш Алі Хусейн, Семенів Д.В., Куценко Т.О. (Харків, Івано-Франківськ) ПОШУК ПЕРСПЕКТИВНИХ КОРЕКТОРІВ УЛЬЦЕРОГЕННОЇ ДІЇ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОЇДІВ 50

Бездітко К.П. (Харків) ВПЛИВ НОВОЇ МАЗІ "ЕСТАН", СТВОРЕНОЇ НА ОСНОВІ РОСЛИННИХ КОМПОНЕНТІВ, НА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ НА ТЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ФОРМАЛІНОВОГО ПРОКТИТУ В ЩУРІВ 54

Старикович Л.С., Дудок К.П., Сибірна Н.О., Речицький О.Н., Єресько В.А., Влох І.Й., Гринчишин Н.М. (Львів, Херсон) ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СПІРОКАРБОНУ НА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ Й БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ У НОРМІ ТА ЗА АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ 58

Чорна В.І. (Дніпропетровськ) ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ І НІТРИТНОЇ МЕТГЕМОГЛОБІНЕМІЇ НА ВМІСТ МЕТГЕМОГЛОБІНУ В КРОВІ СТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ І ЇХ НАЩАДКІВ У ДИНАМІЦІ РАННЬОГО ПОСТНАТАЛЬНОГО РОЗВИТКУ 63

Поляк О.Б. (Тернопіль) СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ТА ЕКСТРАКЦІЯ ДЕЗЛОРАТАДИНУ ОРГАНІЧНИМИ РОЗЧИННИКАМИ З ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ЗАЛЕЖНО ВІД РН СЕРЕДОВИЩА 67

Кучмеровська Т.М., Шиманський І.О., Донченко Г.В., Великий М.М., Гуріна Н.М., Клименко А.П. (Київ) ІНДУКОВАНІ ДІАБЕТОМ ПОРУШЕННЯ ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ ТА ФУНКЦІЙ МІТОХОНДРІЙ У МОЗКУ ЩУРІВ 71

Коваль В.М., Вронська Л.В. (Тернопіль) ІДЕНТИФІКАЦІЯ І КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИНК АСПАРАГІНАТУ В БАГАТОКОМПОНЕНТНОМУ ЛІКАРСЬКОМУ ЗАСОБІ 75

Contents

ORIGINAL INVESTIGATIONS

Honcharuk O.I. (Kharkiv) RESEARCH OF BIOLOGICAL SAFETY AND MEDICAL EFFECT OF CRYOPRESERVED CELLS OF CHORION 5

Hryshchuk V.I., Chernyshenko T.M., Hornytska O.V. (Kyiv) THE ROLE OF PROTEIN C IN HAEMOSTASIS SYSTEM AND DETERMINATION OF ITS ACTIVITY AT DIFFERENT PATHOLOGIES 11

Hubsky Yu.I., Velchynska O.V., Skybyuk H.V., Kobko O.S. (Kyiv) SYNTHESIS AND RESEARCH OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF NEW N-SUBSTITUTED SUCCINIMIDES WITH POTENTIAL BIOLOGICAL ACTIVITY 18

Herashchenko I.I., Hunko V.M., Nitsak O.V. (Kyiv) COMPARISON OF MEMBRANOTROPIC PROPERTIES OF SILICS AND ENTEROSGEL 25

Posokhova K.A., Yaremchuk O.Z. (Ternopil) STATE OF LIVER AND KIDNEYS AT ACUTE EXPERIMENTAL PANCREATITIS AND USAGE OF SUPEROXIDE DISMUTASE PREPARATION 30

Georgiyants V.A., Banna N.I., Savchenko V.M., Banny I.P. (Kharkiv) SYNTHESIS, FARMALOGICAL PROPERTIES AND ACUTE TOXICITI OF THE γ-(4-N-R-SULFAMIDOPHENYLOXAMIDO)-BUTANOIC ACIDS 34

Kyslova O.V., Ivanova I.V., Soloviev A.I. (Kyiv) PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF VASCULAR DYSFUNCTION FOLLOWING RADIATION BY "LIPOFLAVONE" 40

Danchenko O.P. (Vinnytsia) MECHANISMS OF RENOPROTECTIVE SIMVASTATIN ACTIVITY TO CONCOMINANT USE OF TRIMETAZIDINE, THIOTRIAZOLINE, TAURINE, UBIQUINONE IN RATS WITH HYPERCHOLESTEROLEMIA 45

Darvish Ali Khuseyn, Semeniv D.V., Kutsenko T.O. (Kharkiv, Ivano-Frankivsk) CHOICE OF PERSPECTIVE CORRECTORS OF GLUCOCORTICOIDS ULCEROGENIC EFFECT 50

Bezditko K.P. (Kharkiv) INFLUENCE OF NEW OINTMENT "ESTAN", BASED OF HERBAL COMPONENTS, ON BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THE EXPERIMENTAL FORMALIN PROCTITIS IN RATS 54

Starykovych L.S., Dudok K.P., Sybirna N.O., Rechytsky O.N., Yeresko V.A., Vlokh I.Y., Grynchyshyn N.M. (Lviv, Kherson) INFLUENCE OF SPIROCARBON ON PHYSICAL, CHEMICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF RAT ERYTHROCYTES UNDER NORMAL CONDITIONS AND DURING ALCOHOLIC INTOXICATION 58

Chorna V.I. (Dnipropetrovsk) INFLUENCE OF IONIZING RADIATION AND NITRITE METHAEMOGLOBINEMY ON METHAEMOGLOBIN CONTENT IN BLOOD OF ADULT RATS AND THEIR POSTERITY IN DYNAMICS OF EARLY POSTNATAL DEVELOPMENT 63

Polyak O.B. (Ternopil) UV-SPECTROPHOTOMETRICAL DETECTION AND EXTRACTION OF DESLORATADINE BY ORGANIC SOLVENTS FROM AQUEOUS SOLUTIONS IN DEPENDENCE ON PH OF MEDIUM 67

Kuchmerovska T.M., Shymansky I.O., Donchenko H.V., Velyky M.M., Hurina N.M., Klymenko A.P. (Kyiv) DIABETES-ASSOCIATED IMPAIRMENT OF ENERGY METABOLISM AND MITOCHONDRIAL FUNCTION IN RAT BRAIN 71

Koval V.M., Vronska L.V. (Ternopil) TIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF ZINC ASPARTATE IN MULTICOMPONENT DRUG 75

Гонський Я.І., Куліцька М.І. (Тернопіль) ЗМІНИ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У ЩУРІВ ЗА УМОВ КОМБІНОВАНОГО ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ ХЛОРИДОМ СВИНЦЮ ТА НІТРИТОМ НАТРІЮ 80

Борисенко Т.А., Коритнюк Р.С., Давтян Л.Л. (Київ) ТЕХНОЛОГІЧНИЙ І ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ПРИ ВИГОТОВЛЕННІ ІНФУЗІЙНОГО РОЗЧИНУ З МАЛАТАМИ 84

Ерстенюк Г.М., Назарук Р.М. , Рожко О.М. (Івано-Франківськ) ВПЛИВ БАД "ВИСОКОЯКІСНИЙ КОМПЛЕКС КАЛЬЦІЮ" НА АНТИОКСИДАНТНИЙ ЗАХИСТ І ПОКАЗНИКИ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ КАДМІЄВОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ 89

Гаврилюк С.П., Савчук О.М., Остапченко Л.І. (Київ, Улаанбаатар) МЕТОД ОТРИМАННЯ ТА ВИДІЛЕННЯ 36 КДА ФРАГМЕНТА СТРЕПТОКІНАЗИ 93

Зупанець І.А., Шебеко С.К., Харченко Д.С. (Харків) ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПАРЕНТЕРАЛЬНОЇ ФОРМИ КВЕРЦЕТИНУ НА ПЕРЕБІГ ГОСТРОЇ НИРКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ У ЩУРІВ 98

Гонський Я.І., Острівка О.І., Підручна С.Р. (Тернопіль) ВИКОРИСТАННЯ ГІСТИДИНАТУ МІДІ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ МЕТАБОЛІЧНИХ ПОРУШЕНЬ ЗА УМОВ ГОСТРОГО ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ ОРГАНІЗМУ 103

Вишневська Л.І., Чистяков О.Г., Бурд Н.Б., Георгіянц В.А., Колесніков О.В. (Харків) НАУКОВО-ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ ПРЕПАРАТУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ КАШЛЮ ТА ЗАСТУДНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ 108

Корнієнко В.І., Самура Б.А. (Харків) ДОСЛІДЖЕННЯ АНАЛЬГЕТИЧНОЇ І ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ АМОНІЙНИХ СОЛЕЙ 1,7-ДИЗАМІЩЕНИХ КСАНТИНІЛ-8-ТІООЦТОВОЇ КИСЛОТИ 112

Левицький А.П., Макаренко О.А., Крисюн І.І. (Одеса) СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ ФЛАВОНОЇДІВ ЦИТРУСОВИХ 116

Березнякова М.Є., Погребняк О.В. (Харків) ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОЇ ДОЗИ І ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ХІНОЛІНФЛАГІНУ 120

Кушнір І.Г., Кокощук Г.І. (Чернівці) РОЛЬ ЦЕНТРАЛЬНИХ АДРЕНОРЕАКТИВНИХ СТРУКТУР В КОНТРОЛІ ЦИРКАДІАННОГО РИТМУ 123

Хміль С.В., Федорейко Л.Р. (Тернопіль) ВИВЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ІМУНІТЕТУ В ЖІНОК З ДИСПЛАЗІЄЮ ШИЙКИ МАТКИ НА ТЛІ ПАПІЛОМАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ ЗА ДОПОМОГОЮ КОМПЛЕКСНОЇ ТЕРАПІЇ 127

Набока О.І., Березнякова А.І. (Харків) ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ І Na^+,K^+-АТФ-АЗИ У ЗВИТИХ КАНАЛЬЦЯХ НЕФРОНУ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ КАРБОРЕНУ 131

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

Корда М.М., Ярошенко Т.Я., Самборська С.М., Корда І.В. (Тернопіль) ВПЛИВ ЛЕПТИНУ НА ЕКСПРЕСІЮ NO-СИНТАЗИ В ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИНАХ 135

Гордієнко А.Д., Божков А.І., Кудокоцева О.В. (Харків) ВКЛЮЧЕННЯ МІЧЕНОГО ФОСФАТИДИЛХОЛІНУ ІЗ СОЇ ПРЕПАРАТУ "ЛІПОФЕН" В МЕМБРАНИ ЕР ПЕЧІНКИ ЩУРІВ 138

Вергун А.Р., Котик В.В., Вергун О.М. (Львів) ПОЛІВІТАМІННА НЕДОСТАТНІСТЬ У ХВОРИХ НА ДЕСТРУКТИВНИЙ ОНІХОМІКОЗ 141

Honsky Ya.I., Kulitska M.I. (Ternopil) CHANGES OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN RATS AT COMBINED IMPAIRMENT BY LEAD CHLORIDE AND SODIUM NITRITE 80

Borysenko T.A., Korytnyuk R.S., Davtyan L.L. (Kyiv) TECHNOLOGICAL AND PHYSICOCHEMICAL CONTROL IN MANUFACTURING INFUSION SOLUTION WITH MALATES 84

Ersteniuk H.M., Nazaruk R.M., Rozhko O.M. (Ivano-Frankivsk) INFLUENCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITION "HIGH GRADE CALCIUM COMPLEX" ON ANTIOXIDANT DEFENCE AND INDICES OF PERIPHERAL BLOOD IN CASE OF EXPERIMENTAL CADMIC INTOXICATION 89

Havrylyuk S.P., Savchuk O.M., Ostapchenko L.I. (Kyiv, Ulaanbaatar) METHOD OF OBTAINING AND PURIFICATION OF 36 KDA FRAGMENT OF STREPTOKINASE 93

Zupanets I.A., Shebeko S.K., Kharchenko D.S. (Kharkiv) STUDY OF THE INFLUENCE OF QUERCETIN PARENTERAL FORM ON CLINICAL COURSE OF ACUTE KIDNEY FAILURE IN RATS 98

Honsky Y.I., Ostrivka O.I., Pydruchna S.R. (Ternopil) USING OF COPPER HISTIDINE FOR CORRECTION OF METABOLIC DESORDERS UNDER CONDITIONS OF ACUTE TOXIC INJURY OF ORGANISM 103

Vyshnevska L.I. , Chystyakov O.H., Burd N.B., Georgiyants V.A., Kolesnikov O.V. (Kharkiv) SCIENTIFIC AND TEORETICAL SUBSTATIATION OF COUGH AND COLD REMEDIUM COMPOSITION 108

Korniyenko V.I., Samura B.A. (Kharkiv) INVESTIGATION OF ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF AMMONIA SALTS OF 1,7-DISUBSTITUTED OF XANTHINYL-8-THIOACETIC ACID 112

Levytsky A.P., Makarenko O.A., Krysyun I.I. (Odessa) SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS OF CITRUS FLAVONOIDS 116

Bereznyakova M.Ye., Pohrebnyak O.V. (Kharkiv) DEFINITION OF EFFECTIVE DOSE AND ACUTE TOXICITY OF HYNOLINFLAGIN 120

Kushnir I.H., Kokoshchuk H.I. (Chernivtsi) ROLE OF ADRENOREACTIVE STRUCTURES IN CONTROL OF CIRCADIAN RHYTHM 123

Khmil S.V., Fedoreyko L.R. (Ternopil) LEARNING OF IMMUNE STATUS IN WOMEN WITH CERVICAL DYSPLASIA AGAINST A BACKGROUND OF PAPILLOMAVIRAL INFECTION AND ITS CORRECTION BY COMPLEX TREATMENT 127

Naboka O.I., Bereznyakova A.I. (Kharkiv) DETERMINATION OF ACTIVITY OF SUCCINATE DEHYDROGENASE AND NA^+, K^+- ATPHASE IN BRANCHED NEPHRON CANALS UNDER CONDITIONS CARBOREN INTRODUCTION 131

BRIEF REPORTS

Korda M.M., Yaroshenko T.Ya., Samborska S.M., Korda I.V. (Ternopil) THE EFFECT OF LEPTIN ON NO-SYNTHASE EXPRESSION IN ENDOTHELIAL CELLS 135

Hordiyenko A.D., Bozhkov A.I., Kudokotseva O.V. (Kharkiv) INCLUSION OF LABELED SOY-DERIVED PHOSPHATIDYLCHOLINE OF LYPOPHENE PREPARATION INTO ER MEMBRANES OF RAT LIVER 138

Verhun A.R., Kotyk V.V., Verhun O.M. (Lviv) POLYVITAMIN INSUFFICIENCY IN THE PATIENTS WITH DESTRUCTIVE ONYCHOMYCOSIS 141

УДК 616-001.17-08-092.9:576.535.2:611-013.84

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ ТА ЛІКУВАЛЬНОГО ЕФЕКТУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ КЛІТИН ХОРІОНА

О.І. Гончарук

ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАН УКРАЇНИ,
МІЖВІДОМЧИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАН, АМН І МОЗ УКРАЇНИ

У роботі викладені результати проведення доклінічних досліджень препарату кріоконсервованих клітин хоріона людини, а саме дослідження алергізуючих властивостей, місцевоподразнюючої дії, гострої та хронічної токсичності, а також ефективності терапії опіків за допомогою експериментального препарату клітин ворсинчастої частини хоріона.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **клітини хоріона, клітинна терапія, доклінічні дослідження.**

ВСТУП. Сьогодні значний інтерес спеціалістів викликають біотехнологічні підходи до репарації тканин. Одним з базових методів є клітинна терапія з використанням як стовбурових, так і диференційованих клітин [6, 7, 12]. Відомо, що тканини фетоплацентарного комплексу мають у своєму складі досить великий відсоток стовбурових клітин, що є передумовою їх використання для корекції деяких патологічних станів, де потребується стимуляція власних репаративних процесів, а також замісний ефект трансплантованих клітин.

Хоріон як ендокринний орган здійснює процеси синтезу і секреції ряду гормонів – хоріонічного гонадотропіну, прогестерону, репродуктивних імуномодуляторів, цитокінів, інтерлейкінів та ін. Клітини хоріона мають низьку імуногенність, високий проліферативний потенціал і при трансплантації здатні тривалий час продукувати біологічно активні речовини.

Незважаючи на вже досить давній інтерес до об'єкта, у світі на даний час активно вивчають як нативні суспензії, так і культивовані клітини хоріона [21]. Результати проведених досліджень підтверджують протизапальну, імунокоригуючу й антиоксидантну дії різних препаратів, отриманих із тканини хоріона [9, 13, 16]. В наших попередніх дослідженнях вивчено морфологічні та проліферативні характеристики культури, одержаної з хоріона [2], вміст активних компонентів [4], досліджено можливість лікування термічних опіків у експериментальних тварин за допомогою суспензії клітин хоріона [5, 20]. Розроблено підходи до виділення і кріоконсервування клітин [1], охарактеризовано кріоконсервований препарат клітин хоріона [3].

© О.І. Гончарук, 2009.

Метою роботи було проведення доклінічних досліджень клітинного препарату кріоконсервованих клітин хоріона (ККХ). Завдання роботи: оцінити алергізуючі властивості клітинного трансплантата ККХ; дослідити місцевоподразнюючу дію клітинного трансплантата ККХ; вивчити гостру та хронічну токсичність препарату, а також можливість використання ККХ при лікуванні опіків III ступеня.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для приготування суспензії ККХ фрагменти хоріона переносили у стерильні чашки Петрі, промивали фізіологічним розчином з антибіотиком (50 од./мл канаміцину), піддавали ферментативній дезінтеграції. Донорські тканини отримували в строки гестації 6-12 тижнів у тих випадках, коли вагітність переривали за бажанням жінки при відсутності патології розвитку чи інфікованості тканини. На підставі одержаних результатів лабораторних досліджень, аналізу медичної чи соціальної історії хвороби консиліум лікарів приймав рішення про можливість використання біологічного матеріалу для подальшого приготування експериментального препарату клітин хоріона, а також отримував письмову згоду донора.

Кріоконсервували клітини хоріона відповідно до [14, 15] з подальшим зберіганням при температурі -196 ^{o}C в низькотемпературному банку.

Оцінка алергізуючих властивостей ККХ у тесті "кон'юнктивальна проба". Кон'юнктивальна проба є відображенням алергічної реакції на слизовій кон'юнктиви і рогівки, що викликана специфічними алергенами [18]. Дослідження проводили на 25 морських свинках (самці), яких утримували на стандартному раціоні віварію. Сенсибілізацію виконували клітинним трансплантатом кріоконсервованих

клітин хоріона перорально в умовно-терапевтичній дозі $1 \cdot 10^6$ клітин у 0,5 мл фізіологічного розчину протягом 14 діб. Тестування проводили на 21-й день від початку сенсибілізації.

Клітинний трансплантат ККХ вводили морським свинкам піпеткою для очей під верхню повіку в кількості 1 краплі. Друге око слугувало контролем на розчинник (фізіологічний розчин). Облік результатів кон'юнктивального тесту здійснювали через 5 хв після введення клітин хоріона, далі – через 24, 48 і 72 год. При обліку реакції морську свинку укладали на бік, протилежний досліджуваному оку.

Оцінку результатів реакції проводили за такою шкалою: невизначена реакція (±) – ледь помітне почервоніння слізної протоки; слабопозитивна (+) – злегка червоніє слізна протока, звичайно виникають явища сверблячки; позитивна середнього ступеня (++) – спостерігається легке почервоніння склери в напрямку до рогівки, реєструються ознаки сверблячки; різко позитивна реакція (+++) – виявляють як почервоніння всієї кон'юнктиви і склери, виникають явища сильної сверблячки, сльозотеча.

Місцевоподразнюючу дію ККХ вивчали відповідно до вимог [11]. Дослід поставлено на 25 кролях-самцях породи Шиншила. У кон'юнктивальний мішок правого ока кожної тварини вносили 1 краплю 5 % суспензії клітин і притискали на 1 хв слізно-носовий канал біля внутрішнього кута ока. Ліве око слугувало контролем, у нього закапували фізіологічний розчин.

Реакція слизової оболонки ока переглянута в динаміці через 15 хв, 1 год і добу після введення препарату відповідно до методичних вказівок. При цьому враховували ступінь гіперемії, набряку, кількість виділень. Місцевоподразнюючу дію оцінювали за бальною шкалою, наведеною в методичних вказівках.

Гостру токсичність препарату ККХ вивчали на 25 безпородних білих щурах масою 190-200 г (самці) при одноразовому внутрішньочеревному введенні препарату ККХ у кількості $1 \cdot 10^6$ клітин в 0,5 мл фізіологічного розчину. Спостерігали за тваринами протягом 1 року. Утримували щурів в умовах і на раціоні віварію. Кров для досліджень забирали на 3 добу після введення клітин хоріона, а надалі – 1 раз на місяць. Забір крові здійснювали з бічної вени хвоста [8].

Хронічну токсичність клітинного трансплантата кріоконсервованих клітин хоріона вивчали на 25 безпородних білих щурах масою 190-200 г (самці). Тваринам експериментальної групи вводили внутрішньочеревно клітинний трансплантат ККХ у кількості $1 \cdot 10^6$ клітин в 0,5 мл фізіологічного розчину 1 раз на місяць протягом 6 місяців. За щурами, яких утримували в умовах і на раціоні віварію, спостерігали протягом 1 року. Кров для досліджень забирали таким самим чином, як в попередньому експерименті. МДА визначали за стандартною методикою [17].

Вивчення ранозагоюючої активності клітинного трансплантата ККХ на моделі опікових ран у щурів. Як об'єкт для моделювання термічних опіків використовували самок безпородних щурів масою 150-180 г, одного віку, яких утримували в стандартних умовах віварію. Перед нанесенням опіку тварин наркотизували каліпсолом (70 мг/кг, внутрішньом'язово). На чисту і суху шкіру після депіляції протягом 8 с наносили опік III ступеня за допомогою металевого паяльника площею 9 $см^2$ [19]. Тварин поділили на 4 групи (10 щурів у групі), яких піддавали відповідному лікуванню. До 1-ї групи входили тварини без лікування – група контролю. Щурам 2-ї групи проводили клітинну терапію із застосуванням ККХ, а в 3-й групі накладали ККХ у комплексі з 3 % метилцелюлозним (МЦ) гелем, виготовленим на фізіологічному розчині, як носієм. Існувала також група, в якій використовували тільки МЦ гель для терапії. ККХ накладали на поверхню опікової рани на 2 добу після нанесення опіку.

На 3, 10 і 20 доби проводили вимір опікової поверхні й забір крові з хвостової вени. Ефективність лікування оцінювали з урахуванням зміни розміру і характеристик опікової поверхні, а також показників кількості лейкоцитів у крові [8]. Гістологічне дослідження місць опікових ран виконували на 20 добу з моменту аплікації методом [10].

Всі експерименти на тваринах проводили відповідно до Загальних принципів експериментів на тваринах, схвалених на Національному конгресі з біоетики (Київ, 20.09.04), а також згідно з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою методів варіаційної статистики (t-критерій Стьюдента). Достовірними були показники при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Проведені дослідження алергізуючих властивостей ККХ у тесті "кон'юнктивальна проба" показали, що як у контрольних, так і в експериментальних тварин була відсутня алергічна реакція на слизовій кон'юнктиви й рогівки.

Результати спостережень щодо вивчення місцевоподразнюючої дії ККХ показали, що видимої реакції з боку слизової оболонки не

спостерігалося, що відповідало 0 балів. Офтальмологічний статус тварин був у нормі (рогова оболонка гладка, прозора, райдужка в кольорі й на малюнку не змінена). Таким чином, результати вивчення можливої місцевоподразнюючої дії ККХ на слизову оболонку ока кроля свідчать про відсутність іритативної дії препарату при контакті зі слизовою оболонкою ока.

Вивчення гострої та хронічної токсичності ККХ показало, що протягом року щури контрольної та експериментальної груп не гинули, а динаміка зміни маси тіла тварин у експериментальних групах вірогідно не відрізнялася від маси тіла щурів у контрольній групі (табл. 1). Отримані дані свідчать про те, що препарат за умов гострого експерименту не спричиняв токсичної дії на щурів. Наведені в таблиці 2 дані вказують на відсутність негативного впливу препарату на еритро-, лімфо- і лейкопоез здорових тварин. В контрольних і експериментальних групах тварин кількість МДА в еритроцитах достовірно не відрізнялася протягом досліджень (табл. 3). Отримані дані свідчать про те, що препарат не викликав структурних пошкоджень мембран еритроцитів, які спричиняли порушення енергетичної функції клітин і підвищення окиснювання ліпідів.

Таблиця 1 – **Динаміка зміни маси тіла щурів після одноразового введення ККХ**

Термін спостереження, міс.	Маса тіла щурів, г	
	контроль	експеримент
До введення препарату	200,04±14,0	187,0±9,0
3	195,0±15,0	198,0±17,0
6	215,0±16,0	207,0±9,0
9	294,0±10,0	260,0±15,0
12	305,0±12,0	298,0±11,0

Таблиця 2 – **Гематологічні показники крові білих щурів після одноразового введення ККХ**

Група тварин	Термін спостереження, міс. (доба)	Гематологічні показники					
		гемоглобін, г/л	ретикулоцити на 10^3ерит.	еритроцити, 10^{12}/л	лейкоцити, 10^9/л	нейтрофіли, 10^9/л	лімфоцити, 10^9/л
	1	128,0±9,0	21,2±1,5	3,51±0,4	8,8±0,1	3,2±0,3	4,99±0,3
	3	130,0±8,6	20,6±1,2	3,4±0,4	8,7±0,1	3,4±0,2	4,7±0,3
	6	132,0±9,5	21,2±1,1	3,45±0,3	8,8±0,1	3,3±0,3	4,69±0,4
	9	131,0±7,6	23,1±1,7	3,5±0,4	8,9±0,3	3,27±03	4,75±0,4
	12	130,0±8,4	22,1±1,5	3,48±0,2	8,9±0,3	3,26±0,2	4,7±0,3
Дослід	3 доба	132,0±8,5	21,3±2,0	3,4±0,2	8,9±0,3	3,4±0,2	4,6±0,2
	1	145,0±7,2	25,2±1,8	3,8±0,4	9,0±0,3	3,5±0,3	4,9±0,3
	2	140,0±9,4	26,3±2,1	3,8±0,3	8,7±0,3	3,5±0,2	4,8±0,3
	6	139,0±8,9	22,0±1,4	3,6±0,5	8,3±0,4	3,27±0,2	4,75±03
	9	136,0±7,3	23,4±1,6	3,6±0,4	8,8±0,2	3,5±0,3	4,8±0,3
	12	132,0±25,0	27,2±1,8	3,5±0,4	9,1±0,3	3,4±0,3	4,9±0,3

Таблиця 3 – Кількість МДА в еритроцитах щурів після одноразового введення ККХ

Термін спостереження	Кількість МДА в еритроцитах, мкг/10^{12} клітин	
	контроль	експеримент
1	1,8±0,2	1,8±0,3
2	1,9±0,2	2,0±0,3
3	2,0±0,3	1,9±0,2
4	2,1±0,3	2,0±0,3
5	1,8±0,3	1,9±0,3
6	2,0±0,3	2,0±0,2
9	1,9±0,2	2,1±0,3
12	2,1±0,2	2,0±0,3

Встановлено, що динаміка зміни маси тіла щурів у контрольній та експериментальній групах вірогідно не відрізнялася (табл. 4). Протягом року тварини обох груп не гинули. Отримані дані свідчать про те, що клітинний трансплантат кріоконсервованих клітин хоріона за умов хронічного експерименту не спричиняв токсичної дії на щурів.

Наведені в таблиці 5 дані вказують на те, що гематологічні показники білих щурів у контролі й експерименті вірогідно не відрізнялися. ККХ не викликали структурних пошкоджень мембран еритроцитів, що спричиняли порушення енергетичної функції клітин і підвищення окиснювання ліпідів. Дані щодо кількості МДА в еритроцитах наведено в таблиці 6.

Таблиця 4 – **Динаміка зміни маси тіла щурів після багаторазового введення ККХ**

Термін спостереження, міс.	Маса тіла щурів, г	
	контроль	експеримент
До введення препарату	190,0±21,0	189,0±16,0
3	197,0±11,0	194,0±19,0
6	215,0±12,0	219,0±15,0
9	274,0±10,0	275,0±10,0
12	298,0±18,0	294,0±9,0

Таблиця 5 – **Гематологічні показники крові білих щурів після багаторазового введення ККХ**

Група тварин	Термін спостереження, міс.	Гематологічні показники					
		гемоглобін, г/л	ретикулоцити на 10^3ерит.	еритроцити, 10^{12}/л	лейкоцити, 10^9/л	нейтрофіли, 10^9/л	лімфоцити, 10^9/л
Контроль	1	130,0±6,0	21,2±1,5	3,41±0,4	8,82±0,1	3,22±0,3	4,68±0,3
	3	129,0±8,7	20,6±1,2	3,4±0,4	8,7±0,1	3,4±0,2	4,7±03
	6	131,0±9,5	21,0±1,1	3,45±03	8,7±0,2	3,41±0,3	4,59±0,4
	9	135,0±7,4	23,1±1,7	3,5±0,4	8,8±0,1	3,17±03	4,56±0,4
	12	131,0±8,2	22,1±1,5	3,48±0,2	8,9±03	3,26±0,2	4,51±0,3
Дослід	3 доба після введення	131,0±11,0	21,0±1,5	3,42±0,6	9,0±0,4	33±0,2	4,75±03
	2	140,0±6,8	24,1±1,7	3,5±0,4	9,2±0,4	3,8±0,3	4,9±0,4
	3	145,0±9,4	25,0±2,0	3,9±03	9,4±0,4	3,8±0,4	4,9±0,4
	4	144,0±10,2	25,14±1,6	4,1±0,3	9,8±03	3,9±0,3	5,1±03
	5	145,0±83	25,2±1,4	4,4±0,5	9,9±0,4	3,8±0,4	5,2±0,4
	6	147,0±6,5	25,7±1,6	4,7±0,2	10,1±0,4	4,0±0,4	5,2±03
	9	147,0±8,0	24,8±13	4,5±0,3	9,7±0,5	3,9±0,4	5,1±0,3
	12	141,0±7,4	23,5±1,9	4,2±0,5	9,6±0,3	3,9±0,5	5,0±0,3

Таблиця 6 – **Кількість МДА в еритроцитах щурів після багаторазового введення ККХ**

Термін спостереження, міс.	Кількість МДА в еритроцитах, мкг/10^{12} клітин	
	контроль	експеримент
1	1,8±0,2	1,9±0,3
2	1,9±0,2	1,9±03
3	2,1±0,3	1,8±0,2
4	2,0±0,3	1,9±0,3
5	2,0±0,2	1,8±0,3
6	1,8±0,2	1,9±0,2
9	1,9±0,1	1,7±0,3
12	2,0±0,2	2,0±0,3

Вивчення ранозагоюючої активності ККХ на моделі опікових ран у щурів показало, що на 3 добу після нанесення опіку площа рани в контрольній групі складала (7,2±0,6) см^2. Площа опікової поверхні тварин, яких лікували ККХ, була значно меншою і становила (5,7±0,3) і (5,9±0,3) см^2 відповідно. Рани щурів, яких лікували, не містили гною і сукровиці на відміну від опіків тварин контрольної групи. Використання МЦ гелю як носія для клітин не було ефективнішим порівняно з нанесеними клітинами без МЦ гелю, але порівняно з показниками контрольної групи опіки мали вірогідно менші розміри. Тварини, яких лікували культивованими ККХ у поєднанні з МЦ гелем, мали опіки площею (5,7±0,7) см^2. На 10 добу опіки

контрольної групи зменшилися незначно, їх площа дорівнювала (6,3±0,5) см^2. Опікові поверхні, які обробляли суспензією клітин хоріона, були меншими від контролю в 5 разів і складали (0,8±0,1) см^2. Рани були чистими, струп не утворювався. На 20 добу площа опікової поверхні контрольних тварин зменшилася до (1,4±0,3) см^2, що майже в 5 разів менше порівняно з відповідними показниками на 10 добу. В щурів, які піддавалися терапії, рани практично не спостерігалось. На місці опіку була молода шкіра з майже повною епітелізацією. Площа опікової поверхні тварин, які піддавались лікуванню, склала (0,2±0,1) см^2, що в 7 разів менше показників площі опіку контрольних щурів. Застосування клітин на гелевій основі не забезпечило достовірного зменшення площі опікової поверхні порівняно з клітинами без МЦ гелю.

Одним з основних показників запалення є кількість лейкоцитів у крові, що в нормі у щурів складає 15,5-16,5•10^9 кл/л. В результаті проведених досліджень встановлено, що на 3 добу після нанесення опіку в крові контрольних тварин містилося 44,68±2,25•10^9 кл/л, що в 2,7 раза перевищувало норму. В групі, де проводили лікування ККХ, ці показники були значно меншими і складали 21,17±2,33•10^9 кл/л.

Використання ККХ на основі МЦ гелю також призвело до значного зниження кількості лейкоцитів у крові порівняно з контролем, але різниця між показниками у разі застосування ККХ на основі гелю і без нього була невірогідною.

На 10 добу кількість лейкоцитів у контролі знизилася майже в 2 рази, що свідчило про зменшення запалення. У контрольній групі тварин вона становила 24,3±0,66•10^{9}кл/л. ККХ забезпечили зниження рівня лейкоцитів до 16,7±1,23•10^9 кл/л. Необхідно відзначити, що внесення клітин у гелі не було ефективнішим і рівень лейкоцитів склав 16,77±0,95•10^9 кл/л.

Кількість лейкоцитів на 20 добу в контрольній групі тварин продовжувала залишатися вищою норми, тоді як у всіх інших випадках лікування вона нормалізувалася, що свідчило про завершення ранового запального процесу.

При гістологічному дослідженні препаратів контрольної групи було показано наявність ознак гнійної опікової рани. Спостерігалась інтенсивна лімфоїдна інфільтрація центральних ділянок рани, яка стримувала формування повноцінної грануляційної тканини. Епітелій, який регенерував, наростав з країв, але в центрі рани піддавався елімінації. Процес колагенізації глибоких відділів дерми по краях ранового дефекту відбувався за умов інфільтрації її лейкоцитами. Відомо, що згодом такий процес може призвести до утворення рубцевої тканини.

При мікроскопічному вивченні опікових ран, оброблених суспензією ККХ, спостерігалася повна їх епітелізація. Рановий дефект був повністю заміщений молодою сполучною тканиною, в якій колагенові й еластичні волокна впорядковано орієнтовані, між ними виявлено значну кількість фібробластних клітин. Над ділянкою ранового дефекту новоутворений епітеліальний пласт був дещо тонший, ніж в зоні, що оточує рану.

ВИСНОВКИ. 1. При оцінці алергізуючих властивостей ККХ людини спостерігали відсутність алергічної реакції на слизовій кон'юнктиви й рогівки.

2. Місцевоподразнююча дія кріоконсервованих клітин хоріона людини на слизову оболонку ока кролів відсутня.

3. Застосування терапії з використанням клітинного трансплантата ККХ для лікування термічних опіків III ступеня у щурів сприяло значному прискоренню загоєння ран і мінімізувало прояв патологічного процесу.

4. Можливим є використання 3 % МЦ гелю як носія для клітинного трансплантата.

Проведені доклінічні дослідження в цілому показали, по-перше, безпечність і, по-друге, безперечну корисну дію препаратів, що вивчалися. Результати вивчення препарату ККХ дозволяють рекомендувати його для подальшого клінічного дослідження як ефективний засіб при лікуванні опікових ран.

Автор щиро дякує старшому науковому співробітнику ІПКіК НАНУ Олені Валентинівні Кудокоцевій за плідну методологічну допомогу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волкова Н.О., Гончарук О.І., Петренко Т.П. та ін. Характеристика кріоконсервованого препарату клітин хоріона // Трансплантологія. – 2007. – **9**, № 1. – С. 22-24.

2. Гончарук Е.И., Волкова Н.А. Исследование морфологических и пролиферативных характеристик культуры клеток хориона. Инновационные технологии в трансплантации органов, тканей и клеток // Мат. Всерос. конф., Россия, Самара, 18-20 июня 2008. – С.161-162.

3. Гончарук Е.И., Волкова Н.А., Петренко Т.П. и др. Исследование характеристик клеток хориона // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии. – М., 2007. – С. 59.

4. Гончарук Е.И., Петренко Т.Ф., Волкова Н.А. и др. Экспрессия CD 34 рецепторов на нативных и культивированных клетках эмбрионального происхождения // Проблемы криобиологии. – 2005. – № 3. – С. 407-408.

5. Гончарук О.І., Волкова Н.О., Петренко Т.П. та ін. Лікування термічних опіків у експериментальних тварин за допомогою суспензії клітин хоріона // Вісник проблем біології і медицини. – 2006. – № 3.

6. Грищенко В.И., Гольцев А.Н., Щегельская Е.А. и др. Криоконсервирование стволовых клеток // Досягнення біології та медицини. – 2006. – № 1 (7). – С. 4-9.

7. Грищенко В.І., Гончарук О.І., Петренко Т.П. та ін. Перспективи використання клітинних препаратів при репаративно-регенеративних процесах в організмі // Клінічна хірургія. – 2006. – № 4-5. – С. 87-88.

8. Кигель Т.Б., Харабаджахьян А.В., Душкин В.А. Морфологический состав периферической крови конвенциональных лабораторных крыс. – М., 1981. – 43 с.

9. Клименко М.О., Субота Н.П., Пітько В.А. та ін. Порівняльна характеристика протизапальної дії екстрактів хоріона та плаценти // Фізіологічний журнал. – 2000. – **46**, № 1. – С. 32-35.

10. Лили Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. –624 с.

11. Методические указания к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций, избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе рабочей зоны / Под ред. И.В. Саноцкого, Н.Г. Иванова. – М.: МЗ СССР, 1980.

12. Пальцев М.А., Горбачева Ю.В., Волощук И.Н. и др. Морфологическая характеристика хориона при спонтанных абортах хромосомной этиологии // Архив патологии. – 2004. – **66** вып.6. – С. 11-15.

13. Патент № 56043А Україна. Спосіб лікування опікової хвороби у експериментальних тварин / Субота Н.П., Нетюхайло Л.Г. – Опубл. 15.04.2003. – Бюл. № 4.

14. Патент № 58997А Україна. Спосіб кріоконсервування гемопоетичних клітин / Грищенко В.І., Семиноженко В.П., Петренко О.Ю. та ін. – Опубл. 15.08.2003. – Бюл. № 8.

15. Патент № 67587А Україна. Спосіб кріоконсервування гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини / Грищенко В.І., Петренко О.Ю., Скоробогатова Н.Г. та ін. – Опубл. 15.06.2004. – Бюл. № 6.

16. Патент № 74976 Україна. Препарат для лікування опіків на основі клітин хоріону, спосіб його приготування і спосіб лікування / Гончарук О.І., Петренко Т.П., Павленко О.В. та ін. – Опубл. 15.02.2006. – Бюл. № 2.

17. Стальная И.Д., Гармишвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1981. – С. 66-68.

18. Трубицкая Г.П. Конъюнктивальная проба в эксперименте на морских свинках. Актуальные вопросы аллергологии и иммунологии. – Ташкент, 1978. – С. 79-83.

19. Хакимов З.З., Наджимутдинов К.Н., Мавлянов И.Р. Фармакодинамика лекарственных веществ, метаболизирующихся в печени, при ожоговой травме у крыс // Фармакология и токсикология. – 1985. – № 2. – С. 103-106.

20. Goncharuk E.I., Volkova N.A., Parphenova V.V. Treatment of burns in experimental animals using chorion cells // International students conference of medical scinces. – Krakow, 2005. – P. 36.

21. Maddalena Soncini, Elsa Vertua, Lucia Gibelli et al. Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2007. – № 1. –P. 296-305.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ И ЛЕЧЕБНОГО ЭФФЕКТА КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ХОРИОНА

О.И. Гончарук

ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ НАН УКРАИНЫ, МЕЖВЕДОМСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ НАН, АМН И МОЗ УКРАИНЫ

Резюме

В работе изложены результаты проведения доклинических исследований препарата криоконсервированных клеток хориона человека, а именно исследования аллергизирующих свойств, местнораздражающего действия, острой и хронической токсичности, а также эффективности терапии ожогов с помощью экспериментального препарата клеток ворсинчатой части хориона.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **клетки хориона, клеточная терапия, доклинические исследования.**

RESEARCH OF BIOLOGICAL SAFETY AND MEDICAL EFFECT OF CRYOPRESERVED CELLS OF CHORION

O.I. Honcharuk

INSTITUTE FOR PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY AND CRYOMEDICINE OF NAS OF UKRAINE, INTER-DEPARTMENTAL SCIENTIFIC CENTRE OF CRYOBIOLOGY AND CRYOMEDICINE OF NAS, AMS AND MPH OF UKRAINE

Summary

The work adduces the results of pre-clinical tests of preparation of cryopreserved cells of human chorion, in particular the research of allergizing properties, local irritating action, acute and chronic toxicity as well as effectiveness of burn therapy by means of experimental preparation of cells of chorion villiferos part.

KEY WORDS: **chorion cells, cellular therapy, pre-clinical experiments.**

Отримано 30.07.2008 р.

Адреса для листування: *О.І. Гончарук, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, 61015, Україна.*

УДК 577.151.6:612.115

РОЛЬ ПРОТЕЇНУ С У СИСТЕМІ ГЕМОСТАЗУ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЙОГО АКТИВНОСТІ ЗА РІЗНИХ ПАТОЛОГІЙ

В.І. Грищук, Т.М. Чернишенко, О.В. Горницька
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Обґрунтовано провідну роль протеїну С в антикоагулянтній ланці системи гемостазу та підкреслено необхідність визначення його активності в плазмі крові хворих. Показано, що зниження активності протеїну С є маркером тромбінемії. Однак для повної характеристики ступеня активації системи згортання крові необхідний комплексний підхід з урахуванням порушень гемостазу, специфічних для кожної окремої патології.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **гемостаз, протеїн С, тромбоз.**

ВСТУП. Система гемостазу має важливе значення в життєдіяльності організму і являє собою складну біологічну систему, яка попереджує або зупиняє кровотечу, а також допомагає підтримувати кров у рідкому стані. Провідна роль в зупинці кровотечі належить системі згортання крові, яка разом із фібринолітичною системою регулює утворення та елімінацію тромбів. Умовно розрізняють внутрішній і зовнішній шляхи згортання крові. Основним критерієм для розділення зовнішнього і внутрішнього шляхів згортання крові слугує джерело клітинних мембран, на поверхні яких перебігають ферментативні реакції. Для активації факторів внутрішнього шляху згортання крові джерелом негативно заряджених мембран є активовані тромбоцити, а для факторів зовнішнього шляху – мембрани ендотеліальних клітин та інших тканин, з якими кров вступає в контакт при пораненні [2, 17].

Згортанню крові протидіють первинні фізіологічні антикоагулянти, що самостійно синтезуються, і вторинні, що з'являються в процесі коагуляції і фібринолізу. Одними з основних первинних антикоагулянтів крові є протеїн С (ПС) і антитромбін III (прогресивно діючий інгібітор тромбіну й активованих факторів X, IX, XI,VII, XII системи згортання крові) [4, 7].

Особливе значення у коагуляційному процесі мають вітамін К-залежні фактори згортання крові, до яких належать фактори II, VII, IX, X згортання крові, протеїн С і протеїн S (ПS). Останні відіграють регуляторну роль у функціонуванні коагуляційної та фібринолітичної ланок гемостазу [2].

© В.І. Грищук, Т.М. Чернишенко, О.В. Горницька, 2009.

Система протеїну С включає один із ранніх механізмів, який діє при небезпеці тромбоутворення. Результатом дії активованого ПС є гальмування активації протромбіну і фактора X згортання крові, що перешкоджає утворенню фібрину, поява якого створює загрозу тромбоутворення. Антикоагулянтна функція системи ПС полягає в попередженні утворення фібринового згустка, і саме цим вона принципово відрізняється від системи фібринолізу, яка безпосередньо здійснює лізис утвореного фібрину [12, 33].

Протеїн С – дволанцюговий глікопротеїн з молекулярною масою 62 кДа – є фізіологічним антикоагулянтом, який синтезується в печінці [11, 14]. Концентрація ПС у крові складає 3-5 мг/л; молярний коефіцієнт екстинції ПС людини дорівнює 14,5, ізоелектрична точка – 4,4-4,5. Час напівжиття активованого ПС – 27 хв. Порушення біосинтезу протеїну С виникає при хронічних захворюваннях печінки, вірусному гепатиті, цирозі печінки, наявності метастазів у печінці [2, 34, 40].

Протеїн С циркулює в плазмі крові як зимоген і може бути активований тромбіном (Т) в комплексі з тромбомодуліном (ТМ) і фактором згортання крові X_a, зв'язаним з поверхнею клітин ендотелію. Активація протеїну С здійснюється на фосфоліпідній мембрані. Тромбомодулін є рецептором тромбіну і в процесі активації ПС відіграє роль кофактора. Зв'язування тромбіну з ТМ викликає зміну конформації активного центру тромбіну, в результаті чого він втрачає прокоагулянтну активність і в складі утвореного комплексу діє як активатор протеїну С [33].

Недостатність тромбомодуліну або мутація в гені фактора V системи згортання крові, в результаті якої відбувається заміна Asp468 на Tyr в амінокислотній послідовності, може призвести до розвитку тромбозів. Існування такої дефектної форми молекули ТМ зумовлює тромбоемболію легенів [28, 39]. Порушення фосфоліпідного оточення тромбомодуліну може спричинити порушення балансу між системами згортання крові й фібринолізу в бік гіперкоагуляції [12, 13].

Специфічний клітинний ендотеліальний рецептор (EPCR) може взаємодіяти як з ПС, так і з активованим протеїном С (АПС). У результаті взаємодії EPCR з протеїном С відбувається концентрування останнього на поверхні стінок судин і, таким чином, полегшується його активація комплексом Т-ТМ. Показано, що швидкість активації протеїну С за присутності EPCR збільшується в 5 разів [14, 15, 37].

Антикоагулянтна активність АПС найбільш виразно проявляється за присутності протеїну S, який є кофактором протеїну С. Протеїн S – вітамін К-залежний білок плазми крові, який циркулює у кровотоці в комплексі з С4b (білок системи комплементу). Тільки вільна форма протеїну S функціонує як активний компонент системи ПС. Gla-домени протеїнів С і S взаємодіють із фосфоліпідними мембранами за присутності іонів кальцію. Кофакторна функція протеїну S в процесі інактивації факторів Va і VIIIa полягає в посиленні зв'язування протеїну С із фосфоліпідною мембраною і зміщенні його активного центру відносно мембрани, що сприяє ефективній дії АПС. Наслідком розщеплення факторів Va і VIIIa є зниження прокоагулянтного потенціалу плазми крові за рахунок інгібування ферметативного каскаду як по зовнішньому, так і по внутрішньому шляхах згортання крові (схема 1) [2, 33].

Протеїн S проявляє антикоагулянтні властивості незалежно від протеїну С, що зумовлено його конкуренцією з протромбіном за зв'язування з фактором Va. Показано також, що протеїн S зв'язує та інгібує фактор Xa згортання крові. Механізм інгібування полягає в оборотній, специфічній і високоафінній взаємодії протеїну S із фактором VIIIa. Даний ефект був виявлений за присутності клітин ендотелію. Наявність тромбоцитів підсилює інгібуючу дію протеїну S [17, 23, 32]. Спадкова недостатність протеїну S також може спричиняти тромботичні ускладнення. Відомо, що з усіх випадків венозного тромбозу не більше 5 % зумовлено зниженням у плазмі крові концентрації протеїну S [30, 40].

Профібринолітична функція АПС на даний час уточнюється. Представлено докази того, що механізм стимуляції полягає у взаємодії АПС з інгібітором тканинного активатора плазміногена I (ПАІ-1), внаслідок чого відбувається вивільнення тканинного активатора плазміногена, що призводить до підвищення фібринолітичного потенціалу крові. Регуляція фібринолізу АПС може також здійснюватись шляхом інгібування активності інгібітора фібринолізу (TAFI) [7, 10, 26].

Основними інгібіторами АПС у плазмі крові є його специфічний інгібітор і α_1-антитрипсин. Описано недостатність специфічного інгібітора активованого протеїну С, яка призводить до зниження вмісту факторів коагуляції Va і VIIIa та появи кровотечі. Концентрація інгібітора АПС у плазмі крові зменшується швидше, ніж концентрація самого протеїну С при ВЗК-синдромі [4].

Багатьма дослідниками показано, що за розвитку патологій спостерігається активація системи згортання крові, наслідком якої є зниження вмісту ПС і розвиток тромботичних ускладнень. Визначення вмісту функціонально активного протеїну С має важливе значення для оцінки антикоагулянтного потенціалу крові, що є прогностичним показником розвитку в лабораторній діагностиці [7, 25, 30, 36].

Метою роботи було показати важливість визначення активності протеїну С для оцінки антикоагулянтного потенціалу системи згортання крові та прогнозування розвитку тромботичних ускладнень.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Плазму одержували з крові 10 донорів. Кров брали натще шляхом пункції ліктьової вени і негайно змішували з 3,8 % розчином лимоннокислого натрію у співвідношенні 9:1 з подальшим центрифугуванням при 1300 g. Отриману плазму крові заморожували в пластикових пробірках порціями по 1 мл при -70 °С і зберігали при -20 °С не довше 1-го місяця.

Плазма крові пацієнтів була надана співробітниками кафедри акушерства та гінекології Українського державного медуніверситету ім. О.О. Богомольця (операція – кесарів розтин, n=37), співробітниками Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (системний червоний вовчак, n=194), Київської медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика (опіки, n=48), Інституту кардіології ім. М.Д. Стражеска АМН України (стабільна (n=29) та нестабільна (n=49) стенокардія, ГІМ (n=48)).

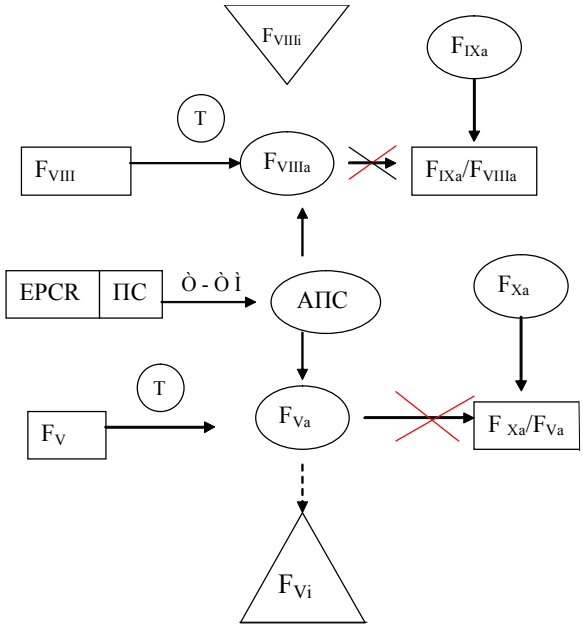


Схема 1. Антикоагулянтна функція протеїну С:
ПС – протеїн С; АПС – активований протеїн С; Т – тромбін; ТМ – тромбомодулін; Т-ТМ –тромбін-тромбомодуліновий комплекс; EPCR – специфічний клітинний ендотеліальний рецептор; F_V – фактор V згортання крові; F_{Va} – активований фактор V згортання крові; F_{VIII} – фактор VIII згортання крові; F_{VIIIa} – активований фактор VIII згортання крові; F_{IXa} – активований фактор IX згортання крові; F_{Xa} – активований фактор X згортання крові; F_{Vi} – інактивований фактор V згортання крові; F_{VIIIi} – інактивований фактор VIII згортання крові.

Визначення часу згортання плазми крові в тесті "активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ)" проводили згідно з [1]. Активність протеїну С визначали з використанням активатора протеїну С відповідно до [5], активність тканинного активатора плазміногена – згідно з [6]. Час лізісу еуглобулінової фракції визначали за методом [1].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Тромбін, що генерується в місці пошкодження судинної поверхні, за принципом позитивного зворотного зв'язку стимулює коагуляційний процес шляхом активації факторів V і VIII згортання крові. Фактори Va і VIIIa, що зв'язані з експонованими на активованих тромбоцитах негативно зарядженими фосфоліпідами, слугують рецепторами зв'язування з факторами IXa і Xa відповідно. Наслідком цих реакцій є локальне підвищення концентрації тромбіну, який перетворює фібриноген на фібрин і тим самим сприяє утворенню тромбу. Ризик підвищеного тромбоутворення спричиняється також дефіцитом протеїну С. У біохімічному аспекті розрізняють два типи дефіциту – спадковий і набутий. Перший тип – уроджена недостатність протеїну С – є однією з причин повторних тромбоемболій і характеризується одночасним зниженням і концентрації білка, і його активності. Другий тип недостатності протеїну С – набутий – характеризується нормальним рівнем білка, але зниженою активністю [24, 31, 38].

Крім уродженого дефіциту самого ПС, у 20-60 % випадків до розвитку тромбозів глибоких вен призводить резистентність фактора Va до активованого протеїну С (РАПС), яка пов'язана з точковою мутацією в гені фактора V (аномалія фактора V Лейден) [8, 35, 41]. Існують і інші мутації в гені фактора V згортання крові, які спричиняють резистентність до АПС, однак на практиці вони зустрічаються дуже рідко [21, 35]. Розрізняють спадкову або набуту форму резистентності. В основі набутої форми лежить порушення взаємодії фактора Va, ПС із ПS на фосфоліпідній мембрані. Цю форму резистентності до АПС виявляють при вагітності, антифосфоліпідному синдромі.

Значно частіше зустрічається набута недостатність протеїну С. Зниження його вмісту може виникати за різних захворювань, наслідком яких є порушення біосинтезу протеїну С або його підвищене споживання.

У клінічній практиці для встановлення рівня ПС у плазмі крові використовують функціональний тест АЧТЧ і нефізіологічні активатори ПС, що містяться в отруті змій родини *Crotalidae*, до яких відносять представників роду *Agkistrodon* (щитомордник) [16, 22]. На відміну від імунологічних тестів, використання яких дозволяє визначити лише кількісний вміст протеїну С, тести із застосуванням активатора ПС характеризують функціональну активність даного білка. Активований протеїн С спільно з його кофактором ПS інактивує фактори згортання крові Va та VIIIa, що призводить до подовження часу згортання плазми крові в тесті АЧТЧ. При дефіциті протеїну С час згортання плазми крові скорочується [16, 20, 30, 38].

У даній роботі для оцінки стану антикоагулянтної ланки системи гемостазу та визначення активності ПС використовували тест АЧТЧ та активатор протеїну С, виділеного з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*) [3]. Було проаналізовано зразки плазми крові пацієнтів з порушенням серцево-судинної системи (рис. 1). Показано, що при стабільній стенокардії обидва показники коливаються в межах норми. При нестабільній стенокардії спостерігається значне зниження активності ПС, тоді як АТ-III відповідає нормі. У випадку кесаревого розтину зниження активності ПС досягає 50 %.

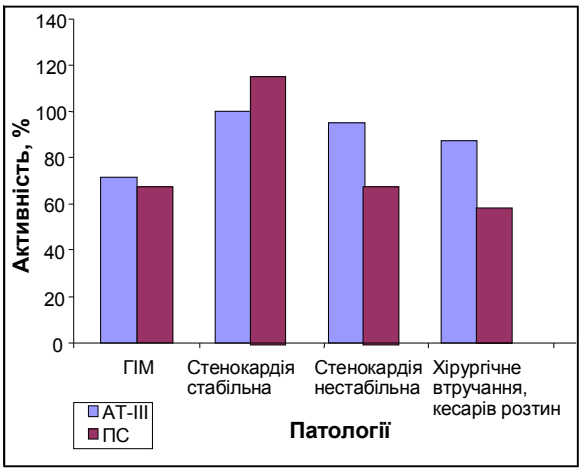


Рис. 1. Активність протеїну С та антитромбіну III за різних патологій (активність ПС і АТ-III в нормі складає (100±15)%).

Суттєве зниження активності ПС за вказаних патологій супроводжується накопиченням розчинних фібрин-мономерних комплексів, присутність яких є маркером порушення гемостатичного балансу. В зв'язку з цим, для проведення комплексного аналізу порушень гемостазу необхідно визначати параметри фібринолітичної системи. На рисунку 2 показано, що зниження активності ПС у вагітних пов'язане зі зменшенням активності ТАП та подовженням часу лізису еуглобулінової фракції.

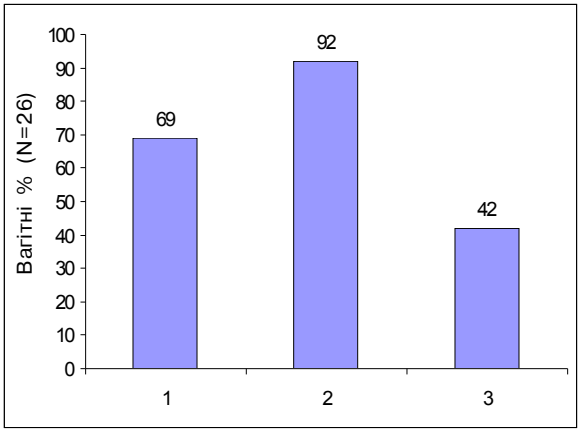


Рис. 2. Частота зниження активності протеїну С (1), ТАП (2) та подовження часу лізису еуглобулінової фракції (3) у вагітних.

Отримані дані вказують на те, що саме ПС є білком швидкого реагування: при будь-яких порушеннях, зумовлених активацією системи згортання крові активність антикоагулянту знижується за рахунок його підвищеного споживання. Ступінь зниження ПС свідчить про розвиток ВЗК-синдрому: чим менша активність ПС, тим вірогідніша загроза тромбоутворення [11, 13, 27].

Функціонування системи протеїну С порушується не тільки у вказаних нами випадках, але і за інших патологій. Так, наприклад, зниження рівня ПС спостерігається за цукрового діабету, у хворих із метастазованими злоякісними новоутвореннями [9, 19, 29].

Пригнічення системи протеїну С спостерігається при запальних процесах різної етіології. Встановлено, що медіатори запальних процесів – інтерлейкін-1 і ендотоксин – інгібують транскрипцію генів ТМ і EPCR. Показано також, що при запальних процесах введення експериментальним тваринам інтерлейкіну-1 призводить до зменшення концентрації вільного протеїну S у плазмі крові й збільшення концентрації комплексу S-C4BP [14, 19, 32, 36]. Це є наслідком встановленого зв'язку між запальними процесами, системою коагуляції і системою ПС, яка відіграє роль медіатора процесів запалення і системи згортання крові. Підтвердженням цього є дефіцит ПС у плазмі крові хворих при різних типах запалення і сепсисі. Так, при аналізі зразків плазми крові пацієнтів з тяжкими опіками (n=48) нами виявлено значне зниження активності протеїну С ((58,6±5,7) %) та антитромбіну III ((57,2±8,8) %). Крім того, спостерігались значне підвищення вмісту фібриногену ((5,1±0,7)г/л) та наявність розчинного фібрину ((0,05±0,01) г/л). Одержані нами дані свідчать про загрозу розвитку тромботичних ускладнень, що збігається з даними літератури щодо прогностичної ролі протеїну С [18].

У випадках, коли активність ПС неможливо визначити стандартними методами, використовують хромогенний субстрат (хромозим 236, S_{2366}) [16]. Швидкість розщеплення субстрату під дією АПС визначають спектрофотометрично у двопроменевому режимі при довжині хвилі 405-492 нм [5]. Кількість вивільненого пара-нітроаніліну (pNa) прямо пропорційна активності протеїну С, який активується при додаванні активатора РС. Перевага даного методу полягає в легкому і швидкому тестуванні великої кількості зразків плазми крові. Паралельне використання тесту АЧТЧ та тесту з використанням хромогенних субстратів дає змогу виявляти порушення взаємодії між фактором Va згортання крові, ПС та протеїном S на фосфоліпідній мембрані, тим самим надаючи інформацію про стан коагуляційного каскаду внутрішнього шляху згортання крові. При накопиченні інгібіторів згортання крові виконання функціонального тесту для визначення рівня ПС може давати завищені результати. Виконання тесту з використанням хромогенних субстратів дозволяє точно визначити рівень ПС (табл. 1).

Таблиця 1 – **Аналіз результатів, одержаних при визначенні активності протеїну С**

Результат хронометричного коагуляційного тесту	Причини, які призводять до даного результату
Час згортання плазми крові (t) відповідає часу згортання плазми крові донорів (K)	100 % вміст/активність протеїну С
Час згортання плазми крові скорочено (t<K)	Можливий дефіцит протеїну С, протеїну S або наявність мутації фактора V Лейден. Для визначення вмісту/активності протеїну С необхідно використовувати хромогенний субстрат
Час згортання плазми крові подовжено (t>K)	Можливі наявність інгібіторів згортання крові та дефіцит факторів коагуляції. Необхідно проводити корекційно-інгібіторну пробу тесту АЧТЧ. Якщо додавання 50 % плазми крові донорів не корегує подовження часу згортання в тесті, то це вказує на присутність інгібіторів згортання крові. Якщо відбувається нормалізація часу згортання, то це свідчить про дефіцит факторів коагуляції. Для визначення вмісту/активності протеїну С необхідно використовувати хромогенний субстрат
Час утворення згустка не фіксується (згусток не утворюється)	Можливі наявність інгібіторів згортання крові, дефіцит факторів коагуляції або функціонально неактивного протеїну С. У такому випадку для з'ясування причин порушення часу згортання плазми крові необхідно проводити комплексний аналіз стану системи згортання крові. Визначення активності протеїну С необхідно проводити з використанням хромогенного субстрату

Доцільність використання хромогенного субстрату для визначення активності протеїну С ми продемонстрували, аналізуючи зразки плазми крові хворих на СЧВ (n=194). Час згортання плазми крові в тесті АЧТЧ було подовжено настільки, що визначити вміст ПС було неможливо (згусток не утворювався протягом тривалого часу). З огляду на одержану інформацію, для визначення протеїну С ми застосували хромогенний субстрат. У результаті проведеного аналізу було виявлено, що у 52,5 % хворих активність протеїну С значно знижена (до 54-76 %).

ВИСНОВОК. Система протеїну С є регуляторною антикоагулянтною системою. Показано, що для виявлення гемостатичних порушень необхідно контролювати рівень протеїну С, вміст/активність якого є маркером стану рівноваги між коагуляційною і антикоагулянтною ланками системи гемостазу. Зниження активності протеїну ПС розглядають як маркер розвитку ВЗК-синдрому. Дефіцит цього білка створює загрозу тромбоутворення. Визначення активності протеїну С має велике значення для оцінки антикоагулянтного потенціалу крові, оскільки отримана інформація свідчить про прямо пропорційну залежність між ступенем порушення рівноваги між інгібіторами та потенціалом коагуляційної і фібринолітичної систем і розвитком тромботичних ускладнень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. – М.: Ньюдиамед, 2001. – 296 с.

2. Волков Г.Л., Платонова Т.Н., Савчук А.Н. и др. Современные представления о системе гемостаза. – К.: Наукова думка, 2005. – 296 с.

3. Горницкая О.В., Платонова Т.Н. Выделение и свойства активатора протеина С из яда щитомордника обыкновенного // Биомед. химия. – 2003. – **49**, № 5. – С. 470-478.

4. Коган А.Е., Струкова С.М. // Биохимия. – 1993. – **58**, № 6. – С. 828-844.

5. Платонова Т.М., Горницька О.В., Мороз Є.Д. Застосування активатору протеїну С з отрути щитомордника звичайного (*Agkistrodon halys halys*) для визначення активності протеїну С у плазмі крові за різних патологій // Лаб. діагностика. – 2001. – № 3. – С. 28-31.

6. Платонова Т.Н., Савчук А.Н., Ровинская И.Н. Определение уровня тканевого активатора плазминогена и растворимого фибрина в плазмах больных при различных патологиях // Лаб. диагностика. – 2000. – № 2. – С. 15-17.

7. Таран Л.Д. Система протеина С и тромбозы // Укр. биохим. журн. – 2003. – **75**, № 1. – С. 18-24.

8. Amiral J., Fareed J. Thromboembolic diseases: biochemical mechanisms and new possibilities of biological diagnosis // Semin. Thromb. Hemost. – 1996. – **22**, suppl. 1. – P. 41-48.

9. Bernard G.R., Vincent J.-L., Laterre P.-F. et al. Efficacy and safety of recombinant human activated for severe sepsis // N. Engl. J. Med. – 2001. – **344**. – P. 699-709.

10. Burdick M.D., Schaub R.G. Human protein C produces anticoagulant and increased fibrinolytic activity in the cat // Thrombos. Res. – 1987. – **45**, № 4. – P. 413-419.

11. Dahlback B. The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis // Thromb. Res. – 1995. –**77**, № 1. – P. 1-43.

12. Dahlback B., Bruno O. Regulation of Blood Coagulation by the Protein C Anticoagulant Pathway: Novel Insights Into Structure-Function Relationships and Molecular Recognition // Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol. – 2005. – **25**. – P. 1311-1320.

13. Dahlback B., Villoutreix B.O. Regulation of Blood Coagulation by the Protein C Anticoagulant Pathway // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2005. – **25**. – P. 1311-1320.

14. Esmon C.T. The protein C pathway // Chest. – 2003. – **124**. – P. 26-32S.

15. Esmon C.T., Xu J., Gu J.M. et al. Endothelial protein C receptor // Thromb. Haemost. – 1999. – **82**. – P. 251-258.

16. Exner T. Venom Proenzyme Activator Detection with a Novel Immunochromometric Technique // In: Hemostasis and animal venoms. Series: Hematology, **7.** Ed. By Hubert Pirkle, Francis S. Markland. – New York: Marcel Dekker, Inc., 1988. – P. 491-502.

17. Goto S., Salomon D.R., Ikeda Y., Ruggeri Z.M. Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets // J. Biol. Chem. – 1995. – **270**, № 40. – P. 23352-23361.

18. Griffin J.H., Zlokovic B., Fernandez J.A. Activated protein C: potential therapy for severe sepsis, thrombosis and stroke // Semin. Hematol. – 2002. – **39**. – P. 197-205.

19. Kershen E.J., Fernandez j.A., Cooley B.C. et al. Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C // J. Exp. Med. – 2007. – **204**. – P. 2439-2448.

20. Lusher T.F., Barton M.H. Biology of the endothelium // Clin. Cardiol. – 1997. – **11**, suppl. 2:II. – P. 3-10.

21. Mann K.G., Kalafatis M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde // Blood. – 2003. – **101**, № 1. – P. 20-30.

22. Markland F.S. Snake venoms and hemostasis system // Toxicon. – 1998. – **36**, № 12. – P. 1749-1800.

23. Marlar R.A., Adcock D.M. Clinical evaluation of protein C: a comparative review of antigenic and functional assays // Hum. Pathol. – 1989. – **20**, № 11. – P. 1040-1047.

24. Miletich J.P. Laboratory diagnosis of protein C deficiency // Semin. In Thromb. and Haemost. – 1990. – **16**, № 2. – P. 169-176.

25. Miyata T., Zheng Y.Z., Sakata T. et al. Three missense mutations in the protein C heavy chain causing type I and type II protein C deficiency // Thrombos. Haemost. – 1994. – **71**, № 1. – P. 32-37.

26. Mosnier L.O., Bouma B.O. Regulation of Fibrinolysis by Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor, an Unstable Carboxypeptidase B That Unites the Pathways of Coagulation and Fibrinolysis // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2006. – **26**. – P. 2445-2453.

27. Mosnier L.O., Gale A.J., Yegneswaran S., Griffin J.H. Activated protein C variants with normal cytoprotective but reduced anticoagulant activity // Blood. – 2004. – **104**. – P. 1740-1744.

28. Ohlin A.K., Marlar R.A. The first mutation identified in the thrombomodulin gene in a 45-year-old man presenting with thromboembolic disease // Blood. – 1995. – **85**, № 2. – P. 320-336.

29. Okajima K., Imamura H., Koga S. et al. Treatment of patients with disseminated intravascular coagulation by protein C // Amer. J. Haematol. – 1990. – **33**, № 4. – P. 277-278.

30. Pabinger I., Kyrle P.A., Heistinger M. et al. The risk of thromboembolism in asymptomatic patients with protein C and protein S deficiency: a prospective cohort study // Thromb. Haemost. – 1994. – **71**, № 4. – P. 441-445.

31. Reitsma P.H., Bernardi F., Doig R.G. et al. Protein C deficiency: a database of mutations // Thromb. Haemost. – 1995. – **73**, № 5. – P. 876-889.

32. Rezende S.M., Simmonds R.E., Lane D.A. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S-C4b binding protein complex // Blood. – 2004. – **103**. – P. 1192-1201.

33. Riewald M. Schuepbach R.A. Protective Signaling Parhways of Activated Protein C in Endothelial Cells // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2008. – **28**. – P. 1-3.

34. Rodeghiero F., Mannucci P.M., Vigano S. et al. Liver dysfunction rather than intravascular coagulation as the main cause of low protein C and antithrombin III in acute leukemia // Blood. – 1984. – **63**, № 3. – P. 965-969.

35. Sie P. Resistance to activated C protein and factor V Leiden in the thrombophilic patients // Eurobiologist. – 1998. – **32**, № 237. – P. 29-37.

36. Shibata M., Kumar S.R., Amar A. et al. Anti-inflammatory, antitrhombotic, and neuroprotective effects of activated protein C in a murine model of focal ischemic stroke // Circulation. – 2003. – **103**. – P. 1799-1805.

37. Van de Wouwer M., Collen D., Conway E.M. Thrombomodulin-protein C-EPCR system: integrated to regulate coagulation and inflammation // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2004. – **24**. – P. 1374-1383.

38. VukovichT., Auberger K., Well J. et al. Replacement for a homozygous protein C deficiency-state using a concentrate of human protein C and S // Brit. J. Haematol. – 1988. – **70**. – P. 435-440.

39. Weiler H., Isermann B.H. Thrombomodulin // Thromb. Haemost. – 2003. – **1**. – P. 1515-1524.

40. Weiss P., Soff G.A., Halkin H. et al. Decline of proteins C and S and factors II, VII, IX and X during the initiation of warfarin therapy // Thrombos. Res. – 1987. – **45**, № 6. – P. 783-790.

41. Yan S.B., Nelson D.R. Effect of factor V Leiden polymorphism in severe sepsis and on treatment with recombinant human activated protein C // Crit. Care. Med. – 2004. – **32**. – P. 239-246.

РОЛЬ ПРОТЕИНА С В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕГО АКТИВНОСТИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

В.И. Грищук, Т.М. Чернышенко, О.В. Горницкая
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

Резюме

Обоснована ведущая роль протеина С в антикоагулянтном звене системы гемостаза и подчеркнута необходимость определения его активности в плазме крови больных . Показано, что снижение активности протеина С является маркером тромбинемии. Однако для полной характеристики степени активации системы свертывания крови необходим комплексный подход с учетом нарушений гемостаза, специфичных для каждой отдельной патологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **гемостаз, протеин С, тромбоз.**

THE ROLE OF PROTEIN C IN HAEMOSTASIS SYSTEM AND DETERMINATION OF ITS ACTIVITY AT DIFFERENT PATHOLOGIES

V.I. Hryshchuk, T.M. Chernyshenko, O.V. Hornytska
KYIV NATIONAL UNIVERSITY BY TARAS SHEVCHENKO

Summary

The dominant role of the protein C in anticoagulant pathway of haemostasis system is shown. The necessity of protein C activity determination is accentuated. It has been demonstrated that the decrease of protein C activity is a thrombinemia marker. However, the complex method for characteristics of the coagulation system activation level is necessary taking into account the specisic haemostatic abnormalities for each pathology.

KEY WORDS: **haemostasis, protein C, thrombosis.**

Отримано 16.07.2008 р.

Адреса для листування: *О.В. Горницька, вул. Чорнобильська, 12, кв. 10, Київ, 03179, Україна.*

УДК 547.745

СИНТЕЗ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВИХ N-ЗАМІЩЕНИХ СУКЦИНІМІДІВ З ПОТЕНЦІЙНОЮ БІОЛОГІЧНОЮ АКТИВНІСТЮ

Ю.І. Губський, О.В. Вельчинська, Г.В. Скибюк, О.С. Кобко[1]
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ, КИЇВ
ІНСТИТУТ ОРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ НАН УКРАЇНИ[1], КИЇВ

Здійснено синтез похідних N-заміщених полігетероциклічних сукцинімідів з піридинпіперазиновими, бензотієнотіопіримідиновими та морфоліновими фрагментами у складі молекул, вивчено їх фізико-хімічні властивості. Будову синтезованих сполук підтверджено даними елементного аналізу, УФ-, ІЧ- та ЯМР^{1}Н-спектрів. Чистоту контролювали методами тонкошарової та газорідинної хроматографії. Синтезовані фармакофорвмісні сукциніміди є перспективними для подальшого вивчення як сполуки потенційно біологічно активні.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **малеїнімід, сукцинімід, синтез, протисудомна активність.**

ВСТУП. Спрямованість і залежність фізіологічної дії речовини від будови введеного замісника в молекулу малеїніміду доведені та описані в численних наукових роботах [8, 9]. Похідні малеїніміду – це сполуки з анксіолітичним типом дії, психотропні агенти, протисудомні лікарські засоби, які застосовують для лікування малих нападів епілепсії, атипових загальних нападів при вторинній епілепсії, тяжких комплексних нападів. Сполуки з ряду заміщених малеїнімідів, порівняно з похідними барбітурової кислоти, гідатоїну та оксазолідин-2,4-діону, меншою мірою проявляють побічну та токсичну дію, а також їх можна отримувати за допомогою відносно простих методів синтезу.

Зацікавленість цим класом сполук як потенційним джерелом протиепілептичних препаратів виникла після експериментальних досліджень, що проводилися науковцями з 1936 р. [8]. Описано метод синтезу поліциклічних гетероарилпіперазинілімідів реакцією арил- або гетероарилпіперазинів з поліциклічними алкілімідами (схема 1) [3].

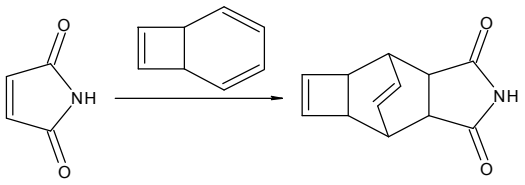


Схема 1

© Ю.І. Губський, О.В. Вельчинська, Г.В. Скибюк, О.С. Кобко, 2009.

Реакцією сульфалену з малеїнімідом в ацетоні в умовах фотолізу за допомогою L-ртутної лампи типу Hanovia 450-W синтезовано тетрагідротієноциклобутапіроледіон-2, 2-діоксид (схема 2) [8].

Синтезована сполука вступає в реакції заміщення по атому водню при гетероатомі азоту (схема 3).

Порівняно з аліфатичними та ароматичними амінами N-вмісні гетероциклічні сполуки менш нуклеофільні, але їх нуклеофільність достатня для здійснення реакції Міхаеля [7]. При взаємодії малеїнімідів із заміщеним бензолом за присутності сірчаної кислоти або сірчаної та фосфорної кислот можливе отримання N-арилмалеїнімідів зі збереженням або розкриттям циклу малеїніміду (схема 4) [5].

Раніше нами були отримані нові гетероциклічні похідні малеїнімідів шляхом нуклеофільного приєднання по подвійному зв'язку молекули малеїнімідів [1, 2].

Огляд літературних даних дає можливість прогнозувати, що в результаті нуклеофільного приєднання молекул складних азотовмісних циклічних систем (піридинпіперазинів, бензотієнотіопіримідинів, морфолінамінів, піридинамінів) до N-заміщеного малеїніміду можливе утворення нових сполук з потенційною біологічною активністю: протипухлинною, протисудомною, а також антимікробною діями [4, 6, 8].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Сполуки (I-VI) синтезовано на кафедрі біоорганічної, біологічної та фармацевтичної хімії Національного ме

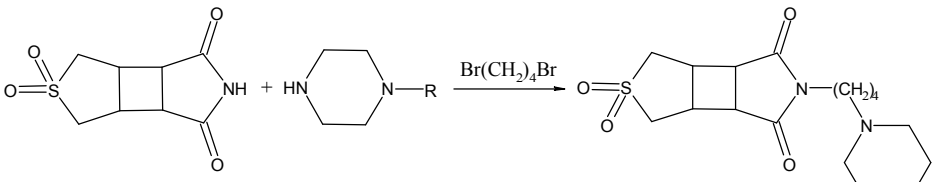


Схема 2

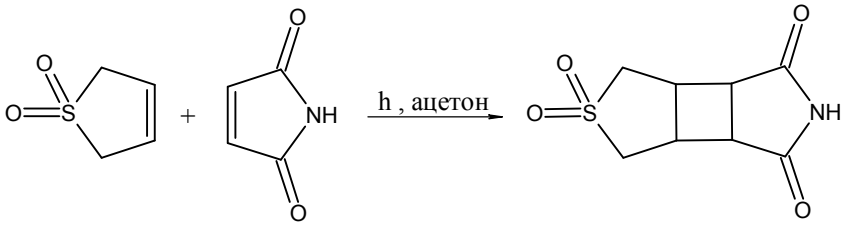


Схема 3

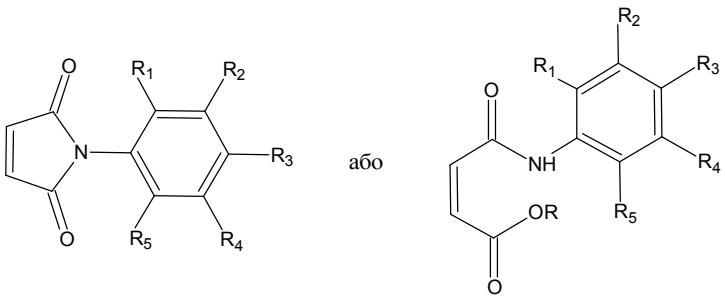


Схема 4

R_1-R_5 = H, Hal, NO_2, OH, COOH, Ph, SO_3H

дичного університету ім. О.О. Богомольця та в Інституті органічної хімії НАН України. Сполуки (I-VI) отримано шляхом взаємодії N-заміщених малеїнімідів з 1-[3'-хлор-5'-(трифторметил)-піридин-2'-іл]-піперазином, 1-[2'-піридин-2'-іл-етил]-піперазином, N-метил-N-[2'-морфолін-4'-іл-оксоетил]-аміном, N-метил-N-[2'-піридин-2'-іл-етил]-аміном,[(4'-оксо-3',4',5',6',7',8'-гексагідро-[1"]-бензотієно-[2",3"-d]-2'-іл)тіо]-піримідином у молярному співвідношенні 1:1 з участю атомів водню: аміногруп морфолінамінів та піридинамінів, тіогрупи молекули бензотієнотіопіримідину, при гетероатомі азоту піперазинового циклу. Проведені реакції є типовим прикладом нуклеофільного приєднання гетероциклічних сполук по подвійному зв'язку молекули N-заміщеного малеїніміду.

Реакції проводили в бензолі або ацетонітрилі при кімнатній температурі протягом 24 год з наступною кристалізацією та сушінням отриманих продуктів реакції. Варіювання умов проведення реакцій та внесення змін до методики синтезу (кристалізація з ізопропілового спирту та промивання залишку – осаду під час фільтрування у вакуумі сухим гексаном) дозволили збільшити практичний вихід сполук (I-VI) до 70 %.

Індивідуальність синтезованих сполук (I-VI) контролювали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ), склад підтверджували даними елементного аналізу. ТШХ виконували на пластинах Silufol-254. ГРХ визначали на газорідинному хроматографі "Perkin Elmer" з УФ-детектором (виробник "Perkin", Germany). УФ-спектри записували на спектрофотометрі Mel Temp II (USA). ІЧ-спектри записували на спектрофотометрі UR-20 (виробник "Charles Ceise Hena", Germany). ЯМР^{1}H-спектри синтезованих сполук (I-VI) записували на приладах "Bruker WP-200" (виробник "Bruker", Switzerland), "Varian T-60" (виробник "Varian", USA) з робочою частотою 200-132 МГц у вигляді розчинів ДМСО-D_6 та $CDCl_3$ (внутрішні стандарти ТМС та ГМДС).

Хроматограми, УФ-, ІЧ-, ЯМР^{1}H-спектри кінцевих продуктів ідентифікували порівняно з хроматограмами, УФ-, ІЧ-, ЯМР^{1}H-спектрами вихідних сполук.

Дані елементного аналізу на C, H, N синтезованих сполук відповідають обчисленим значенням.

N-парахлорфеніл-3-(N-метил-N-[2'-піридин-2'-іл-етил]-аміно)-сукцинімід (I). До розчину 0,5 г (0,0024 моль) N-парахлорфенілмалеїніміду в 6 мл бензолу додають 0,33 г (0,0024 моль) N-

метил-N-[2'-піридин-2'-іл-етил]аміну, залишають при кімнатній температурі на 24 год. Осад, що утворився, відфільтровують, сушать у пістолеті Фішера. Залишок – осад світло-жовтого забарвлення – кристалізують з ізопропілового спирту, охолоджують при кімнатній температурі, промивають під час фільтрування у вакуумі сухим гексаном, сушать на повітрі. Практичний вихід – 0,48 г (58 %).

N-параметоксифеніл-3-(N-метил-N-[2'-морфолін-4'-іл-оксоетил] -аміно) -сукцинімід (II). До розчину 0,5 г (0,0025 моль) N-параметоксифенілмалеїніміду в 6 мл бензолу додають розчин 0,39 г (0,0025 моль) N-метил-N-[2'-морфолін-4'-іл-оксоетил]-аміну в 4 мл бензолу, залишають при кімнатній температурі на 24 год. Осад, що утворився, відфільтровують, сушать у пістолеті Фішера. Залишок – осад світло-жовтого забарвлення – кристалізують з ізопропілового спирту, охолоджують при кімнатній температурі, промивають під час фільтрування у вакуумі сухим гексаном, сушать на повітрі. Практичний вихід – 0,46 г (52 %).

N-параметоксифеніл-3-[(4'-оксо-3',4',5',6',7',8'-гексагідро-[1"]-бензотієно-[2",3"-d]-піримідин-2'-іл)тіо]-сукцинімід (III). До розчину 0,5 г (0,0025 моль) N-параметокси-фенілмалеїніміду в 6 мл ацетонітрилу додають розчин 0,6 г (0,0025 моль) [(4'-оксо-3',4',5',6',7',8'-гексагідро-[1"]-бензотієно-[2",3"-d]-2'-іл)тіо]-піримідину в 4 мл ацетонітрилу, залишають при кімнатній температурі на 24 год. Осад, що утворився, відфільтровують, сушать у пістолеті Фішера. Залишок – осад світло-кремового забарвлення – кристалізують з ізопропілового спирту, охолоджують при кімнатній температурі, промивають під час фільтрування у вакуумі сухим гексаном, сушать на повітрі. Вихід – 0,7 г (64 %).

N-парахлорфеніл-3-(1'-[3"-хлор-5"-(трифторметил)-піридин-2"-іл]-піперазино)-сукцинімід (IV). До розчину 0,5 г (0,0024 моль) N-парахлорфенілмалеїніміду в 6 мл бензолу додають з перемішуванням розчин 0,64 г (0,0024 моль) 1-[3'-хлор-5'-(трифторметил)-піридин-2'-іл]-піперазину в 4 мл бензолу. Реакційну суміш залишають на 24 год при кімнатній температурі. Осад, що утворився, відфільтровують, сушать у пістолеті Фішера. Залишок – осад світло-жовтого забарвлення – кристалізують з ізопропілового спирту, охолоджують при кімнатній температурі, промивають під час фільтрування у вакуумі сухим гексаном, сушать у пістолеті Фішера. Вихід – 0,79 г (70 %).

N-парахлорфеніл-3-(1'-[2"-піридин-2"-іл-етил]-піперазину)-сукцинімід (V). До розчину 0,5 г (0,0024 моль) N-парахлорфенілмалеїніміду в 6 мл бензолу додають 0,46 г (0,0024 моль) 1-[2'-піридин-2'-іл-етил]-піперазину в 4 мл бензолу. Реакційну суміш залишають при кімнатній температурі на 24 год. Залишок – осад жовтого забарвлення – відфільтровують, кристалізують з ізопропілового спирту, промивають під час фільтрування у вакуумі сухим гексаном, сушать у пістолеті Фішера. Вихід – 0,65 г (68 %).

N-параметоксифеніл-3-(1'-[2"-піридин-2"-іл-етил]-піперазину)-сукцинімід (VI). До розчину 0,5 г (0,0025моль) N-параметоксифенілмалеїніміду в 6 мл бензолу додають 0,47 г (0,0025 моль) 1-[2'-піридин-2'-іл-етил]-піперазину в 4 мл бензолу, залишають на 24 год при кімнатній температурі. Залишок – осад жовтого забарвлення – відфільтровують, кристалізують з ізопропілового спирту, промивають під час фільтрування у вакуумі сухим гексаном, сушать у пістолеті Фішера. Вихід – 0,38 г (40 %).

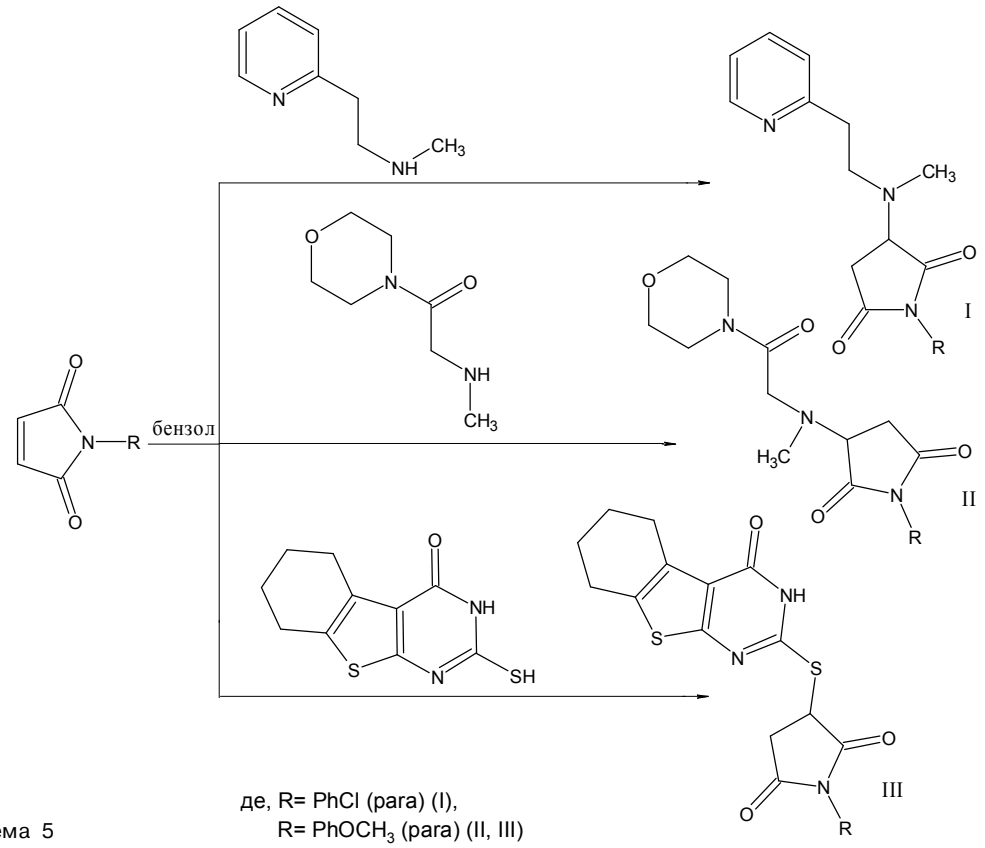
РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Шляхом взаємодії N-заміщених малеїнімідів з N-метил-N-[2'-піридин-2'-іл-етил]-аміном, N-метил-N-[2'-морфолін-4'-іл-оксоетил]-аміном або [(4'-оксо-3',4',5',6',7',8'-гексагідро-[1"]-бензотієно-[2",3"-d]-2'-іл)тіо]-піримідином у молярному співвідношенні 1:1, в бензолі або ацетонітрилі при кімнатній температурі протягом 24 год з наступною кристалізацією з ізопропілового спирту та сушінням продуктів реакції синтезовано сполуки (I-III) (схема 5).

Позитивними рисами описаного методу синтезу є легкість його проведення і простота обробки кінцевих продуктів.

Метод синтезу було перенесено нами на гетероциклічні сполуки 1-[3'-хлор-5'-(трифторметил)-піридин-2'-іл]-піперазин, 1-[2'-піридин-2'-іл-етил]-піперазин, які містять у своєму складі високоосновний атом азоту, що дозволило дослідити реакційну здатність N-заміщених малеїнімідів у наведених реакціях та синтезувати сполуки (IV-VI) (схема6).

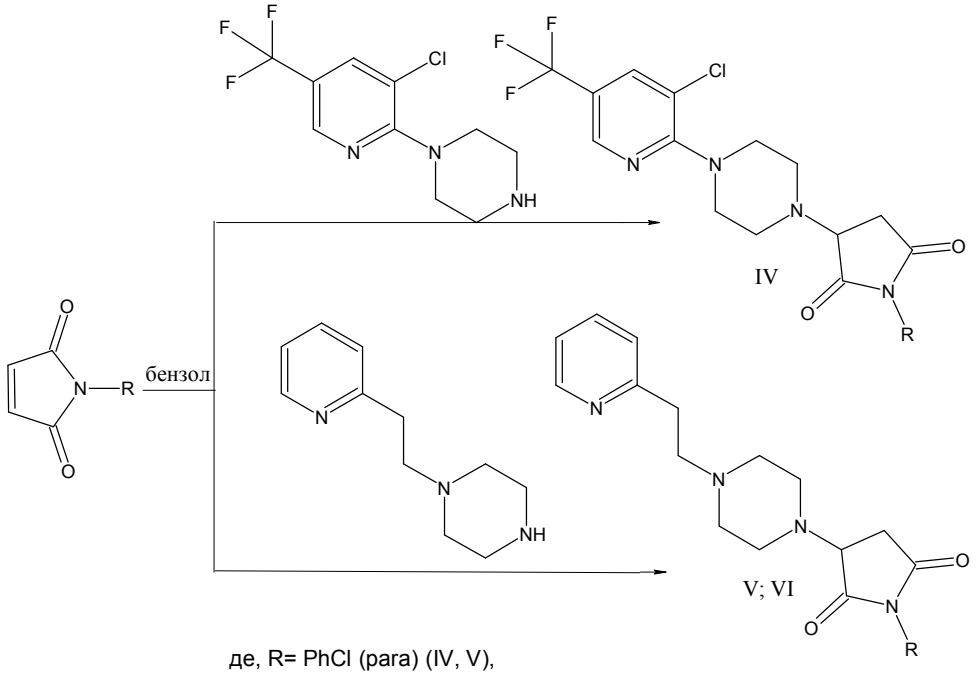
Синтезовані сполуки (I-VI) - це кристалічні порошки від світло-кремового до жовтого забарвлення, кристалізуються з ізопропілового спирту.

УФ-спектри сполук (I-III, V, VI) характеризуються наявністю λ_{max} при 250 нм, тоді як УФ-спектр стандартної речовини (сукциніміду) – наявністю інтенсивної смуги при 207 нм і малоінтенсивної смуги при 243 нм (за рахунок спряження груп C=O, ρ-електронів гетероатома азоту), УФ-спектр сполуки (IV) – максимумами поглинання при 243 і 275 нм. Наявність в молекулі двох ароматичних систем, кільця піперазину і сукциніміду призводить до



де, R= PhCl (para) (I),
R= $PhOCH_3$ (para) (II, III)

Схема 5



де, R= PhCl (para) (IV, V),
R= $PhOCH_3$ (para) (VI)

Схема 6

багатохромного зміщення λ_{max}. Сполука (IV) в УФ-спектрі має дві смуги: інтенсивну – в короткохвильовій ділянці та малоінтенсивну – в довгохвильовій (чотири насичені та ненасичені цикли з гетероатомами і без них, безпосередньо пов'язані між собою).

В ІЧ-спектрах синтезованих сполук (I-VI) спостерігаються в ділянці 600-900 $см^{-1}$ інтенсивні смуги непласких деформаційних коливань С-Н ароматичних кілець, тоді як валентні коливання С-С зв'язків ароматичних ядер при 1585-1600 та 1400-1500 $см^{-1}$ ідентифікувати

неможливо, оскільки дані ділянки спектра близькі до коливань зв'язку C=C, >N–H групи. Деформаційні коливання вторинної аміногрупи молекули сукциніміду дають нехарактеристичні смуги середньої інтенсивності в ділянці 1500-1600 $см^{-1}$, а в ІЧ-спектрах сполук (I-VI) смуги δ_{N-R} спостерігаються в ділянці 1470-1495 $см^{-1}$. Валентні коливання карбонільних груп (C=O) сполук (I-VI) проявляються високоінтенсивним максимумом в ділянці 1680-1750 $см^{-1}$ (дві смуги) і є найбільш характеристичними, тому що інші смуги в даній ділянці практично відсутні. Крім того, в ІЧ-спектрах сполук (I, IV, V) в низькочастотній ділянці спектра можна легко визначити в результаті високої інтенсивності смуги зв'язків C-Cl (530-600 $см^{-1}$) та C-F (1150, 1210 $см^{-1}$) для сполуки (IV), хоча цінність даної ідентифікації обмежена, оскільки про присутність галогенів у молекулі відомо з даних елементного аналізу і якісних реакцій на галоген.

ЯМР^{1}H-спектри сполук (I-VI) мають сигнали у вигляді дублету дублетів при 6,54-8,45 м.д., що відповідає протонам ароматичного кільця або протонам ароматичних фрагментів, сигнал у вигляді дублету або мультиплету при 2,54-3,87 м.д., що відповідає двом протонам молекули сукциніміду в четвертому положенні, сигнал у вигляді триплету в інтервалі 3,44-4,73 м.д., який відповідає протону молекули сукциніміду в третьому положенні.

ЯМР^{1}H-спектри сполук (I, IV-VI) мають характерний сигнал у вигляді синглетів та дублетів при 7,22-8,61 м.д., що відповідає протонам піридинієвого кільця, ЯМР^{1}H-спектр сполуки (II) – характерний сигнал у вигляді мультиплету при 8,5 м.д., що відповідає протонам морфолінового кільця.

Спектральні характеристики синтезованих сполук (I-VI) наведено в таблиці 1, фізико-хімічні характеристики та дані елементного аналізу – в таблиці 2.

Таблиця 1 – **Спектральні характеристики синтезованих сполук (I-VI)**

№ сполуки	УФ-спектр, λ_{max}, нм	ІЧ-спектр (KBr), $см^{-1}$, γ	ЯМР^{1}H-спектр (ДМСО-D_6, $CDCl_3$), ∂ м.д. (J, Гц)
I	250	530-600 (C-Cl), 600-900 (C-H, Ph), 1470, 1495 (>N-R), 1680-1750 (C=O)	1,23 (т., $J^3_{H,H}$ 7,2 Гц, $J^2_{H,H}$ 3,6Гц, CH_3, 3H); 2,45; 3,26 (с.,с., CH_2-CH_2, 4H); 2,6-2,85 (д., Suc., 2H (4 position)); 3,9-4,12 (т., Suc., 1H (3 position)); 7,0-7,65 (д.д., Ph, 4H); 7,5 (с., Py, 4H)
II	250	600-900 (C-H, Ph), 1495 (>N-R), 1680-1750 (C=O)	1,35 (т., $J^3_{H,H}$ 7.2 Гц, $J^2_{H,H}$ 3.6Гц, CH_3, 3H); 3,46 (с.,с.,CH_2-, 2H); 2,57 – 2,65 (д., Suc., 2H (4 position)); 3,55-4,62 (т., Suc.,1H (3 position)); 7,0-7,65 (д.д., Ph, 4H); 8,5 (м., Morf., 8H)
III	250	600-900 (C-H, Ph), 1495 (>N-R), 1680-1750 (C=O)	2,54-2,67 (м., Suc., 2H (4 position)); 3,44-4,52 (т., Suc.,1H (3 position)); 3,7-3,9 (т.д., OCH_3, 3H); 6,88-8,45 (м., Ph, 4H); 8,99-9,75 (м., Cyclohex., 8H); 10,11 (с., NH, 1H)
IV	243, 275	530-600 (C-Cl), 600-900 (C-H, Ph), 1150, 1210 (C-F); 1495 (>N-R), 1680-1750 (C=O)	2,35-3,25 (м., Pyperaz., 8H); 2,6-3,85 (д., Suc., 2H (4 position)); 3,9-4,3 (т., Suc., 1H (3 position)); 7,0-7,65 (д.д., Ph, 4H); 7,5-8,6 (д., с., Py, 2H)
V	250	530-600 (C-Cl), 600-900 (C-H, Ph), 1495 (>N-R), 1680-1750 (C=O)	2,03-3,24 (м., Pyperaz., 8H); 2,77; 3,87 (д., д., Suc., 2H (4 position)); 4,72 (т., Suc., 1H (3 position)); 5,66-6,89 (м.,CH_2-CH_2-, 4H), 6,54-7,35 (д.д., Ph, 4H); 7,22; 7,45; 8, 53; 8,5 9 (д., д., д., д., Py, 4H)
VI	250	600-900 (C-H, Ph), 1495 (>N-R), 1680-1750 (C=O)	2,15-3,21 (м., Pyperaz., 8H); 2,79 (д., Suc., 2H (4 position)); 4,61 (с., OCH_3, 3H); 4,73 (т., Suc., 1H (3 position)), 6,54-7,36 (д.д., Ph, 4H); 7,23; 7,40; 8,43; 8,61 (д., д., д., д., Py, 4H)

ВИСНОВКИ. 1. Розроблено ефективний метод синтезу нових N-заміщених гетероциклічних сукцинімідів шляхом взаємодії N-заміщених малеїнімідів з 1-[3'-хлор-5'-(трифторметил)-піридин-2'-іл]-піперазином, 1-[2'-піридин-2'-іл-етил]-піперазином, N-метил-N-[2'-морфолін-4'-іл-оксоетил]-аміном, N-метил-N-[2'-піридин-2'-іл-етил]-аміном, [(4'-оксо-3',4',5',6',7',8'-гексагідро-[1"]-бензотієно-[2",3"-d]-2'-іл)тіо]-піримідином у молярному співвідношенні 1:1, в бензолі або ацетонітрилі за кімнатної температури при витримуванні реакційної суміші протягом

Таблиця 2 – **Фізико-хімічні характеристики та дані елементного аналізу синтезованих сполук (I-VI)**

№ сполуки	Знайдено, % C H N	Брутто-формула	Обчислено, %, C H N	Т.топл., ^{O}C	Практичний вихід, %
I	62,93; 5,18; 12,15	$C_{18}H_{18}N_3O_2Cl$	62,88; 5,27; 12,22	133-136	58
II	59,87; 6,38; 11,59	$C_{18}H_{23}N_3O_5$	59,82; 6,41; 11,63	140-143	52
III	57,22; 4,28; 9,46	$C_{21}H_{19}N_3O_4S_2$	57,1; 4,34; 9,52	180-183	64
IV	50,63; 3,68; 11,88	$C_{20}H_{17}N_4O_2Cl_2F_3$	50,75; 3,62; 11,84	164-167	70
V	63,18; 5,79; 14,1	$C_{21}H_{23}N_4O_2Cl$	63,23; 5,81; 14,0	169-171	68
VI	67,16; 6,55; 14,1	$C_{22}H_{26}N_4O_3$	67,26; 6,64; 14,2	165-167	40

24 год з наступною кристалізацією та сушінням отриманих продуктів реакції.

2. Варіювання умов проведення реакцій та внесення змін до методики синтезу (кристалізація з ізопропілового спирту та промивання залишку – осаду під час фільтрування у вакуумі сухим гексаном) дозволили отримати синтезовані сполуки (I-VI) високої чистоти та збільшити їх практичний вихід до 70 %.

3. Будову синтезованих сполук (I-VI) підтверджено даними елементного аналізу, УФ-, ІЧ-, ЯМР^{1}Н-спектроскопії, а індивідуальність – методами тонкошарової та газорідинної хроматографії.

4. Можна прогнозувати, що синтезовані сполуки (I-VI) – сукциніміди, які містять в молекулах складні полігетероциклічні системи, зокрема фармакофори: піридин-піперазинові, бензотієнотіопіримідинові, морфолінові фрагменти, спряжену систему, є перспективними для подальшого вивчення як сполуки з потенційною біологічною активністю.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пат. 18096 Україна. МПК C07D239/553, A61K33/16.C07C 21/00. Сполуки N-пара-бромфеніл-3-(уридин-5'-аміно)-сукцинімід та N-пара-бромфеніл-3-(уридин-6'-аміно)-сукцинімід з потенційними фізіологічними властивостями / Губський Ю.І., Вельчинська О.В. (Україна); Заявл. 24.05.06; Опубл. 16.10.06, Бюл. № 10. – 8 с.

2. Пат. 18825 Україна. МПК C07D239/553, A61K33/16.C07C 21/00. Сполуки N-феніл-3-(уридин-2'-тіо-4'-гідроксі-6'-аміно) сукцинімід та N-пара-метоксифеніл-3-(уридин-2'-тіо-4'-гідроксі-6'-аміно) сукцинімід з потенційними фізіологічними властивостями / Губський Ю.І., Вельчинська О.В. (Україна); Заявл. 09.06.06; Опубл. 15.11.06, Бюл. № 11. – 8 с.

3. Amagat P. Thermal cycloaddition of maleimides to bicyclic reagents // Traite de Chemie Organique. – 1941. – **13**. – P. 502-521.

4. Balasubramaniyan V., Balasubramaniyan P., Shaikh A.S. Reactions of o-aminothiophenol with α, β-unsaturated dicarbonyc systems, facile synthesis of benzothiazines and benzothiazepines // Tetrahedron. – 1986. – 42 (10). – P. 2731-2738.

5. Bryce-Smith Derek, Gilbert Andrew, McColl Ian S. et al. Thermal cycloaddition of N-arylmaleimides to phenols: the convenient synthesis of bicyclo[2.2.2]oct-2-en-5-one and tricyclo[3.3.0.0 ^{2,8}]octan-2-one derivatives from phenols // J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. –1987. – P. 1147-1151.

6. Cooney David A., Milman Harry A., Cable Ritchard G. Maleimide - biochemical, pharmacological and toxicologic studies. Interaction with L-asparagine metabolism // Biochem. Pharmacol. – 1978. – 27 (2). – P. 151-166.

7. Hargreaves M.K., Pritchard J.G., Dave H.R. Cyclic carboxylic monoimides // Chem. Reviews. – 1970. – **70**, № 4. – P. 439-468.

8. Magid Abou-Gharbia, Usha R. Patel et al. Polycyclic aryl- and heteroarylpiperazinyl imides as 5-HT_{1A} receptor ligands and potential anxiolytic agents: synthesis and structure-activity relationship studies // J. Med. Chem. – 1988. – **31**, № 7. – P. 1382-1385.

9. Richards M.N. (Merrel D., Res. Inst. 67084, Strasbourg, Fr.). Relative potencies of agonists and differential sensitivity to N-ethylmaleimide on muscarinic auto receptors and postsynaptic receptors in rat hippocampus // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1990. – 255 (1). – P. 83-89.

СИНТЕЗ И ИССЛЕДОВАНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВЫХ N-ЗАМЕЩЕННЫХ СУКЦИНИМИДОВ С ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Ю.И. Губский, Е.В. Вельчинская, А.В. Скибюк, А.С. Кобко[1]
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. А.А. БОГОМОЛЬЦА, КИЕВ
ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАН УКРАИНЫ[1], КИЕВ

Резюме

Осуществлен синтез производных N-замещенных полигетероциклических сукцинимидов с пиридин-пиперазиновыми, бензотиенотиопиримидиновыми и морфолиновыми фрагментами в составе молекул, изучены их физико-химические свойства. Строение синтезированных соединений подтверждено данными элементного анализа, УФ-, ИК- и ЯМР^{1}Н-спектров. Чистоту контролировали методами тонкослойной и газожидкостной хроматографии. Синтезированные фармакофорсодержащие сукцинимиды являются перспективными для дальнейшего изучения как соединения потенциально биологически активные.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **малеинимид, сукцинимид, синтез, противосудорожная активность.**

SYNTHESIS AND RESEARCH OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF NEW N-SUBSTITUTED SUCCINIMIDES WITH POTENTIAL BIOLOGICAL ACTIVITY

Yu.I. Hubsky, O.V. Velchynska, H.V. Skybyuk, O.S. Kobko[1]
NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY O.O. BOHOMOLETS, KYIV
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE[1], KYIV

Summary

Synthesis of derivatives of N-substituted polyheterocyclic succinimides with pyridino-piperazinic, benzothienothiopyrimidinic and morpholinic fragments in molecules has been performed and their physical and chemical properties have been studied. The structure of synthesized compounds has been confirmed by data of elemental analysis, UV-, IR- and NMR^{1}H-spectra. The purity has been tested by method of thin-layer and gas-liquid chromatography. The synthesized succinimides with pharmacophores are perspective for their future investigations as potential biological active compounds.

KEY WORDS: **maleinimide, succinimide, synthesis, anticonvulsant activity.**

Отримано 8.09.2008 р.

Адреса для листування: *О.В. Вельчинська, вул. Анни Ахматової, 16 "Г", кв. 14, Київ-068, 02068, Україна.*

УДК 612.118.221.3:546.284-31

ПОРІВНЯННЯ МЕМБРАНОТРОПНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СИЛІКСУ Й ЕНТЕРОСГЕЛЮ

І.І. Геращенко, В.М. Гунько, О.В. Ніцак
ІНСТИТУТ ХІМІЇ ПОВЕРХНІ ІМ. О.О. ЧУЙКА НАН УКРАЇНИ, КИЇВ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

Як один з етапів вивчення біосумісності нанодисперсних матеріалів розглянуто адсорбційну взаємодію силіксу й ентеросгелю з еритроцитами людини, епітеліоцитами кишечника щурів та деякими штамами мікроорганізмів. Показано, що гідрофільний силікс активно акцептується поверхнею клітин, що спричиняє гемоліз in vitro, модифікацію мембран епітеліоцитів та аглютинацію мікроорганізмів. Для гідрофільно-гідрофобного ентеросгелю ефекти відносно еритроцитів та епітеліоцитів не характерні, а адсорбція мікроорганізмів виражена набагато слабше. Введення до реакційного середовища білка або водорозчинних полімерів блокує центри поверхні силіксу, відповідальні за гемолітичну дію.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **адсорбція, силікс, ентеросгель, біосумісність, мембрани, еритроцити, епітеліоцити, мікроорганізми.**

ВСТУП. У зв'язку із значним розповсюдженням сорбційних технологій та впровадженням сорбентів у медичну практику постає питання біосумісності цих матеріалів, тобто відсутності негативних наслідків контакту поверхні сорбенту зі структурами організму. Такими наслідками можуть бути некроз, запалення, алергічна або імунна реакція та інші відповіді на рівні клітини й організму в цілому. Проблема біосумісності є актуальною для нанодисперсних матеріалів, які мають значну питому поверхню і тому характеризуються великою площею контакту з біофазою. На нашу думку, системний підхід щодо вивчення біосумісності полягає у послідовному дослідженні взаємодії матеріалу з мікро- та макроструктурами організму (табл. 1). Дослідження мембранотропних властивостей, тобто взаємодії наночастинок з поверхневими структурами клітини, є перехідною ланкою, яка поєднує фізико-хімічне вивчення з медико-біологічною апробацією нових медичних сорбентів [1-10].

У 80-90-х роках минулого століття майже одночасно пройшли повний цикл випробувань і були впроваджені у клінічну практику два сорбенти – *силікс (полісорб МП)* та *ентеросгель,* які відносять до синтетичних сорбентів на основі нанокремнезему і поліметилсилоксану відповідно [6, 10]. Непористі наночастинки силіксу можна представити об'ємним полімером $(SiO_2)_\infty$, де $n=10^4$-10^5; поверхня частинок має гідроксильні групи (0,6-0,9 ммоль/г),

Таблиця 1 – **Системний підхід щодо вивчення впливу нанодисперсних матеріалів на біологічні об'єкти**

Структурний рівень	Етапи дослідження	Методи дослідження
I. Біомолекули	1. Визначення параметрів адсорбції	Фізико-хімічні
	2. Вивчення впливу на структуру та функції біомолекул (наприклад, на активність ферментів)	Фізико-хімічні
II. Клітина	3. Вивчення мембранотропних властивостей: ступеня ушкодження мембран, впливу на трансмембранний транспорт речовин та активність мембранних ферментів тощо	Фізико-хімічні, морфологічні
	4. Вивчення впливу на функції клітини (індукція некрозу або апоптозу, прискорення або гальмування ділення клітини)	Цитологічні
III. Організм	5. Вивчення впливу на функції окремих органів і систем та організму в цілому	Біохімічні, імунологічні, клінічні

© І.І. Геращенко, В.М. Гунько, О.В. Ніцак, 2009.

які надають препарату високу гідрофільність і білоксорбуючу активність та здатність зв'язувати мікроорганізми [6]. Ентеросгель є гідрогелем поліконденсованої метилкремнієвої кислоти із загальною формулою $(CH_3SiO_{1,5} \cdot mH_2O)_\infty$, де m=30-46. Ентеросгель має глобулярну структуру. На поверхні глобул розташовані групи $-CH_3$ і незначна кількість гідроксильних груп, що надає препарату гідрофільно-гідрофобні властивості [2]. У зв'язку з неухильним зростанням попиту на ці сорбенти і можливим розширенням показань до застосування постає питання поглибленого вивчення їх властивостей.

Метою роботи було провести порівняльну характеристику мембранотропних властивостей силіксу та ентеросгелю і намітити шляхи модифікації поверхні сорбентів для підвищення біосумісності.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом вивчення обрано еритроцити людини, епітеліоцити травного тракту щурів, а також одноклітинні мікроорганізми – представники патогенної мікрофлори. В роботі використано результати власних досліджень та літературні джерела інформації.

Гемолітичну дію сорбентів вивчали за допомогою стандартизованого гемоліз-тесту [3]. Еритроцитарну масу, одержану з крові здорового донора, кілька разів відмивали холодним фізіологічним розчином, після чого готували завись еритроцитів на ізотонічному фосфатному буфері (PBS), pH 7,4, яка містила приблизно 10^8 клітин на 1 мл. Для підрахунку кількості еритроцитів використовували камеру Горяєва. Силікс і ентеросгель (0,01 мас.%) диспергували у PBS за допомогою ультразвукового диспергатора. До 3 мл одержаної суспензії додавали 0,1 мл зависі еритроцитів, витримували певний час, а потім центрифугували 10 хв при 1000 об./хв. Вимірювали оптичну густину (D) залишкової рідини при λ=405 нм, після чого розраховували ступінь гемолізу $D/D_{max} \cdot 100$ %, де D_{max} – оптична густина лізату, утвореного в результаті внесення еритроцитів у дистильовану воду.

Зміну форми еритроцитів вивчали у динаміці за допомогою проточного цитофлуориметра "FACStar Plus", Becton Dickinson (аргоновий лазер, λ=488 нм).

Для мікроскопічного дослідження тонку кишку щурів, за однією методикою, фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну, заливали целоїдином та фарбували гематоксилін-еозином [8], за іншою – препарати кишечника фіксували глутаровим альдегідом, інкубували у розчині оксиду осмію та контрастували 1 % таніновою кислотою; після обробки спиртом та заливання в епоксидну смолу фарбували метиленовим синім [7].

Для вивчення адсорбційної взаємодії сорбентів з поверхнею мікробних тіл добову культуру мікроорганізмів змішували з певною кількістю сорбенту. У випадку силіксу одержану суспензію через 2-3 хв фільтрували [4], а у дослідах з ентеросгелем в інтервалі 1-12 год відбирали надосадову рідину [9]. Рідину висівали на поживне середовище і після 24 год інкубації підраховували число колоній, яке відповідало кількості незв'язаних бактерій.

У порівняльному тестуванні експозиція суспензій силіксу та ентеросгелю з добовими культурами мікроорганізмів становила 1 год. Після цього у флакони додатково вносили по 8 мл стерильного 0,9 % розчину NaCl, перемішували 10 хв і центрифугували. Шляхом посіву серійних десятикратних розведень супернатанту визначали титр незв'язаних мікроорганізмів.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.

Взаємодія з еритроцитами. Відомо, що контакт еритроцитів з колоїдним кремнеземом призводить до гемолізу, інтенсивність якого залежить від фізико-хімічних властивостей матеріалу – розміру частинок, хімічного складу та заряду поверхні, а також від стану мембран еритроцитів. Механізм гемолізу може включати електростатичне тяжіння між від'ємно зарядженими частинками SiO_2 та позитивно зарядженими четвертинними атомами азоту в складі мембранних фосфоліпідів; взаємодію з мембранними білками; активацію процесу перекисного окиснення мембранних ліпідів під впливом гідроксильних радикалів та пероксиду водню, індукованих поверхнею кремнезему [4].

Суспензія силіксу проявляє значну гемолітичну активність (табл. 2) і характерне збільшення ступеня гемолізу з часом, що можна пов'язати з морфологічною неоднорідністю еритроцитів у даній пробі [5, 11] та впливом дифузійного фактора. Взаємодія між ентеросгелем і мембранами еритроцитів, з огляду на результати гемоліз-тесту, цілком відсутня (табл. 2).

Мембраноушкоджувальну дію силіксу можна пояснити насамперед наявністю гідроксильного покриву частинок: після блокування гідроксильних груп мінімальною кількістю білка або водорозчинними полімерами – полівінілпіролідоном, полівініловим спиртом або поліетиленоксидом – гемолітичний ефект зникає [1, 3]. Це доводить, що ключовою ланкою в механізмі мембранолізису є взаємодія поверхневих ОН-груп з мембранними білками. Поверхня глобул ентеросгелю містить незнач-

Таблиця 2 – **Результати гемоліз-тесту**

Препарат	Ступінь гемолізу, %, через				Адсорбція білка, мг/г	
	10 хв	20 хв	40 хв	60 хв	желатини	САЛ *)
Суспензія силіксу	71	73	80	90	293	312
Суспензія силіксу + 0,005 % САЛ*)	0	0	0	0,3	...	...
Суспензія ентеросгелю	0	0	0	0	310	192

Примітка. *) САЛ – сироватковий альбумін людини.

ну кількість ОН-груп, тому гемолітична дія практично відсутня. З іншого боку, ентеросгель ненабагато поступається силіксу за здатністю сорбувати білок. Очевидно, в механізмі адсорбції білка ентеросгелем переважають дисперсійні взаємодії, які не здатні викликати гемоліз.

За даними проточної цитометрії, після внесення еритроцитів у суспензію силіксу спостерігається швидке, протягом 1-2 хв, зростання інтенсивності прямого світлорозсіювання, що можна пояснити збільшенням об'єму клітин у зв'язку з переходом у сферичну форму. Протягом наступних 20-30 хв відбувається зменшення популяції сфероцитів в результаті гемолізу (рис. 1).

Взаємодія з епітеліальними клітинами кишечника. Після курсового введення силіксу в окремих щурів встановлено певні зміни в епітелії кишечника, які залежать від тривалості введення та дози сорбенту [8]. Так, при терміні 10-20 днів і дозах 330 та 1000 мг/кг у трьох щурів з восьми у слизовій оболонці тонкої кишки епітелій верхньої частини ворсинок зруйнований і десквамований у просвіт кишки, серед епітеліоцитів зустрічаються клітини з темною базофільною цитоплазмою. При терміні 30 днів і дозі 1000 мг/кг морфологічні відхилення стають більш вираженими. За даними [7], тривале введення силіксу в терапевтичній дозі 100 мг/кг суттєво не змінює рельєф слизової тонкої кишки щурів. При застосуванні силіксу в дозі 1000 мг/кг спостерігаються помірне укорочення ворсинок і зменшення відстані між ними, вірогідно збільшується

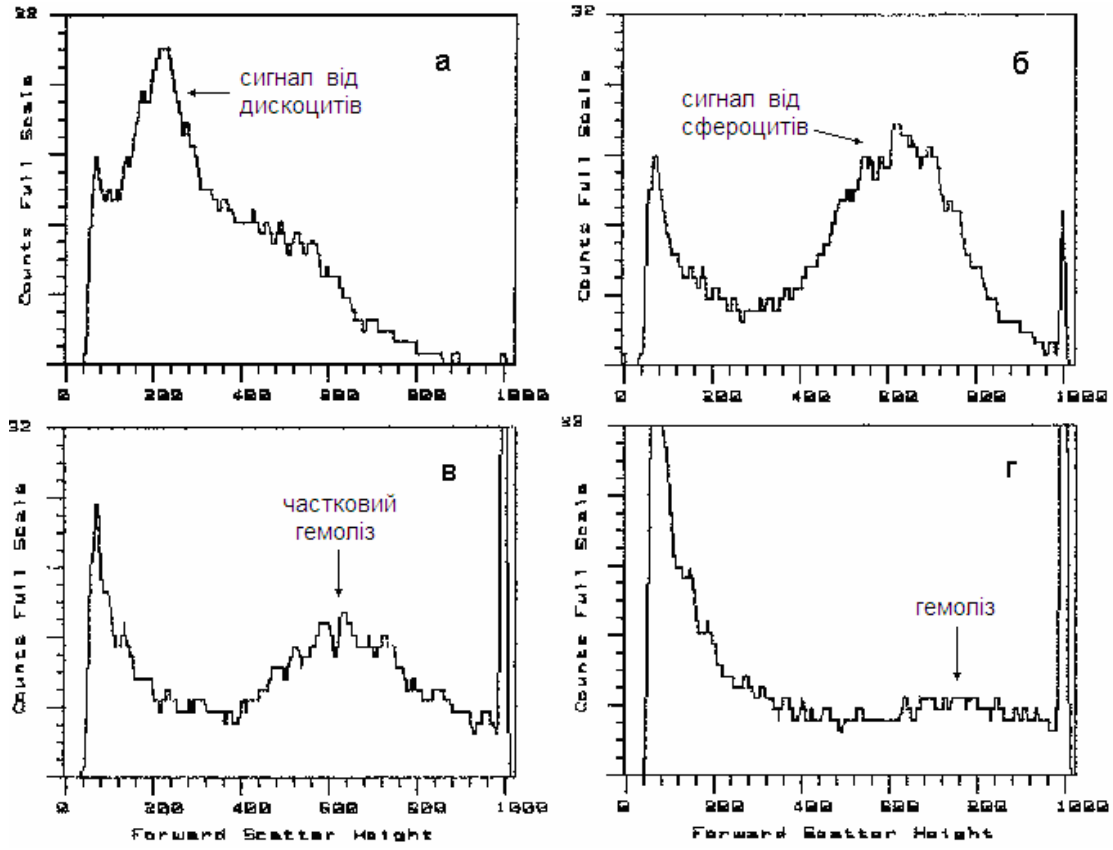


Рис. 1. Гістограми інтенсивностей прямого світлорозсіювання еритроцитів після контакту із суспензією силіксу: а – вихідні еритроцити; б – через 1-2 хв після контакту; в – через 5 хв; г – через 20 хв. Вісь абсцис – інтенсивність (ум. од.), вісь ординат – кількість сигналів.

кількість бокалоподібних клітин, що продукують слиз, який формує захисний шар. Вважається, що ці відхилення не мають патологічного характеру і є адаптаційною реакцією кишечника на зміну складу хімусу. Із тропністю гідрофільного силіксу до епітеліальних клітин кишечника можна пов'язати такі ефекти: 1) слизова оболонка кишечника є непереборним бар'єром для проникнення наночастинок сорбенту у внутрішнє середовище організму; 2) силікс блокує рецептори слизової, відповідальні за адгезію мікроорганізмів і зв'язування токсинів (один з механізмів антидіарейної дії); 3) адсорбційна модифікація слизової сприяє прискореному всмоктуванню препаратів інших фармакологічних груп, введених разом із силіксом [6].

На відміну від гідрофільних сорбентів ентеросгель практично не взаємодіє з клітинами епітелію. У роботі [2] наведено мікрофото, на якому показано розташування окремої частинки ентеросгелю на поверхні слизової оболонки шлунка щура: з точки зору фізикохімії поверхневих явищ цей ефект можна охарактеризувати як відсутність адгезії.

Адсорбційна взаємодія з мікроорганізмами. У таблиці 3 представлені дані про зв'язування патогенної мікрофлори силіксом [4] та ентеросгелем [9]; з метою порівняння наведені результати для однакового мікробного навантаження – 10^9 КУО/мл. Як видно, силіксу достатньо кількох хвилин для зв'язування практично всіх мікроорганізмів. Про швидкість адсорбції мікроорганізмів ентеросгелем судити важко, проте, з огляду на час експозиції, можна припустити, що цей процес у випадку ентеросгелю відбувається повільніше, що пов'язано з іншою морфологією частинок ентеросгелю, ніж силіксу [12].

За нашими даними, силікс ефективно адсорбує культури *P. vulgaris* і *C. Albicans,* проте здатність до зв'язування ешерихій виявилась меншою (табл. 4). Ентеросгель адсорбує лише *S. aureus* та *C. albicans*, при цьому показники адсорбції в обох випадках були доволі низькими (табл. 4). Взаємодія силіксу з мікробними клітинами пов'язана зі спорідненістю до глікопротеїдних структур і фосфоліпідів мембран, а також до розташованих на поверхні клітин рецепторів, ферментів та інших структур білкової природи. Різницю в адсорбції мікроорганізмів можна пояснити відмінностями у фізико-хімічних властивостях поверхні бактерій, таких, як значення ізоелектричної точки, густина поверхневого заряду, вміст білка у протеїнгліканновому компоненті тощо. Адсорбція наночастинок силіксу на поверхні бактерій призводить до аглютинації, що може бути як наслідком нейтралізації поверхневого заряду бактерій, так і результатом їх безпосереднього "склеювання" силіксом. Аглютинація ускладнює проникнення бактерій у тканини, втрачаються оптимальні умови для життєдіяльності й зменшується продукція екзотоксинів. Таким чином, силікс, порівняно з ентеросгелем, ефективніше обмежує патогенність мікроорганізмів, не проявляючи при цьому прямої бактерицидної дії.

Таблиця 3 – **Адсорбція мікроорганізмів силіксом та ентеросгелем (мікробне навантаження – 10^9 КУО/мл) за даними [4, 9]**

Препарат	Концентрація препарату, мг/мл	Експозиція	Повнота зв'язування, %		
			Staph. aureus	*Escherichia coli*	*Pseudomonas aeruginosa*
Силікс	6,6	2-3 хв	99,5	99,14	99,5
	13,3	- « -	99,9	99,93	99,9
Ентеросгель	9 - 15	6 год	100	100	100

Таблиця 4 – **Адсорбційна активність (у %, M±m) силіксу та ентеросгелю відносно тест-культур, власні дані**

Препарат	*Staph. aureus,* n=4	*Escherichia coli,* n=4	*Proteus vulgaris,* n=4	*Candida albicans,* n=4
Силікс	75,9±1,3	45,5±8,0	98,2±0,5	98,7±0,5
Ентеросгель	6,1±3,5	не адсорбує	не адсорбує	19,1±11,0

ВИСНОВКИ. 1. Гідрофільний силікс активно акцептується поверхнею клітин, що спричиняє гемоліз *in vitro*, модифікацію мембран епітеліоцитів кишечника *in vivo* та аглютинацію мікроорганізмів.

2. Гідрофільно-гідрофобний ентеросгель практично не взаємодіє з мембранами еритроцитів та епітеліоцитів. Мікроорганізми зв'язуються ентеросгелем набагато слабше, ніж силіксом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андрійко Л.С., Габчак О.Л., Зарко В.І. та ін. Дослідження взаємодії еритроцитів з поверхнею ентеросорбенту “Силікс”, модифікованою водорозчинними полімерами // Фармац. журн. – 2007. – № 1. – С. 83-87.

2. Біосорбційні методи і препарати в профілактичній та лікувальній практиці // Зб. наук. праць 1-ї наук.-практ. конф., 13-14 лютого 1997 р. – Київ, 1997. – 216 с.

3. Гацький О.О., Геращенко І.І., Луцюк М.Б. Вивчення гемолітичних властивостей високодисперсного кремнезему та його модифікованих форм in vitro // Вісник морфології. – 2004. – **10**, № 2. – С. 257-260.

4. Геращенко И.И., Штатько Е.И., Бондарчук О.И., Чуйко Н.А. Мембранотропные свойства силикса // В кн.: Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. – К.: Наукова думка, 2003. – С. 168-179.

5. Геращенко І.І., Гунько В.М., Гацький О.О. Кількісний опис взаємодії нанорозмірного кремнезему з еритроцитами // Мед. хімія. – 2007. – **9**, № 2. – С. 99-102.

6. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Под ред. А.А. Чуйко. – К.: Наукова думка, 2003. – 416 с.

7. Пентюк А.А., Луцюк Н.Б. Токсикологические исследования силикса // В кн.: Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. – К.: Наукова думка, 2003. – С. 180-202.

8. Пискун Р.П., Однорогов Ю.В. Морфологическая характеристика внутренних органов крыс, получавших полисорб // В кн.: Кремнеземы в медицине и биологии / Под ред. А.А.Чуйко. – Киев–Ставрополь, 1993. – С. 112-115.

9. Руденко А.В., Багдасарова И.В., Брудько А.П. Сорбционное действие Энтеросгеля в отношении различных видов микроорганизмов // Провизор. – 2005. – № 10. – С. 42-43.

10. Шевченко Ю.М., Слинякова І.Б., Яшина Н.І. Нові біокремнійорганічні пористі сорбенти для медицини // Фармац. журн. – 1995. – № 6. – С.80-85.

11. Gerashchenko B.I. Short note: Heterogeneous response of red blood cells to colloidal silica as a criterion for study of their membrane alterations: flow cytometric approach // Med. Hypotheses. – 1998. – **51**. – P. 355-357.

12. Gun’ko V.M., Turov V.V., Zarko V.I. et al. Comparative characterization of polymethylsiloxane hydrogel and silylated fumed silica and silica gel // J. Colloid Interface Sci. – 2007. – **308**. – P. 142-156.

СРАВНЕНИЕ МЕМБРАНОТРОПНЫХ СВОЙСТВ СИЛИКСА И ЭНТЕРОСГЕЛЯ

И.И. Геращенко, В.М. Гунько, О.В. Ницак
ИНСТИТУТ ХИМИИ ПОВЕРХНОСТИ ИМ. А.А. ЧУЙКО НАН УКРАИНЫ, КИЕВ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. А.А. БОГОМОЛЬЦА

Резюме

Как один с этапов изучения биосовместимости наноматериалов рассмотрено адсорбционное взаимодействие силикса и энтеросгеля с эритроцитами человека, эпителиоцитами кишечника крыс и отдельными штаммами микроорганизмов. Показано, что гидрофильный силикс активно акцептируется с поверхностью клеток, что вызывает гемолиз in vitro, модификацию мембран эпителиоцитов и агглютинацию микроорганизмов. Для гидрофильно-гидрофобного энтеросгеля эффекты относительно эритроцитов и эпителиоцитов не характерны, а адсорбция микроорганизмов выражена намного слабее. Введение в реакционную среду белка или растворимых полимеров блокирует центры поверхности силикса, ответственные за гемолитическое действие.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **адсорбция, силикс, энтеросгель, биосовместимость, мембраны, эритроциты, эпителиоциты, микроорганизмы.**

COMPARISON OF MEMBRANOTROPIC PROPERTIES OF SILICS AND ENTEROSGEL

I.I. Herashchenko, V.M. Hunko, O.V. Nitsak
INSTITUTE OF SURFACE CHEMISTRY BY O.O. CHUYKO OF NAS OF UKRAINE, KYIV
NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY O.O. BOHOMOLETS

Summary

As a stage of a study of biocompatibility of nanomaterials the interaction of silics and enterosgel with human erythrocytes, intestinal epitheliocytes of rats and some types of microorganisms is considered. Hydrophilic silics actively fixed by a cell surface causes hemolysis in vitro, modification of membranes of epitheliocytes and agglutination of microorganisms. The hydrophilic-hydrophobic enterosgel does not affect erythrocytes and epitheliocytes and adsorbs the microorganisms much worse than silics. Addition of some amounts of protein or soluble polymers could block active surface sites of silics which are responsible for the hemolytic effect.

KEY WORDS: **adsorption, silics, enterosgel, biocompatibility, membranes, erythrocytes, epithelhiocytes, microorganisms.**

Отримано 23.09.2008 р.

Адреса для листування: *І.І. Геращенко, вул. Ентузіастів, 35/1, кв. 14, Київ, 02154, Україна.*

УДК 616.37-002-036.11-085-06:616.36+616.61]-092.9

СТАН ПЕЧІНКИ І НИРОК ПРИ ГОСТРОМУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ПАНКРЕАТИТІ ТА ЗАСТОСУВАННІ ПРЕПАРАТУ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ

К.А. Посохова, О.З. Яремчук
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Вивчено патогенетичні ланки ураження печінки та нирок при гострому експериментальному панкреатиті. Встановлено, що рексод (препарат супероксиддисмутази) при його профілактичному введенні перед моделюванням гострого панкреатиту сприяє зменшенню ступеня ураження підшлункової залози, відновленню біохімічних показників, які відображають стан системи прооксиданти-антиоксиданти та мітохондріального транспорту електронів у печінці та нирках, активності маркерних ферментів цитолізу та холестазу, вмісту креатиніну та сечовини у сироватці крові.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **експериментальний панкреатит, печінка, нирки, СОДrec.**

ВСТУП. На сьогодні гострий панкреатит займає одне з перших місць серед гострих захворювань органів черевної порожнини, характеризується особливою тяжкістю ускладнень та високим рівнем летальності, зокрема при деструктивних формах [7, 13]. Перебіг даної патології може суттєво обтяжуватись при ураженні внутрішніх органів, яке завдячує утворенню токсичних, високореакційноспроможних сполук, зокрема вільних радикалів кисню. Одним з таких чинників є пероксинітрит (NOO^-), який утворюється при взаємодії оксиду азоту (NO) та супероксидного аніона (O_2^-) [7, 12, 19, 20]. Таким чином, ризик надмірної продукції NOO^- зростає при збільшеному утворенні NO та O_2^-. Зважаючи на те, що у фізіологічних умовах знешкодження O_2^- відбувається з участю супероксиддисмутази [12, 18], підґрунтям для прискорення утворення токсичного NOO^- може бути недостатня активність даного ферменту [14, 19].

Метою даного дослідження було з'ясування впливу перехоплювача супероксиданіон-радикала – препарату рексоду (СОДrec) на стан печінки та нирок при гострому експериментальному панкреатиті.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на нелінійних щурах-самцях масою 170-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Піддослідних тварин розділили на 3 групи: 1-ша (контроль) – несправжньооперовані тварини, яким проводили серединну лапаротомію; 2-га (контрольна патологія) – тварини з гострим панкреатитом (ГП), який моделювали за методом С.О. Шалімова [11] шляхом локального заморожування обох поверхонь підшлункової залози хлоретилом; 3-тя – тварини, яким перед моделюванням ГП щоденно протягом 7 днів та через 12 год після вводили внутрішньоочеревинно СОДrec (0,05 мг/кг маси тіла) [3]. Через 48 год після моделювання патології щурів виводили з експерименту в умовах тіопентал-натрієвого наркозу. Визначали: у сироватці крові – вміст α-амілази, сечовини, креатиніну, активність лужної фосфатази, АлАТ, АсАТ (за стандартними наборами ООО НПП "Филисит диагностика", Україна), вміст церулоплазміну [5]; у гомогенатах тканин нирок та печінки – вміст гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) [2], ТБК-активних продуктів (ТБП) [1], відновленого глутатіону (G-SH) [15], активність супероксиддисмутази (СОД) [10], каталази (КАТ) [6], сукцинатдегідрогенази (СДГ) [4], цитохромоксидази (ЦХО) [8]. Про вміст NO у гомогенатах органів робили висновок за кількістю його стабільного метаболіту нітрит-аніона (NO_2^-) [17].

Дослідження виконували відповідно до принципів Європейської конвенції із захисту лабораторних тварин [16]. Статистичну обробку результатів досліджень проводили, використовуючи t-критерій Стьюдента, за допомогою програми Excell.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Встановлено, що при ГП у сироватці крові спостерігалось підвищення активності α-амілази у 7 разів, що підтверджує адекватність обраної моделі ГП, оскільки цей фермент є маркером даної патології (табл. 1) [5]. Одночасно у го-

© К.А. Посохова, О.З. Яремчук, 2009.

могенатах печінки та нирок піддослідних тварин відбувалось зростання вмісту NO_2^- – на 12 і 123 % відповідно (табл. 2). Вказані зміни супроводжувались активацією вільнорадикальних процесів у досліджуваних органах. Зокрема, у печінці вміст ГПЛ зростав на 107 %, ТБП – на 68 %. Про розвиток процесів цитолізу в печінці свідчило збільшення у сироватці крові активності АлАТ – на 20 % та АсАТ – на 91 %. Активність маркерного ферменту цитолізу лужної фосфатази підвищувалась у 2,8 раза. Одночасно у печінці спостерігалось достовірне зниження активності антиоксидантних ферментів порівняно з контрольною групою: СОД – на 59 % і КАТ – на 40 %. Проте вміст церулоплазміну в крові зростав на 68 %. Відбувалось виснаження в печінці пулу G-SH, кількість якого зменшувалась на 39 %.

Таблиця 1 – **Біохімічні показники сироватки крові при гострому експериментальному панкреатиті та введенні СОДrec (M±m, n=6)**

Показники	Групи тварин		
	контроль	ГП	ГП+СОДrec
АлАТ, ммоль/(год·л)	4,19±0,09	5,02±0,11 p<0,001	3,48±0,08 p<0,001
АсАТ, ммоль/(год·л)	10,66±0,41	20,33±0,61 p<0,001	18,54±0,20 p<0,05
Амілаза, мг/(с·л)	18,57±0,56	136,33±3,99 p<0,001	94,67±4,41 p<0,001
Сечовина, ммоль/л	5,53±0,41	6,55±0,11 p<0,05	3,27±0,18 p<0,001
Креатинін, мкмоль/л	73,00±1,55	83,83±1,07 p<0,001	71,00±1,26 p<0,001
Лужна фосфатаза, ммоль/(год·л)	16,81±1,30	47,08±2,62 p<0,001	30,12±0,73 p<0,001
Церулоплазмін, г/л	0,21±0,02	0,35±0,01 p<0,001	0,31±0,01 p<0,01

Таблиця 2 – **Показники системи прооксиданти-антиоксиданти та активності ферментів мітохондрій у печінці й нирках при гострому експериментальному панкреатиті та введенні СОДrec (M±m, n=6)**

Показники	Групи тварин					
	контроль		ГП		ГП+СОДrec	
	печінка	нирки	печінка	нирки	печінка	нирки
КАТ, кат/кг	10,66±0,66	7,34±0,39	6,44±0,28 p<0,001	4,76±0,12 p<0,01	9,59±0,23 p<0,001	5,76±0,35 p<0,05
СОД, ум.од./кг	3,57±0,07	2,28±0,1	1,46±0,08 p<0,001	1,67±0,10 p<0,005	3,00±0,05 p<0,001	1,82±0,05 p>0,05
G-SH, ммоль/кг	4,02±0,03	3,32±0,10	2,45±0,07 p<0,001	2,25±0,12 p<0,001	3,62±0,06 p<0,001	2,87±0,22 p<0,05
ЦХО, ммоль/(кг·хв)	7,73±0,26	8,87±0,36	6,15±0,18 p<0,01	5,53±0,17 p<0,001	7,08±0,14 p<0,01	6,67±0,21 p<0,01
СДГ, ммоль/(кг·хв)	6,57±0,08	5,53±0,19	5,55±0,04 p<0,001	4,47±0,14 p<0,01	6,13±0,13 p<0,01	5,29±0,14 p<0,01
NO_2>, ммоль/кг	1,43±0,05	0,58±0,04	1,60±0,04 p<0,05	1,30±0,07 p<0,001	1,31±0,06 p<0,01	1,68±0,09 p<0,01
ГПЛ, 10^3 ум. од./кг	4,10±0,12	3,77±0,13	8,50±0,49 p<0,001	6,57±0,33 p<0,001	5,27±0,11 p<0,001	4,85±0,05 p<0,001
ТБП, ммоль/кг	5,27±0,14	5,53±0,16	8,84±0,17 p<0,001	8,33±0,09 p<0,001	5,96±0,13 p<0,001	6,31±0,11 p<0,001

Відомо, що при активації процесів переокиснення мембранних ліпідів знижується енергозабезпечення клітин внаслідок пошкодження мітохондрій [9]. У наших дослідах при ГП у тварин також виявлено порушення функціонування електроннотранспортного ланцюга мітохондрій у печінці, про що свідчило зменшення активності ЦХО – на 20 % та СДГ – на 15 %.

У гомогенатах тканини нирок відмічено зміни аналогічної спрямованості: достовірне підвищення вмісту ГПЛ та ТБП – на 74 і 51 % відповідно з одночасним зниженням активності СОД та КАТ на 27 і 35 %, вмісту G-SH – на 32 %. Активність СДГ та ЦХО також зменшувалась – на 19 та 38 % відповідно. Вміст креатиніну та сечовини у сироватці крові вірогідно збільшувався – на 15 та 18 % відповідно, що свідчить про порушення видільної функції нирок.

Встановлено, що перехоплювач супероксиданіон-радикала препарат СОДrec при його профілактичному введенні за умов ГП сприяв зниженню активності α-амілази на 31 %, що свідчить про зменшення ступеня ураження підшлункової залози. Одночасно відбувалось зниження рівня NO_2^- у гомогенатах печінки на 18 %, але спостерігалось подальше його зростання у гомогенатах нирок (на 29 %). Це супроводжувалось послабленням активності процесів переокиснення мембранних ліпідів: кількість ГПЛ та ТБП зменшувалась, відповідно, на 26 та 24 % у нирках і на 38 та 33 % у печінці. Про активацію системи антиоксидантного захисту на фоні профілактичного введення СОДrec свідчило підвищення активності КАТ на 49 % у печінці та на 21 % у нирках. Активність СОД збільшувалась на 106 % у печінці, у нирках спостерігалась тенденція до зростання активності даного ферменту. Вміст G-SH зростав у печінці на 48 %, у нирках – на 28 % порівняно з контрольною патологією. Вміст церулоплазміну в сироватці крові на тлі застосування СОДrec знижувався на 11 %. Відновлення балансу системи прооксиданти-антиоксиданти та функціональної активності мембранозв'язаних ферментів мітохондрій проявлялось збільшенням показників СДГ та ЦХО: у печінці – на 10 та 15 % відповідно, у нирках – на 18 та 21 %.

На тлі застосування СОДrec вміст сечовини та креатиніну в сироватці крові знижувався на 50 та 15 %, причому останній показник відновлювався до контрольної величини. Спостерігалось також зниження активності АлАТ та АсАТ – на 31 і 9 % відповідно, лужної фосфатази – на 36 %.

Можна припустити, що позитивний вплив СОДrec на стан печінки та нирок при його профілактичному введенні за умов гострого панкреатиту реалізується через постачання антиоксидантної системи активною формою супероксиддисмутази та нейтралізацію супероксидного аніон-радикала з наступним зменшенням утворення пероксинітриту.

ВИСНОВКИ. 1. При гострому експериментальному панкреатиті на фоні активації утворення NO_2^- у печінці та нирках зростає інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів зі зменшенням активності супероксиддисмутази, каталази та вмісту відновленого глутатіону, порушенням функціонування мітохондріального ланцюга транспорту електронів, що супроводжується погіршенням функціональної здатності цих органів, підвищенням у сироватці крові маркерних ферментів цитолізу та холестазу, вмісту креатиніну та сечовини.

2. Перехоплювач супероксиданіон-радикала, препарат активної форми супероксиддисмутази – СОДrec при його профілактичному введенні перед моделюванням гострого панкреатиту сприяє зменшенню ступеня ураження підшлункової залози, відновленню біохімічних показників, які відображають стан системи прооксиданти-антиоксиданти та мітохондріального транспорту електронів у печінці та нирках, активності маркерних ферментів цитолізу та холестазу, вмісту креатиніну та сечовини у сироватці крові.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41-43.

2. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33-35.

3. Деримедвідь Л.В. Експериментальне обгрунтування застосування препаратів супероксиддисмутази при патологічних станах, обумовлених активацією процесів вільнорадикального окислення: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Київ, 2006. – 36 с.

4. Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы // Методы биохимических исследований. – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1982. – С. 207-210.

5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.

6. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.

7. Криворучко И.А., Федорович А.А. Роль оксида азота и перекисного окисления липидов в пато-

генезе экспериментального острого панкреатита // Клін. хірургія. – 2005. – № 1. – С. 58-62.

8. Кривченкова Р.С. Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 47-49.

9. Христич Т.М., Телекі Я.М. До питання про лікування оксидативного стресу у хворих на хронічний панкреатит у поєднанні з хронічним обструктивним захворюванням легень // Сучасна гастроентерологія. – 2007. – № 3 (35). – С. 80-84.

10. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678-681.

11. Шалимов С.А., Радзиховский Ф.П., Кейсевич Л.В. Руководство по экспериментальной хирургии. – М.: Медицина, 1989. – 272 с.

12. Andican G., Gelisgen R. Oxidative stress and nitric oxide in rats with alcohol-induced acute pancreatitis // World J Gastroenterol. – 2005. – № 11 (15). – P. 2340-2345

13. Darvas K., Futo J., Okros I. et al. Principles of intensive care in severe acute pancreatitis in 2008 // Orv Hetil. – 2008. – № 149 (47). – P. 2211-2220.

14. Dobrowski A., Konturek S.J., Konturek J.W., Gabryelewicz A. Role of oxidative stress in the pathogenesis of caerulein-induced acute pancreatitis // European Journal of Pharmacology. – 1999. – **377,** № 1– P. 1-11.

15. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – № 82. – P. 70-77.

16. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Strasburg: Concil of Europe, 1986. – № 123. – P. 52.

17. Green I.C., Davie A.W., Golawski J. et al. Analisis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids // Anal. biochem. – 1982. – **126**, № 1. – P. 131-138.

18. Martyn A.S., Chris E.C. Interaction of Peroxynitrite with Mitochondrial Cytochrome Oxidase // J Biol. Chem. – 1998. – **273**, № 47. – P. 30961-30972.

19. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease // Physiological Reviews. – 2007. – **87**. – P. 315-424.

20. Park B.K., Chung J.B., Lee J.H. et al. Role of oxygen free radicals in patients with acute pancreatitis // World J Gastroenterol. – 2003. – № 9 (10). – P. 2266-2269.

СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ И ПОЧЕК ПРИ ОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАНКРЕАТИТЕ И ПРИМЕНЕНИИ ПРЕПАРАТА СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ

Е.А. Посохова, О.З. Яремчук

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

Изучены патогенетические звенья поражения печени и почек при остром экспериментальном панкреатите. Установлено, что рексод (препарат супероксиддисмутазы) при его профилактическом введении перед моделированием острого панкреатита способствует уменьшению степени поражения поджелудочной железы, восстановлению биохимических показателей, которые отображают состояние системы прооксиданты-антиоксиданты и митохондриального транспорта электронов в печени и почках, активности маркерных ферментов цитолиза и холестаза, содержания креатинина и мочевины в сыворотке крови.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **экспериментальный панкреатит, печень, почки, СОДrec.**

STATE OF LIVER AND KIDNEYS AT ACUTE EXPERIMENTAL PANCREATITIS AND USAGE OF SUPEROXIDE DISMUTASE PREPARATION

K.A. Posokhova, O.Z. Yaremchuk

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

On the model of acute pancreatitis the pathogenetic mechanisms of liver and kidneys damages were studied. It was shown that SODrec (drug of superoxide dismutase) when used for prophylaxis before modeling of acute pancreatitis, decreases the degree of pancreatic injury, improves biochemical indices of prooxidant-antioxidant system and mitochondrial pathways of electrons' in liver and kidneys, and also decreases the enzyme markers of cytolysis and cholestasis, creatinine and urea concentration in blood serum.

KEY WORDS: **experimental pancreatitis, liver, kidneys, SODrec.**

Отримано 21.01.2009 р.

Адреса для листування: *К.А. Посохова, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.*

УДК 547.461.2:547.466.3

СИНТЕЗ, ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ТА ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ γ-(4-N-R-СУЛЬФАМІДОБЕНЗОЛОКСАМІДО)-БУТАНОВИХ КИСЛОТ

В.А. Георгіянц, Н.І. Банна, В.М. Савченко, І.П. Банний
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА

З метою пошуку речовин з діуретичною, протизапальною та анальгетичною активністю здійснено синтез нової групи хімічних сполук γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанових кислот. Структуру синтезованих сполук доведено методами елементного аналізу, УФ-, ІЧ- та ПМР-спектроскопії. Фармакологічні дослідження показали, що більшість сполук проявляють діуретичну, протизапальну та анальгетичну активність при низькій токсичності.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанові кислоти, фармакологічна активність, токсичність.**

ВСТУП. В останні роки проводять інтенсивний пошук біологічно активних речовин серед амідних та гідразидних похідних щавлевої кислоти [2, 3, 6].

Перспективними виявилися сполуки – похідні амінокислот, які характеризуються високою активністю та низькою токсичністю [1, 4, 5, 10, 13].

В медичній практиці також широко застосовують препарати діуретичної, протизапальної та анальгезивної дій, але всі вони проявляють побічні ефекти, що обумовлює пошук високоефективних та безпечних препаратів.

Метою даної роботи є синтез нової групи хімічних сполук, які поєднують у своїй структурі амінобутанову кислоту з аренсульфамідним та оксамідним радикалами, а також вивчення діуретичної, протизапальної та анальгезивної активності синтезованих речовин і встановлення зв'язку "структура–фармакологічна активність".

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. УФ-спектри синтезованих сполук зареєстровано на приладі SPECORD 200 (фірма "Analytikjena") в етанолі. ІЧ-спектри виміряно на спектрофотометрі TENSOR 27 (фірма "Bruker") у таблетках калію броміду (концентрація речовин – 0,5 %). Спектри ПМР записано у ДМСО-$Д_6$ на спектрометрі Varian Mercury VX-200, внутрішній стандарт – ТМС.

γ-(4-сульфамідобензолоксамідо)-бутанова кислота (III а, табл. 1). До розчину 1,12 г (0,02 моль) калію гідроксиду в 10 мл метанолу додають 2,06 г (0,02 моль) γ-амінобутанової кислоти. Отриманий розчин додають до розчину 2,72 г (0,01 моль) етилового естеру 4-сульфамідобензолоксамінової кислоти у 10 мл діоксану та залишають стояти до зникнення лужного середовища. Осад, що випав, відфільтровують, розчиняють у 10 мл води. Розчин підкислюють HCl (1:1) до pH 3. Осад, що випав, відфільтровують, сушать та кристалізують з діоксану. Т. пл. – 242- 244 °С. Вихід – 2,59 г.

Аналогічно одержують сполуки III б-і (табл. 1).

Вивчення гострої токсичності γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанових кислот проведено на інтактних безпородних білих мишах різної статі масою 18-24 г. Сполуки, які вивчали, вводили внутрішньошлунково в об'ємі не більше 1 мл. Кількість тварин, що вижили та загинули, відмічали через кожні 24 год. Середні смертельні дози ($ЛД_{50}$) визначали за методом Кьорбера [9].

Результати отриманих даних наведено у таблиці 4.

Вплив синтезованих сполук на видільну функцію нирок вивчено на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 120-160 г [11]. Для дослідження сечогінної дії використано серії тварин по сім щурів у кожній групі. Сполуки, які досліджували, вводили внутрішньошлунково у дозі 0,01 $ЛД_{50}$.

При вивченні водного діурезу щурів утримували на постійному раціоні при вільному доступі до води. До водного навантаження тварин витримували протягом 2 год без їжі та води. Потім щурам вводили у шлунок за допомогою зонда сполуки, які досліджували, у вигляді водної суспензії одночасно з водним навантаженням у кількості 3 мл на 100 г маси тіла тварини. Сечу збирали через кожну годину впродовж 4 год. Кількість сечі, що виділилась у тварин контрольної групи, брали за 100 %. Аналіз отриманих експериментальних даних

© В.А. Георгіянц, Н.І. Банна, В.М. Савченко, І.П. Банний, 2009.

Таблиця 1 – **Характеристики γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанових кислот**

Сполука	R	Вихід, %	Т. пл.*, °С	Знайдено, %		Брутто-формула	Вирахувано, %		R_f**
				N	S		N	S	
III а	H	79	242-4	12,92	9,68	$C_{12}H_{15}N_3O_6S$	12,76	9,73	0,47
б	$CONH_2$	81	220-2	15,22	8,74	$C_{13}H_{16}N_4O_7S$	15,04	8,61	0,64
в	$C(=NH)NH_2$	76	250-2	19,02	8,71	$C_{13}H_{17}N_5O_6S$	18,85	8,63	0,56
г	2,6-Диметокси-піримідил-4	77	235-7	15,12	6,72	$C_{18}H_{21}N_5O_8S$	14,98	6,86	0,72
д	6-Метоксипіримідил-4	75	236-8	16,23	7,46	$C_{17}H_{19}N_5O_7S$	16,01	7,33	0,52
е	2-Метоксипіразил-3	77	212-4	16,18	7,21	$C_{17}H_{19}N_5O_7S$	16,01	7,33	0,67
ж	Тіазоліл-2	69	218-20	13,62	15,48	$C_{15}H_{16}N_4O_6S_2$	13,58	15,55	0,49
з	5-Етил-1,3,4-тіадіазоліл-2	71	230-2	15,72	14,46	$C_{16}H_{19}N_5O_6S_2$	15,86	14,52	0,62
і	4,6-Диметилпіримідил-2	66	237-9	16,18	7,48	$C_{18}H_{21}N_5O_6S$	16,08	7,36	0,46

Примітка. * – кристалізують III а, б з діоксану; III в-е, з, і – з діоксану водного; III ж – з води;
** – константи R_f визначено методом ТШХ в системі розчинників "етанол–гексан–хлороформ" (1:1:1) на пластинах "Silufol UV-254", проявлення парами йоду.

Таблиця 2 – **УФ- та ІЧ-спектри γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанових кислот**

Сполука	ІЧ-спектри, $см^{-1}$					УФ-спектри	
	ν_{NH}	$\nu_{OH\ COOH}$	$\nu_{C=O}$ I амід.смуга	δ_{NH} II амід.смуга	ν_{SO2}	λ, нм	ε,л·$см^{-1}$·$моль^{-1}$
III а	3327 3223	3112	1659	1524	1340 1160	273	13989
б	3353	2951	1699	1541	1296 1161	274	15022
в	3450 3267	2933	1687	1524	1301 1145	275	10190
г	3357 3288	3117	1684	1524	1341 1155	262	9203
д	3358 3289	3116	1684	1524	1341 1155	262	12678
е	3302	2955	1699	1525	1319 1168	280	9513
ж	3306	3101	1681	1519	1301 1149	292	21623
з	3321 3184	2973	1667	1519	1305 1138	287	7675
і	3357 3288	3116	1684	1524	1341 1154	262	8175

Таблиця 3 – **ПМР-спектри γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанових кислот, δ, м. ч.**

Сполука	H аромат.	$CONHCH_2$	SO_2NH	γ-CH_2	-CH_2-	α-CH_2	OH	Інші протони
III а	7,75(2H,д) 7,98(2H,д)	9,08(1H,т)	10,97(1H,с)	3,20(2H,к)	1,70(2H,кв)	2,20(2H,т)	12,03	7,25 (с.2H,NH_2)
б	7,76(2H,д) 7,90(2H,т)	9,08(1H,т)	11,05(1H,с)	3,20(2H,к)	1,70(2H,кв)	2,20(2H,т)	12,03	7,28 (с.2H,NH_2)
в	7,70(2H,д) 7,90(2H,д)	9,08(1H,т)	10,92(1H,с)	3,20(2H,к)	1,72(2H,кв)	2,22(2H,т)	11,98	6,65 (с.2H,NH_2)
г	7,90(2H,д) 8,00(2H,д)	9,08(1H,т)	10,98(1H,с)	3,20(2H,к)	1,72(2H,кв)	2,20(2H,т)	11,80	3,35 (с.3H,OCH_3) 3,78 (д.3H,OCH_3) 5,92 (с.1H,CH)
д	7,90(2H,д) 8,00(2H,д)	9,08(1H,т)	10,98(1H,с)	3,20(2H,к)	1,72(2H,кв)	2,10(2H,т)	11,80	3,79 (д.3H,OCH_3) 5,90 (с.1H,CH) 6,30 (с.1H,CH)
е	7,72(2H,д) 7,98(2H,с)	9,08(1H,т)	10,96(1H,с)	3,20(2H,к)	1,72(2H,кв)	2,20(2H,т)	12,03	3,82 (д.3H,OCH_3)
ж	7,72(2H,д) 7,78(2H,т)	9,08(1H,т)	10,97(1H,д)	3,20(2H,к)	1,70(2H,кв)	2,10(2H,т)	12,70	6,78 (д.1H,CH) 7,20 (д.1H,CH)
з	7,70(2H,д) 7,92(2H,д)	9,08(1H,т)	10,98(1H,с)	3,20(2H,к)	1,68(2H,кв)	2,20(2H,т)	12,03	1,20 (т.3H,CH_2CH_3) 2,42 (с.2H,CH_2CH_3)
і	7,90(2H,д) 8,00(2H,д)	9,08(1H,т)	10,98(1H,с)	3,20(2H,к)	1,70(2H,кв)	2,20(2H,т)	11,80	2,22 (т.6H,$2CH_3$) 5,90 (с.1H,CH)

проводили порівняно з еталонними діуретиками гіпотіазидом та фуросемідом. Результати досліджень наведено у таблиці 5.

Протизапальну активність нових сполук (III а-і) вивчали на моделі гістамінового набряку [11]. Досліди проводили на білих безпородних

Таблиця 4 – **Гостра токсичність γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанових кислот**

Сполука	Параметри гострої токсичності, мг/кг		
	$ЛД_{16}$	$ЛД_{50}$ (M±m)	$ЛД_{84}$
III а	1980	2240,0±39,6	2740
б	2390	2610,0±21,4	2960
в	2230	2420,0±32,7	2630
г	2450	2740,0±27,6	3140
д	2970	3230,0±24,7	3560
е	1615	1874,0±34,5	2140
ж	3190	3410,0±26,2	3760
з	1496	1740,0±31,5	1975
і	2450	2760,0±29,3	3140

Таблиця 5 – **Діуретична активність γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанових кислот**

Сполука	Доза, мг/кг	Діурез			
		через 2 год		через 4 год	
		(M±m), мл	у % до контролю	(M±m), мл	у % до контролю
III а	22,4	2,34±0,21**	198,3	5,17±0,27**	210,2
б	26,1	1,43±0,15	121,2	3,09±0,16	125,6
в	24,2	1,51±0,19	128,0	3,33±0,24	135,4
г	27,4	1,44±0,22	122,0	3,16±0,29	128,4
д	32,3	1,42±0,17	120,3	3,23±0,19	131,3
е	18,7	1,73±0,18**	146,6	3,88±0,25**	157,7
ж	34,1	2,90±0,30**	245,8	6,19±0,18**	251,6
Контроль		1,18±0,10	100	2,46±0,18	100
з	17,4	2,53±0,21**	214,4	5,68±0,20**	230,8
і	27,6	1,42±0,18	120,3	3,18±0,23	129,3
Гіпотіазид	50,0	2,02±0,09**	157,8	4,07±0,17**	171,0
Адіурекрин	1,0	0,96±0,10**	75,0	1,29±0,15**	54,2
Фуросемід	10,0	4,17±0,14**	325,8	10,32±0,14**	433,6
Контроль		1,28±0,09	100	2,38±0,14	100

Примітка: *, ** – достовірність результатів при $p<0,05$ та $p<0,01$ відповідно порівняно з контрольною групою.

щурах обох статей масою 210-260 г по 7 тварин у дослідних і контрольних групах. Запалення викликали шляхом субплантарного введення в одну з лапок 0,1 мл 0,1 % розчину гістаміну. Досліджувані сполуки та препарати порівняння диклофенак і анальгін вводили внутрішньошлунково за годину до ін'єкції гістаміну в ізоефективних дозах відносно препарату порівняння диклофенаку. Препарати порівняння вводили у дозах: диклофенак – 10 мг/кг, анальгін – 50 мг/кг. При максимальному розвитку набряку через 4 год після введення гістаміну за допомогою онкомера визначали об'єм обох лапок. Ступінь гноблення набряку (протизапальну активність) розраховували за формулою:

$$\%\text{гноблення} = \frac{V_k - V_g}{V_k} \times 100\%,$$

де V_k – різниця об'єму обох лапок у контролі, V_g – різниця об'єму обох лапок досліджуваних тварин.

Отримані результати наведено в таблиці 6.

Анальгетичну активність отриманих сполук досліджували на моделі "оцтових корчів" у дослідах на білих щурах масою 180-220 г. "Корчі" викликали внутрішньоочеревинним введенням 0,75 % водного розчину оцтової кислоти в дозі 1 мл на 100 г маси тіла тварини. Підрахунок кількості "корчів" проводили через 20 хв після введення оцтової кислоти протягом 30 хв. Досліджувані сполуки вводили перорально за допомогою спеціального зонда в ізоефективних дозах відносно препарату порівняння анальгіну. Препарати порівняння вводили в дозах: анальгін – 50 мг/кг, диклофенак – 10 мг/кг. Ступінь анальгетичної дії досліджуваних сполук оцінювали за їх здатністю знижувати кількість "корчів" у щурів щодо контрольної групи та виражали у відсотках [11]. В кожній групі використовували по 7 щурів.

Результати отриманих експериментальних даних наведено в таблиці 7.

Увесь експериментальний матеріал було оброблено методом варіаційної статистики з урахуванням критерію Стьюдента [7].

Таблиця 6 – **Протизапальна активність γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанових кислот**

Сполука	Приріст об'єму лапи за 4 год, мл			Протизапальна активність, %
	M±m	Довірчий інтервал при p=0,05	У % до контролю	
III а	1,28±0,09	1,06 ÷1,50	97,7	2,3
б	1,17±0,12	0,88 ÷1,46	89,3	10,7
в	1,33±0,10	1,09 ÷1,57	101,5	-
г	1,06±0,08	0,86 ÷1,26	80,9	19,1
д	1,12±0,09	0,90 ÷1,34	85,5	14,5
е	0,98±0,11	0,71 ÷1,25	74,8	25,2
ж	0,84±0,08	0,64 ÷1,04	64,1	35,9
Контроль	1,31±0,10	1,07 ÷1,55	100	–
з	1,37±0,12	1,08 ÷1,66	101,5	–
і	1,28±0,11	1,01 ÷1,55	94,8	5,2
Анальгін	0,68±0,08	0,48 ÷0,88	50,4	49,6
Диклофенак	0,60±0,07	0,43 ÷0,77	44,4	55,6
Контроль	1,35±0,12	1,06 ÷1,64	100	–

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В ролі вихідних продуктів для синтезу метилових естерів 4-N-R-сульфамідооксанілових кислот (II, схема 1) було використано заміщені аміди сульфанілової кислоти (I), описані у літературі [12]. Метилові естери 4-N-R-сульфамідооксанілових кислот (II) одержано за реакцією ацилювання заміщених амідів сульфанілової кислоти (I) метоксалілхлоридом у середовищі льодяної оцтової кислоти при зниженій температурі за присутності триетиламіну.

γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанові кислоти (III а-і) отримано за реакцією амідування естерів II γ-амінобутановою кислотою за присутності калію гідроксиду при кімнатній температурі з подальшим підкисленням реакційної суміші хлористоводневою кислотою. Виходи цільових продуктів складали 66-81 %.

γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанові кислоти (III а-і, табл. 1) являють собою безбарвні кристалічні речовини, легко розчиняються у водних лугах, а при нагріванні – у спирті, діоксані, льодяній оцтовій кислоті.

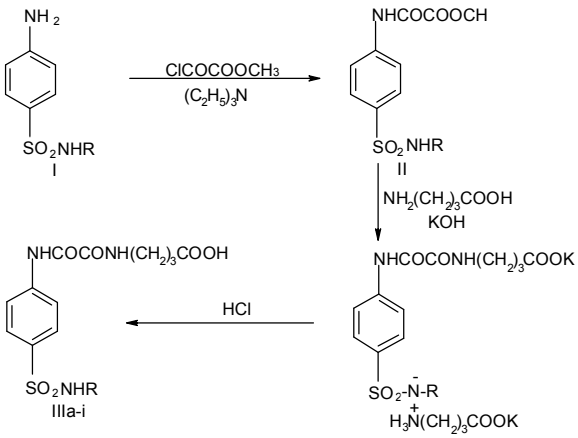


Схема 1.

Примітка. Значення R наведено в таблиці 1.

Таблиця 7 – **Анальгетична активність γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанових кислот**

Сполука	Кількість корчів за 30 хв			Анальгетична активність, %
	M±m	Довірчий інтервал при p=0,05	У % до контролю	
III а	59,1±3,1	51,5÷66,7	100,7	–
б	57,6±2,8	50,7÷64,5	98,1	1,9
в	56,8±3,4	48,5÷65,1	96,8	3,2
г	54,7±2,3	49,1÷60,3	93,2	6,8
д	51,8±2,9	44,7÷58,9	88,2	11,8
е	46,4±2,6	40,0÷52,8	79,0	21,0
ж	38,2±2,1	33,1÷43,3	65,1	34,9
Контроль	58,7±2,1	53,6÷63,8	100	–
з	55,2±3,8	45,9÷64,5	97,9	2,1
і	56,8±3,4	48,5÷65,1	100,7	–
Анальгін	28,6±2,0	23,7÷33,5	50,7	49,3
Диклофенак	30,8±2,2	25,4÷36,2	54,6	45,4
Контроль	56,4±2,5	50,3÷62,5	100	–

Будову амідів III а-і підтверджено даними елементного аналізу, ІЧ-, УФ- та ПМР-спектрів, а чистоту та індивідуальність – методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) (табл. 1-3).

В УФ-спектрах найбільш інтенсивним є поглинання основного структурного фрагмента молекули, що містить бензольний цикл. Тому інтерес становило визначення зміни частот характеристичної р-смуги поглинання бензолу (λ=204 нм, ε=8000 $см^{-1} \cdot моль^{-1} \cdot л$) при зміні структури основної молекули. УФ-спектри синтезованих сполук мають одну смугу поглинання, експериментальні дані також підтверджують закономірне батохромне зміщення частоти р-смуги поглинання бензолу, що супроводжується гіперхромним ефектом при введенні в бензольне кільце електронодорних замісників [8].

В ІЧ-спектрах сполук III а-і (табл. 2) виявлено смуги поглинання на ділянці 1699-1659 $см^{-1}$, які відповідали валентним коливанням карбонільної групи (I амідна смуга). Смуги поглинання на ділянці 1541-1519 $см^{-1}$ відносять до деформаційних коливань NH-групи (II амідна смуга), а при 3450-3302 та 3289-3184 $см^{-1}$– до валентних коливань NH-групи. Валентні коливання на ділянці 3117-2933 $см^{-1}$ відповідали гідроксильній групі. В ІЧ-спектрах сполук також присутній дуплет смуги асиметричних (1341-1296 $см^{-1}$) та симетричних (1168-1138 $см^{-1}$) коливань SO_2-групи, а їх положення відповідало літературним даним [8].

У ПМР-спектрах γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанових кислот (III а-і, табл. 3) присутня група сигналів при d – 8,00-7,70 м. ч., яка відповідала протонам ароматичної системи. Квартет сигналів γ-метиленової групи спостерігався при d – 3,20 м. ч. Квинтетність сигналів при d – 1,72-1,68 м. ч. обумовлена поглинанням протонів середньої метиленової групи. Триплет сигналів γ-метиленової групи спостерігався при d – 2,22-2,10 м. ч. У слабкому полі з хімічним зсувом 11,05-9,08 м. ч. знаходилися сигнали NH-груп, а в більш слабкому полі виявляли протони гідроксильної групи у вигляді широкого піку.

У результаті проведених досліджень встановлено, що гостра токсичність групи сполук, які вивчали, перебувала у діапазоні 1740-3410 мг/кг. З даних таблиці 4 видно, що з досліджуваного ряду сполук III а-і найменш токсичною виявилась γ-(4-N-2-тіазолілсульфамідобензолоксамідо)-бутанова кислота (сполука III ж), $ЛД_{50}$ якої складала 3410 мг/кг. Заміна у сульфамідній частині молекули сполуки III ж тіазолільного радикала на 4,6-диметилпіримідил-2 радикал або 2,6-диметоксипіримідил-4 радикал підвищувала токсичні властивості сполук ($ЛД_{50}$ – 2760 та 2740 мг/кг). Введення в сульфамідну групу сполук амінокарбонільного, гуанідинового радикалів або водню (сполуки III б,в,а) сприяло подальшому збільшенню токсичності ($ЛД_{50}$ – 2610, 2420, 2240 мг/кг). Найтоксичнішою виявилася сполука, що містила 5-етил-1,3,4-тіадиазоліл-2 радикал (сполука III з), $ЛД_{50}$ якої складала 1740 мг/кг.

Аналіз результатів вивчення діуретичної активності показав, що всі вивчені сполуки в умовах водного навантаження викликали збільшення видільної функції нирок у середньому на 25,6-151,6 % (табл. 5). Виражену діуретичну активність, яка перевищувала дію гіпотіазиду, проявляли сполуки, що містили у сульфамідній групі молекули тіазолільний, 5-етил-1,3,4-тіадиазолільний радикали та атом водню (сполуки III ж, III з, III а). Вказані сполуки у дозах 34,1; 17,4 та 24,4 мг/кг за 2 год збільшували діурез у середньому на 145,8; 114,4 та 98,3 %, а за 4 год – на 151,6; 130,8 та 110,2 відповідно. Заміна вказаних радикалів у сульфамідній групі молекули на інші радикали значно знижувала діуретичний ефект.

Дані експерименту (табл. 6) свідчать про те, що досліджувані сполуки зменшували розвиток експериментального набряку в середньому на 5,2-35,9 %. Найбільший антиексудативний ефект мала сполука III ж, що містила при сульфамідній групі тіазолільний радикал, яка пригнічувала розвиток набряку на 35,9 %. Заміна вказаного радикала на 2-метоксипіразильний (сполука III е) або 2,6-диметоксипіримідильний (сполука III г) радикал зменшувала активність сполуки (25,2 та 19,1 %). Введення інших радикалів призводило до подальшого різкого зниження активності. У сполуках III в та III з протизапальну активність не виявлено.

З аналізу даних таблиці 7 видно, що більшість досліджуваних сполук проявляли помірну анальгетичну активність. Найвищу анальгетичну активність показала сполука III ж, яка містила у сульфамідній групі тіазолільний радикал. Вказана сполука зменшувала больову чутливість на хімічний подразник в середньому на 34,9 %. Заміна тіазолільного радикала на 2-метоксипіразильний (сполука III е) значно знижувала знеболювальний ефект (21,0 %). Сполуки III а та III і були неактивними.

ВИСНОВКИ. 1. Здійснено синтез нової групи хімічних сполук γ-(4-N-R-сульфамідобензолоксамідо)-бутанових кислот, структуру яких підтверджено даними елементного аналізу, УФ-, ІЧ- та ПМР-спектрів.

2. У результаті фармакологічного скринінгу виявлено речовини, які за діуретичною активністю перевищують дію препарату порівняння гіпотіазиду та проявляють помірну протизапальну й анальгетичну активність.

ЛІТЕРАТУРА

1. Банный И.П., Георгиянц В.А., Банная Н.И. и др. Поиск веществ с противовоспалительной и анальгетической активностью в ряду карбоксиметиламидов R-бензолсульфогидразидов щавелевой кислоты // Ліки України. – 2005. – № 9. – С. 141-143.

2. Банный И.П., Самура Б.А., Банная Н.И., Савченко В.Н. Противовоспалительная и анальгетическая активность N-R-амидов 4-(N-R'-оксамидосульфонил)-бензолметилоксаминовых кислот // Український вісник психоневрології. – 2006. –**14**, вип. 2. – С. 111-113.

3. Банный И.П., Самура Б.А., Черных В.П. и др. Синтез и диуретическая активность N-R-амидов 4-сульфамилбензолметилоксаминовой кислоты // Вісник фармації. – 1999. – № 2 (20). – С. 10-13.

4. Банний І.П., Бондар В.Б., Самура Б.А. та ін. Синтез та діуретична активність карбоксиметиламідів 4-N-R-сульфамідооксанілових кислот // Вісник фармації. – 2004. – № 2 (38). – С. 13-17.

5. Банний І.П., Самура Б.А., Бойко Г.О., Банна Н.І. Синтез та протизапальна активність γ-карбоксиаміламідів 4-(N-R-оксамідосульфоніл)-оксанілових кислот // Ліки України. – 2004. – № 9. – С. 93-97.

6. Банний І.П., Черних В.П., Самура Б.А. та ін. Синтез і біологічна активність гідразиду та ацилгідразидів 4-сульфамілбензилоксамінової кислоти // Вісник фармації. – 2001. – № 4 (28). – С. 9-12.

7. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – 2-е изд. – Л.: Медицина, 1963. – 148 с.

8. Бранд Дж., Энглинтон Г. Применение спектроскопии в органической химии. – М.: Мир, 1976. – 276 с.

9. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. – М.: Медицина, 1977. – 131 с.

10. Георгіянц В.А., Банна Н.І., Савченко В.М. Синтез та діуретична активність γ-(R-бензолоксамідо)-бутанових кислот // Вісник фармації. – 2007. – № 3 (51). – С. 7-11.

11. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.

12. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. – 14-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: ООО "Издательство Новая волна": Издатель С.Б. Дивов, 2003. – Т. 1. – 540 с. Т. 2 – 608 с.

13. Negwer M. Organic-chemical drugs and their synonyms (an international survey). – Berlin: Academie Verlag, 1994. – **1**. – 2855 p.

СИНТЕЗ, ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ γ-(4-N-R-СУЛЬФАМИДОБЕНЗОЛОКСАМИДО)-БУТАНОВЫХ КИСЛОТ

В.А. Георгиянц, Н.И. Банная, В.М. Савченко, И.П. Банный
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.Н. КАРАЗИНА

Резюме

С целью поиска веществ с диуретической, противовоспалительной и анальгетической активностью осуществлен синтез новой группы химических соединений γ-(4-N-R-сульфамидобензолоксамидо)-бутановых кислот. Структура синтезированных соединений доказана методами элементного анализа, УФ-, ИК- и ПМР-спектроскопии. Фармакологические исследования показали, что большинство соединений проявляют диуретическую, противовоспалительную и анальгетическую активность при низкой токсичности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **γ-(4-N-R-сульфамидобензолоксамидо)-бутановые кислоты, фармакологическая активность, токсичность.**

SYNTHESIS, FARMALOGICAL PROPERTIES AND ACUTE TOXICITI OF THE γ-(4-N-R-SULFAMIDOPHENYLOXAMIDO)-BUTANOIC ACIDS

V.A. Georgiyants, N.I. Banna, V.M. Savchenko, I.P. Banny
NATIONAL UNIVERSITYOF PHARMACY, KHARKIV
KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY BY V.N. KARAZIN

Summary

With the purpose of search of substances with diuretic, anti-inflammatory and analgesic activity the synthesis of a new group of chemical compounds γ-(4-N-R-sulfamidophenyloxamido)-butanoic acids was carried out. The structure of synthesize compounds was proved by methods of element analysis, UV-, IR-and NMR-spectroscopy. The pharmacological researches showed that the majority of compounds synthesized display diuretic, anti-inflammatory and analgesic activity when the toxicity is low.

KEY WORDS: **γ-(4-N-R-sulfamidophenyloxamido)-butanoic acids, pharmacological activity, toxicity.**

Отримано 5.11.2008 р.

Адреса для листування: *В.А. Георгіянц, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.*

УДК 616.132/614.876:615.225

ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ ПРЕПАРАТОМ "ЛІПОФЛАВОН" СУДИННОЇ ДИСФУНКЦІЇ, ЩО ВИКЛИКАНА ВПЛИВОМ ІОНІЗУЮЧОГО ОПРОМІНЕННЯ

О.В. Кислова, І.В. Іванова, А.І. Соловйов
ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ, КИЇВ

Дія іонізуючої радіації призводить до максимального зниження ендотелійзалежного розслаблення аорти щурів з 91 до 43 % через 30 діб після γ-опромінення, а аорти морських свинок – з 32 до 3 % через 9 діб. Додавання препарату "Ліпофлавон" в буферний розчин (0,6 мг/мл) та його внутрішньоочеревинне введення через 1 год після опромінення (10 мг/кг маси тіла) викликають відновлення ацетилхолініндукованих реакцій сегментів аорти опромінених тварин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **γ-опромінення, аорта, ендотелійзалежне розслаблення, антиоксидантні властивості, ацетилхолін.**

ВСТУП. Відомо, що ендотелій здорових судин має потужні дилататорні властивості. Вони обумовлені наявністю ряду речовин, які розслаблюють судинну стінку і можуть ефективно впливати на гладеньком'язові клітини судин, регулюючи артеріальний тиск крові. Здатність судинної стінки до розслаблення при стимуляції ендотелію зменшується при багатьох патологіях кровоносних судин, в тому числі при опроміненні тварин іонізуючою радіацією [1, 7, 8].

Для корекції цієї патології використовують один із представників класу біофлавоноїдів – кверцетин [3, 4]. Він здатен модулювати функції ендотелію завдяки комплексному впливу на різні рецепторні системи, ферменти та білки, а також антиоксидантним властивостям [2, 5]. Проте низька розчинність даного біофлавоноїду обумовлює пошук його нових лікарських форм. Препарат "Ліпофлавон" – це ліпосомальна форма кверцетину. Фосфатидилхолінові ліпосоми, що входять до його складу, також здатні відновлювати ендотелійзалежні реакції судин тварин завдяки антиоксидантним властивостям та репарації пошкоджених мембран [8]. Тому метою роботи стали вивчення впливу іонізуючого опромінення на ендотелійзалежне розслаблення (ЕЗР) судин тварин та корекція цих пошкоджень за допомогою препарату "Ліпофлавон".

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В дослідженнях було використано 20 щурів-самців лінії Вістар масою 170-200 г та 15 морських свинок масою 200-250 г. Тварин піддавали загальному одноразовому зовнішньому опроміненню в дозі 6 та 3 Гр відповідно з використанням джерела "ТГТ Рокус-М", Росія (^{60}Co). Для досліджень застосовували по дві групи щурів – через 9 та 30 діб після опромінення. Декапітацію тварин здійснювали після попередньої анестезії фенобарбіталом натрію (50 мг/кг).

У тварин вирізали грудну аорту, очищали її від жирової та сполучної тканин. Сегменти аорти фіксували у проточній камері на сталевих гачках та перфузували термостабілізованим (37 ^{o}C) розчином Кребса. Реєстрацію скорочень м'язових сегментів проводили в ізометричному режимі за допомогою датчиків напруження. Запис скорочень здійснювали за допомогою самописців model 202, Cole-Parmer Instrument Company, USA.

Вихідне тонічне скорочення ізольованих фрагментів судин викликали додаванням в перфузуючий розчин норадреналіну (НА, 10^{-6} моль/л). ЕЗР досліджуваних судин контролювали після поєднаного додавання НА та ацетилхоліну (АХ, 10^{-9}-10^{-5} моль/л). Для проведення досліджень використовували модифікований розчин Кребса такого складу (ммоль/л): NaCl – 133,0; KCl – 4,7; $NaHCO_3$ – 16,3; NaH_2PO_4 – 1,38; $CaCl_2$ – 2,5; $MgCl_2$ – 1,05; глюкоза – 7,8 (pH 7,4). Всі реактиви були виготовлені фірмою "Sigma" (США). В серії досліджень за умов in vitro ліпофлавон (ЗАТ "Біолік", Україна) додавали в буферний розчин в концентрації 0,6 мг/мл (концентрація кверцетину складала 0,01 мг/мл, лецитину – 0,37 мг/мл). У серії досліджень за умов in vivo суспензію препарату

© О.В. Кислова, І.В. Іванова, А.І. Соловйов, 2009.

вводили щурам внутрішньоочеревинно в дозі 10 мг/кг через 1 год після опромінення.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Статистично достовірними вважали значення при $p<0,05$. Всі розрахунки здійснювали у відносних одиницях як відсоток від максимального значення амплітуди тонічного напруження судинних сегментів аорти тварин, що викликано дією НА.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Проведені дослідження показали, що сегменти грудного відділу аорти щурів контрольної групи відповідали дозозалежним розслабленням на дію АХ у концентраціях 10^{-9}-10^{-5} моль/л. Максимальна амплітуда цього розслаблення становила (91,3±2,1)% ($p<0,001$, n=10) (рис. 1А). Дія іонізуючого випромінювання призводила до незначного достовірного зниження максимального значення ЕЗР через 9 діб після опромінення – до (80,3±2,5)% ($p<0,05$, n=9). Через 30 діб спостерігалось різке зменшення амплітуди АХ-індукованого розслаблення – до значень (42,8±2,9)% ($p<0,001$, n=8).

Гладеньком'язові сегменти грудного відділу аорти морських свинок контрольної групи, попередньо активовані НА, також відповідали дозозалежним розслабленням на дію АХ у концентраціях 10^{-9}-10^{-5} моль/л. Проте максимальна амплітуда цього розслаблення складала лише (31,8±2,6)% ($p<0,05$, n=8) від величини скорочення на НА (рис. 1Б). На 9-ту добу після опромінення ЕЗР майже зникало: максимальне значення становило (3,6±2,5)% ($p<0,001$, n=6) порівняно з контролем. Більш тривалий пострадіаційний період (30 діб після опромінення) характеризувався збільшенням ЕЗР порівняно з реакцією судин на 9-й день після опромінення, але був вірогідно меншим щодо контролю – (14,3±2,4)% ($p<0,001$, n=6). Отримані нами результати та дані літератури [1, 7] свідчать про те, що зниження ЕЗР судин при дії іонізуючої радіації притаманне не лише одному виду тварин і, можливо, має загальний характер. Ми пов'язуємо це явище з дією продуктів вільнорадикального окиснення, які утворюються в клітині під впливом γ–опромінення по кінетиці ланцюгових розгалужених реакцій [1]. Необхідно зазначити, що хоча опромінення викликало пригнічення АХ-індукованих реакцій судин обох видів тварин, проте між ними існували відмінності в динаміці розвитку ендотеліальної дисфункції (рис. 1А та Б). Так, значне зниження ЕЗР у щурів спостерігалось через 30 діб після опромінення (рис. 1А). У морських свинок зафіксовано значне порушення АХ-індукованих реакцій сегментів їх аорти як на 9-й, так і на 30-й день після опромінення. На 9-й день після опромінення ЕЗР майже зникало, тоді як на 30-й день амплітуда ЕЗР була вдвічі нижчою порівняно з контролем (рис. 1Б). Отже, для щурів характерним є поступовий розвиток ендотеліальної дисфункції, а для морських свинок спостерігається адаптація організму до наслідків дії іонізуючого опромінення, можливо, завдяки активації захисної антиоксидантної системи.

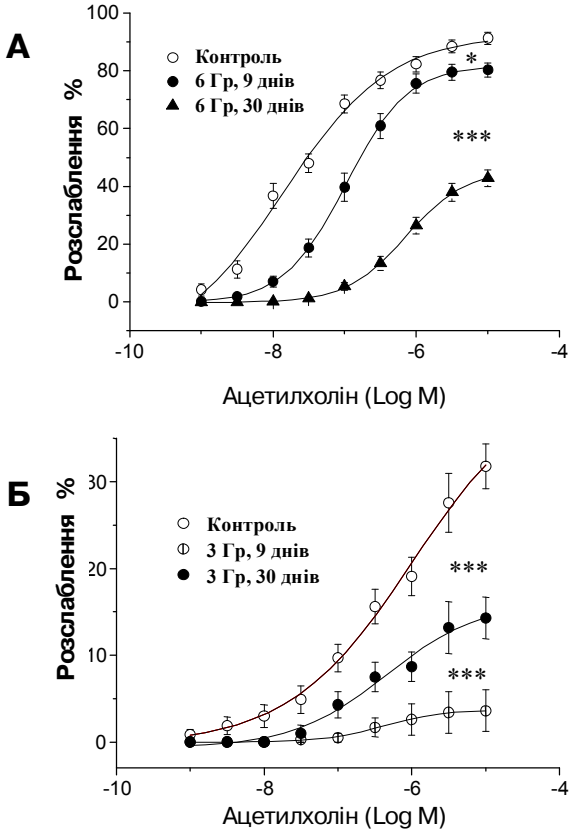
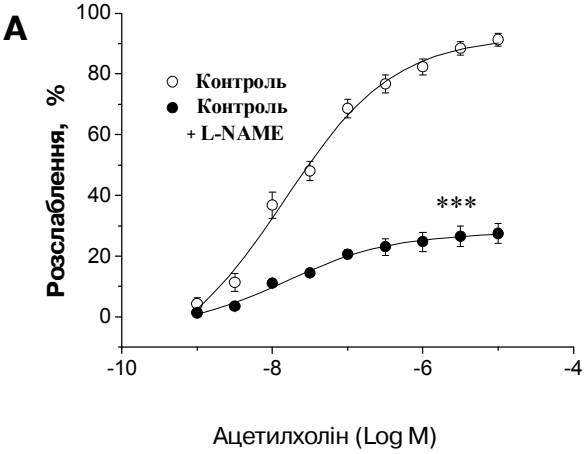


Рис. 1. Вплив одноразового іонізуючого опромінення (9 та 30 доби після опромінення) на ацетилхолініндуковане розслаблення (10^{-9} -10^{-5} моль/л) кільцевих сегментів аорти щурів (А) та морських свинок (Б). Криві доза-ефект отримано з апроксимацій експериментальних даних 4-параметричної логістичної кривої Хілла. Примітка. * та *** – вірогідні відмінності порівняно зі значеннями, зареєстрованими за контрольних умов, $p<0,05$ та $p<0,001$ відповідно.

Відомо, що ЕЗР визначається, головним чином, трьома одночасно діючими факторами, одним з яких є оксид азоту (NO), що виділяється при стимуляції ендотеліальної NO-синтази [7]. Для з'ясування ролі NO в загальному ЕЗР було використано інгібітор активності NO-синтази – метиловий ефір Nω-нітро-L-аргініну (L-NAME, $3x10^{-4}$ моль/л, Sigma). Додавання L-NAME в буферний розчин призводило до значного пригнічення АХ-індукованого роз-

слаблення судин здорових щурів – (27,4±3,3)% (p<0,001, n=8) (рис. 2А), тоді як в аорті морських свинок контрольної групи дилататорна реакція повністю зникала (рис. 2Б). Результати експерименту дозволяють стверджувати, що в аорті морських свинок представлена тільки NO-компонента ЕЗР, тоді як в аорті щурів існує, щонайменше, ще один діючий фактор. Майже повне зникнення ЕЗР судин морських свинок на 9-й день після опромінення, можливо, пов'язане з його однокомпонентністю. Існують дані, що саме NO- компонента найбільш чутлива до впливу γ-опромінення [6, 9], дія якого може знищувати однокомпонентне ЕЗР.

Як показано на рисунку 1, найбільш виражене пригнічення АХ-індукованих реакцій кільцевих сегментів аорти щурів та морських свинок спостерігалось, відповідно, через 30 та 9 діб після дії радіації. Тому для корекції ліпофлавоном судинних пошкоджень були обрані саме ці групи тварин. Встановлено, що додавання препарату в буферний розчин вірогідно не впливало на амплітуду ЕЗР сегментів аорти контрольних тварин, при цьому її величина складала (89,9±2,7)% (p>0,05, n=8) та (38,9±2,8)% (p>0,05, n=6) для щурів і морських свинок відповідно. Дія ліпофлавону на сегменти аорти опромінених тварин призводила до значного зростання АХ-індукованих реакцій (рис. 3, 4). Так, максимальна амплітуда ЕЗР при дії препарату на сегменти аорти становила (77,5±2,5)% (p<0,001, n=8) та (30,4±5,6)% (p<0,001, n=6) для опромінених щурів і морських свинок відповідно. Відновлення ЕЗР також спостерігалось після одно-



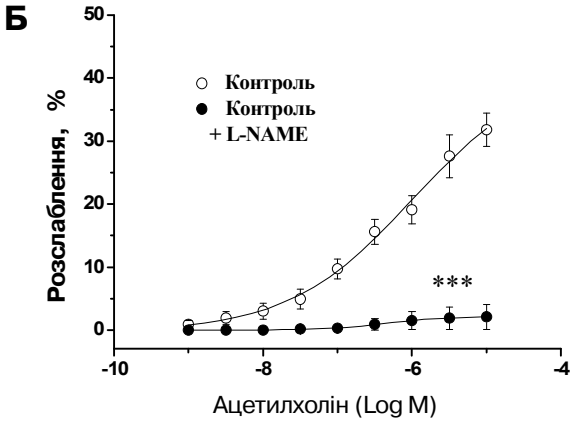
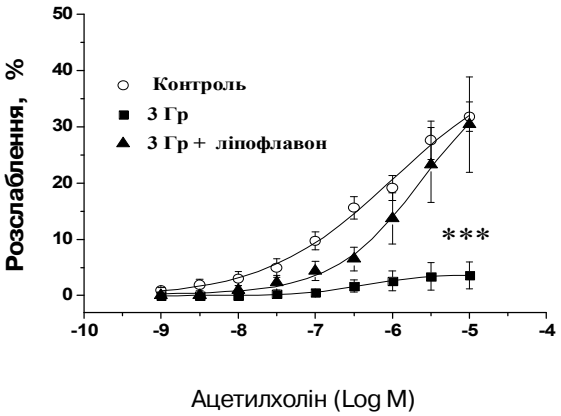


Рис. 2. Дія L-NAME (3x10^{-4} М) на ацетилхолініндуковані (10^{-9}-10^{-5} моль/л) реакції кільцевих судинних сегментів аорти щурів (А) та морських свинок (Б). Криві доза-ефект отримано з апроксимацій експериментальних даних 4-параметричної логістичної кривої Хілла. Примітка. *** – вірогідна різниця порівняно зі значеннями, зареєстрованими за контрольних умов; p<0,001.



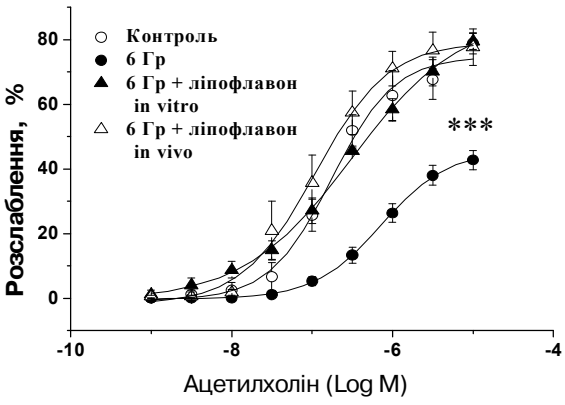


Рис. 4. Дія ліпофлавону за умов in vitro (0,6 мг/мл) та in vivo (10 мг/кг) на ацетилхолініндуковані (10^{-9}-10^{-5} моль/л) реакції кільцевих судинних сегментів аорти щурів після впливу одноразового іонізуючого опромінення у дозі 6 Гр (30 доба). Примітка. *** – вірогідна різниця порівняно зі значеннями, зареєстрованими на судинних сегментах на 30 добу після одноразового γ-опромінення; p<0,001.

разового внутрішньоочеревинного введення суспензії ліпофлавону щурам через 1 год після опромінення (рис. 4).

Таким чином, представлені результати показали, що препарат "Ліпофлавон" здатний відновлювати порушені γ-опроміненням АХ-індуковані реакції як при його дії безпосередньо на судини, так і при впливі на цілісний організм. Літературні дані свідчать [5] про те, що радіопротекторний ефект кверцетину та інших флавоноїдів пов'язаний, головним чином, з їх антиоксидантними властивостями – здатністю зв'язувати вільні радикали. Такий механізм дії притаманний і фосфатидилхоліновим ліпосомам [8]. Отже, часткова нормалізація ендотеліальної дисфункції може бути викликана антиоксидантними властивостями як самого кверцетину, так і його фосфоліпідного оточення. Антиоксидантна дія ліпофлавону призводить до зменшення кількості пероксидних радикалів, що також може підвищувати біодоступність оксиду азоту, що синтезується ендотелієм.

ВИСНОВКИ. 1. γ-опромінення призводить до значного пригнічення ендотелійзалежних реакцій аорти як щурів, так і морських свинок, проте між ними існують відмінності в динаміці розвитку ендотеліальної дисфункції.

2. В аорті морських свинок представлена тільки NO-компонента ЕЗР, тоді як в аорті щурів існує, щонайменше, ще один діючий фактор (EDHF).

3. Препарат "Ліпофлавон" за умов in vitro (0,6 мг/мл) для обох видів тварин та при його внутрішньоочеревинному введенні щурам у пострадіаційний період (10 мг/кг маси тіла) викликає відновлення ЕЗР в аорті опромінених тварин і може бути використаний для корекції судинних патологій при радіаційних пошкодженнях та як складова комплексної променевої терапії при лікуванні онкологічних захворювань.

ЛІТЕРАТУРА

1. Воробьев В.И., Степанов Р.П. Ионизирующее облучение и кровеносные сосуды. – М.: Энергоатомиздат, 1985. – 296 с.

2. Lee J.D., Choi H.C., Kang Y.J. et al. Effects of Antioxidants on the Gamma-Radiation Damage of the Cultured Vascular Smooth Mucle Cells of Rat Aorta // Korean J. Physiol. Pharmacol. – 2007. – **11**. – P. 189-195.

3. Olszanecki R., Gebska A., Kozlovski V., Gryglewski R. Flavonoids and nitric oxide synthase // J. Physiol. Pharmacol. – 2002. – **53**, № 4. – P. 571-584.

4. Sanchez M., Lodi F., Vera R. et al. Quercetin and Isorhamnetin Prevent Endothelial Dysfunction, Superoxide Production, and Overexpression of $p47^{phox}$ Induced by Angiotensin II in Rat Aorta // Am. J. Nutr. – 2007. – **137**. – P. 910-915.

5. Shimoi K., Robak J., Tsai S. et al. Radioprotective effect of antioxidative flavonoids in gamma-ray irradiated mice // Carcinogenesis. – 1994. – **15**, № 11. – P. 2669-2672.

6. Soloviev A.I., Tishkin S.M., Parshikov A.V. et al. The EDHF-dependent but not the NO-dependent component of the acetylcholine-induced relaxation of the rabbit aorta resistant to ionized radiation // EDHF. – 2000. – London and New York: Taylor & Francis, 2001. – P. 400-410.

7. Soloviev A., Stefanov A., Tishkin S. et al. Mechanisms of endothelial dysfunction after ionised irradiation: selective impairment of the nitric oxide component of endothelium-dependent vasodilatation // Br. J. Pharmacol. – 2003. – **138**. – P. 837-844.

8. Soloviev A., Stefanov A., Tishkin S. et al. Saline containing phosphatidylcholine liposomes possess the ability to restore endothelial function damaged resulting from G-irradiation // J. Physiol. Pharmacol. – 2002. – **53**, № 4. – P. 701-712.

9. Tishkin S., Rekalov V., Ivanova I., Soloviev A. Ionizing non-fatal whole-body irradiation inhibits Ca^{2+}-dependent K^+ channels in endothelial cells of coronary artery: Possible contribution to depression of endothelium-dependent vascular relaxation // Int. J. Radiat. Biol. – 2007. – **83**. – P. 161-169.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ПРЕПАРАТОМ "ЛИПОФЛАВОН" СОСУДИСТОЙ ДИСФУНКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ ВЛИЯНИЕМ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ

О.В. Кислова, И.В. Иванова, А.И. Соловьев
ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ, КИЕВ

Резюме

Действие ионизирующей радиации вызывает максимальное снижение эндотелийзависимого расслабления аорты крыс с 91 к 43 % через 30 суток после γ-облучения, а аорты морских свинок – с 32 к 3 % через 9 суток. Добавление препарата "Липофлавон" в буферный раствор (0,6 мг/мл) и его внутрибрюшинное введение через 1 час после облучения (10 мг/кг массы тела) вызывают восстановление ацетилхолининдуцированных реакций сегментов аорты облученных животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **γ-облучение, аорта, эндотелийзависимое расслабление, антиоксидантные свойства, ацетилхолин.**

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF VASCULAR DYSFUNCTION FOLLOWING RADIATION BY "LIPOFLAVONE"

O.V. Kyslova, I.V. Ivanova, A.I. Soloviev
INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF AMS OF UKRAINE, KYIV

Summary

It was shown that γ-irradiation reduced the endothelium-dependent relaxation in rat aorta: from 91 to 43 % (in 30 after γ-irradiation) and from 32 to 3 %in guinea pigs (in 9 days after-irradiation). "Lipoflavone" effectively restored endothelium-dependent relaxation in aorta from irradiated animals when it was added to the bath solution (0,6 mg/ml) or it was injected to the animals intraperitoneally (10 mg/kg) 1 hour after irradiation impact.

KEY WORDS: **γ-irradiation, aorta, endothelium-dependent relaxation, antioxidant properties, acetylcholine.**

Отримано 23.06.2008 р.

Адреса для листування: *О.В. Кислова, вул. Е. Потьє, 14, кв. 115, Київ, 03057, Україна.*

УДК 615.015:591.4:616-009.12:611

МЕХАНІЗМИ РЕНОПРОТЕКТОРНОЇ АКТИВНОСТІ СИМВАСТАТИНУ ПРИ ЙОГО ПОЄДНАННІ З ТРИМЕТАЗИДИНОМ, ТІОТРИАЗОЛІНОМ, ТАУРИНОМ ТА УБІХІНОНОМ У ЩУРІВ З ГІПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМІЄЮ

О.П. Данченко
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА, ВІННИЦЯ

Гіперхолестеринова дієта впродовж 1 місяця призводить до накопичення холестерину і тригліцеридів у нирках щурів, пригнічення їх фільтраційної здатності, пошкодження тубулярного апарату, ініціювання оксидативного стресу та процесів фіброгенезу. Симвастатин сповільнює розвиток холестериніндукованих пошкоджень нирок. Найбільше протекторний ефект симвастатину посилює триметазидин, меншою мірою – тіотриазолін, таурин та убіхінон.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **гіперхолестеринемія, симвастатин, триметазидин, тіотриазолін, убіхінон, нирки.**

ВСТУП. Відомо, що тривала гіперліпідемія ініціює запальні та фіброгенні зміни в нирках [17]. Призначення статинів призупиняє прогресування ниркової патології та зменшує ризик кардіоваскулярної смерті [6]. Однак використання статинів супряжене з ризиком їх несприятливої дії на тубулярний апарат нирок та іншими токсичними ефектами [18]. Одним із шляхів оптимізації терапії статинами є їх поєднання з препаратами, які б мінімізували несприятливу дію статинів при збереженні їх терапевтичного ефекту. До таких препаратів можна віднести триметазидин, тіотриазолін, таурин та убіхінон, які проявляють цитопротекторну дію. Однак, якою мірою вони посилюють ренотропні ефекти симвастатину і через які біохімічні механізми опосередковується їх дія, залишається невідомим.

Метою роботи було оцінити вплив симвастатину і його поєднання з триметазидином, тіотриазоліном, таурином та убіхіноном на функціональний стан нирок, активність прооксидантних та антиоксидантих ферментів, вміст продуктів пероксидації в нирках щурів з гіперхолестеринемією (ГХС).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 85 білих щурах-самцях масою 180-230 г. Інтактних щурів (1-ша група) утримували на сухому кормі. Тварини всіх інших груп отримували 4 тижні гіперхолестеринову дієту, що містила 3 % холестерину, 0,12 % метилтіоурацилу (ГХС дієта). Тварини 2-ї групи слугували нелікованим контролем, а щури наступних груп на тлі ГХС дієти перорально отримували симвастатин в дозі 60 мг/кг (3-тя група) або симвастатин разом із препаратами-коректорами (4-7 групи). Триметазидин застосовували в дозі 10 мг/кг (4-та група), тіотриазолін – в дозі 50 мг/кг (5-та група), таурин – в дозі 200 мг/кг (6-та група) чи препарат убіхінону кудесан – в дозі 10 мг/кг (7-ма група). Симвастатин та препарати-коректори вводили 28 днів перорально за допомогою зонда. Евтаназію здійснювали під ефірним наркозом.

Функціонування канальцевого апарату нирок оцінювали за екскрецією білка та гамма-глутамілтрансферази (ГГТФ) із сечею, а фільтраційну функцію нирок – за кліренсом креатиніну. Сечу збирали протягом 8 год після водного навантаження з розрахунку 2 мл води на 100 г маси. Рівень креатиніну, білка та ГГТФ визначали відомими методами [4]. Активність ниркової синтази оксиду азоту визначали за екскрецією нітратів і нітритів [15]. Вміст останніх визначали за реакцією Гріса після відновлення нітратів зависсю цинкового порошку в розчині аміаку [2].

Нирки перфузували холодним 0,154 М розчином калію хлориду та отримували субклітинні фракції. У постмітохондріальній фракції визначали: активність ксантиноксидази (КФ 1.1.3.22) – за утворенням сечової кислоти [16], NADPH-оксидази (КФ 1.6.3.1) – за зниженням поглинання NADPH при 340 нм [9], вміст малонового діальдегіду (МДА) – за реакцією з тіобарбітуровою кислотою, білкових карбонільних груп – за реакцією з 2,4-динітрофенілгідразином [13]. Ліпіди з гомогенату нирок екстрагували

© О.П. Данченко, 2009.

за методом Фольча. Вміст загального холестерину (ЗХС) та тригліцеридів (ТГ) визначали відомими методами [4]. Аліквоту деліпідованого гомогенату гідролізували в 6 М соляній кислоті при 105 °С протягом 24 год і визначали вміст оксипроліну [3].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Проведені дослідження показали (табл. 1), що ГХС дієта викликала зростання в 2,6 раза ЗХС та на 18 % вмісту ТГ в сироватці крові щурів. Симвастатин вірогідно зменшував вміст ЗХС та нормалізував вміст ТГ в сироватці крові цих тварин. Триметазидин та препарат убіхінону відносно слабо (на рівні тенденції) посилювали гіполіпідемічну дію симвастатину, тоді як тіотриазолін та, особливо, таурин вірогідно її посилювали.

ГХС дієта викликала накопичення в нирках холестерину (ХС) (в 2,1 раза) та ТГ (в 1,8 раза), а введення симвастатину вірогідно перешкоджало зростанню цих ліпідів – рівень ХС і ТГ в нирках підвищувався лише в 1,65 та 1,38 раза. Триметазидин та убіхінон майже не впливали на гіполіпідемічну дію симвастатину, тіотриазолін і, особливо, таурин достовірно її посилювали, і рівень ХС в нирках відрізнявся від контролю лише в 1,34 та 1,23 раза, а вміст ТГ – в 1,19 та 1,13 раза.

Разом із тим, навантаження щурів холестерином посилювало процеси фіброгенезу в нирках, що проявлялось зростанням на 48,8 % рівня специфічного компонента колагенових білків – оксипроліну. Симвастатин суттєво зменшував зростання вмісту оксипроліну в нирках, рівень якого відрізнявся від такого в інтактних тварин на 27,6 %. Усі застосовані препарати вірогідно посилювали антифіброгенну дію симвастатину, хоча найбільшою мірою це стосувалось триметазидину, дещо менше – тіотриазоліну і таурину, а найменше – убіхінону.

Таблиця 1 – **Рівень ліпідів у сироватці крові, вміст ліпідів і оксипроліну в нирках щурів з ГХС після 28-денного введення симвастатину та його поєднань з триметазидином, тіотриазоліном, таурином чи убіхіноном (M±m)**

Групи тварин	Сироватка крові		Нирки		
	ЗХС, ммоль/л	ТГ, ммоль/л	ЗХС, мкмоль/г	ТГ, мкмоль/г	Оксипролін, мг/г
Інтактні, n=17	2,03±0,08	1,24±0,07	7,59±0,31	1,83±0,10	4,92±0,19
Навантаження холестерином					
Неліковані, n=14	5,34±0,15*	1,46±0,05*	16,1±0,42*	3,23±0,13*	7,32±0,20*
Симвастатин, n=17	3,77±0,16*	1,23±0,09	12,5±0,33	2,53±0,08*	6,28±0,14*
Симвастатин + триметазидин, n=9	3,13±0,30*	1,21±0,14	11,5±0,50*	2,42±0,12*	5,60±0,14*
Симвастатин + тіотриазолін, n=9	2,95±0,20*	1,05±0,09	10,2±0,54*	2,17±0,13	5,58±0,13*
Симвастатин + таурин, n=8	2,47±0,12*	1,02±0,04*	9,36±0,32*	2,06±0,10	5,66±0,18*
Симвастатин + убіхінон, n=8	3,39±0,15*	1,10±0,06	11,3±0,48*	2,44±0,11*	5,95±0,14*

Примітки: 1. Вміст холестерину та тригліцеридів виражено на 1 г вологої маси нирок, а вміст оксипроліну – на 1 г сухої маси нирок.

2. * – вірогідні відмінності щодо інтактних щурів.

Дані таблиці 2 свідчать про те, що ГХС дієта викликала пошкодження клубочкового апарату нирок, на що вказували невелике (на 22 %), але вірогідне збільшення вмісту креатиніну в сироватці крові та зниження на 28 % фільтраційної здатності нирок. Пошкоджувався і тубулярний апарат нирок, що підтверджувалось зростанням в 2,35 та 2,58 раза екскреції із сечею білка і ГГТФ, та пригнічувалось утворення оксиду азоту, що проявлялось зниженням в 2,11 раза екскреції нітратів та нітритів. Симвастатин зменшував негативний вплив ГХС на нирки, що проявлялось достовірно більшими величинами клубочкової фільтрації, посиленням утворення метаболітів оксиду азоту, зменшенням виразності протеїн- та ензимурії. Найбільшою мірою посилював ренопротекторну дію симвастатину триметазидин. Тіотриазолін і таурин дещо поступались триметазидину, а ефект убіхінону був найменшим.

ГХС дієта викликала явища оксидативного стресу та посилювала процеси фіброгенезу в нирках (табл. 3). Це проявлялось зростанням в 2,48 і 1,99 раза активності NADPH-оксидази та ксантиноксидази, підвищенням в 2,05 та 2,11 раза вмісту карбонільних груп і МДА в постмітохондріальній фракції нирок. Симвастатин суттєво зменшував індуковані гіперхолестеринемією зміни біохімічного статусу нирок. Тому, порівняно з інтактними щурами, активність NADPH-оксидази та ксантиноксидази, вміст карбонільних груп, МДА відрізнялись лише в 1,79, 1,51, 1,53 та 1,55 раза. Застосовані препарати вірогідно посилювали антиоксидантні ефекти симвастатину, однак найбільшою мірою ці властивості були

Таблиця 2 – **Функціональний стан нирок щурів з ГХС після 28-денного введення симвастатину та його поєднань з триметазидином, тіотриазоліном чи убіхіноном (M±m)**

Групи тварин	Креатинін сироватки крові, мкмоль/л	Клубочкова фільтрація, мл/хв	Білок сечі, мг/8 год	ГГТФ сечі, нмоль/ хв/мл	Нітрити та нітрати, мкмоль/ 8 год
Інтактні, n=17	60,8±2,21	0,79±0,019	5,23±0,36	0,99±0,06	3,86±0,15
Навантаження холестерином					
Неліковані, n=17	74,2±1,90*	0,57±0,020*	12,3±0,60*	2,55±0,13*	1,83±0,07*
Симвастатин, n=14	68,0±2,04*	0,67±0,020*	9,40±0,31*	1,93±0,08*	2,55±0,09*
Симвастатин + триметазидин, n=9	63,0±2,56	0,77±0,032	6,63±0,41*	1,32±0,08*	3,23±0,12*
Симвастатин + тіотриазолін n=9	65,1±2,55	0,74±0,021	6,82±0,42*	1,29±0,10*	3,02±0,11*
Симвастатин + таурин, n=8	66,6±2,27	0,75±0,019	7,05±0,29*	1,31±0,10*	3,08±0,12*
Симвастатин + убіхінон, n=8	67,1±2,21	0,72±0,021*	8,20±0,30*	1,55±0,11*	2,89±0,12*

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – вірогідні відмінності щодо інтактних щурів.

Таблиця 3 – **Активність NADPH-оксидази, ксантиноксидази, вміст карбонільних груп та МДА в постмітохондріальній фракції нирок щурів з ГХС після 28-денного введення симвастатину та його поєднань з триметазидином, тіотриазоліном, таурином чи убіхіноном (M±m)**

Групи тварин	NADPH-оксидаза, нмоль/хв на 1 мг білка	Ксантиноксидаза, нмоль/хв на 1 мг білка	Карбонільні групи білків, нмоль/мг білка	МДА, нмоль/ мг білка
Інтактні, n=17	1,90±0,14	2,19±0,13	2,10±0,10	8,26±0,37
Навантаження холестерином				
Неліковані, n=17	4,71±0,16*	4,36±0,14*	4,30±0,15*	17,4±0,68*
Симвастатин, n=17	3,40±0,08*	3,30±0,09*	3,22±0,11*	12,8±0,42*
Симвастатин + триметазидин, n=9	2,68±0,13*	2,80±0,15*	2,68±0,11*	10,4±0,58*
Симвастатин + тіотриазолін, n=9	2,61±0,12*	2,76±0,12*	2,62±0,13*	10,2±0,55*
Симвастатин + таурин, n=8	2,68±0,16*	2,80±0,14*	2,76±0,14*	10,5±0,58*
Симвастатин + убіхінон, n= 8	2,89±0,17*	2,89±0,12*	2,82±0,16*	10,6±0,57*

притаманними триметазидину, потім тіотриазоліну і таурину, а найменше – убіхінону.

Додаткові докази негативного впливу ГХС на функціональний стан нирок було отримано завдяки кореляційному аналізу (табл. 4). Виявлено вірогідні кореляційні залежності між накопиченням ХС в нирках та сироватці крові – з одного боку та показниками, що відображають функціональний стан нирок і процеси пероксидації ліпідів і білків у нирках, – з іншого. При цьому рівень ХС в нирках більшою мірою впливав на зазначені процеси, ніж рівень ХС в сироватці крові. Вміст ТГ в нирках також достовірно корелював з погіршенням функціонального стану нирок та посиленням процесів пероксидації в нирках, тоді як рівень ТГ в сироватці крові доволі слабо асоціювався зі станом нирок.

Таблиця 4 – **Кореляційний зв'язок між рівнем ХС та ТГ в сироватці крові й нирках та показниками пошкодження нирок у щурів з гіперхолестеринемією (n=32)**

Показники	Сироватка крові		Нирки	
	ЗХС	ТГ	ЗХС	ТГ
Креатинін сироватки крові	0,40*	0,27	0,47*	0,34
Клубочкова фільтрація	0,47*	0,31	0,51*	0,39*
Білок в сечі	0,48*	0,29	0,57*	0,43*
ГГТФ сечі	0,48*	0,35	0,56*	0,41*
Нітрити та нітрати сечі	-0,49*	-0,29	-0,51*	-0,40*
NADPH-оксидаза нирок	0,44*	0,36	0,56*	0,48*
Ксантиноксидаза нирок	0,44*	0,33	0,50*	0,39*
Карбонільні групи білків нирок	0,47*	0,23	0,49*	0,42*
МДА	0,47*	0,17	0,54*	0,45*
Оксипролін нирок	0,42*	0,22	0,47*	0,38*

Примітка. * – вірогідні коефіцієнти кореляції.

Таким чином, наші дослідження свідчать про те, що ГХС дієта пригнічує фільтраційну здатність нирок, викликає пошкодження тубулярного апарату, ініціює оксидативні пошкодження та процеси фіброгенезу. На здатність ГХС пригнічувати нирковий кровотік та викликати констрикторне ремоделювання ниркових судин і розвиток гломерулярного та тубулоінтерстиціального склерозу вказують і дані літератури [8]. На нашу думку, зазначені зміни можна пов'язати з посиленим утворенням активних форм кисню, про що свідчить значне зростання активності NADPH-оксидази, ксантиноксидази, рівнів МДА та карбонільних груп. Відомо, що активні форми кисню проявляють пряму вазоконстрикторну дію, нейтралізують дію оксиду азоту і є активаторами процесів фіброгенезу в нирках [7].

Наші дослідження свідчать про те, що застосування симвастатину дозволяє суттєво сповільнити розвиток холестериніндукованих пошкоджень нирок у щурів, хоча повністю зупинити їх не вдається. Ренопротекторний потенціал симвастатину суттєво посилюється завдяки використанню препаратів-коректорів. Спільною рисою цих препаратів є наявність у них антиоксидантних властивостей. Відомо, що тіотриазолін здатен знижувати рівень пероксинітриту та супероксидного радикала і посилювати активність антиоксидантних ферментів [1], триметазидин активує антиоксидантні ферменти [5], убіхінон може безпосередньо зв'язувати супероксидні радикали та блокувати їх утворення NADPH-оксидазою [14], таурин діє як перехоплювач вільних радикалів кисню [10]. Про наявність саме антиоксидантного елемента в механізмі посилення нефропротекторної дії симвастатину свідчить і те, що поєднання симвастатину з цими речовинами забезпечувало більше зниження активності прооксидатних ферментів – NADPH-оксидази та ксантиноксидази, ніж симвастатин сам по собі.

Найбільшою мірою ренопротекторна дія симвастатину посилювавлась триметазидином. Відомо, що триметазидин, крім антиоксидантних, проявляє ще й протиішемічні властивості, а також сприяє посиленню синтезу АТФ за рахунок переключення енергетичного метаболізму з окиснення жирних кислот на окиснення глюкози [11]. Триметазидин краще, ніж інші препарати-коректори, сприяє відновленню синтезу вазодилататорної молекули – оксиду азоту, адже екскреція метаболітів оксиду азоту – нітратів і нітритів є найвищою саме у тварин, які отримували симвастатин разом з триметазидином.

Таким чином, завдяки застосуванню препаратів-коректорів вдається суттєво посилити ренопротекторні властивості симвастатину. На нашу думку, пацієнтам, у яких порушення ліпідного обміну поєднуються з ураженнями нирок (діабетична чи гіпертонічна нефропатія і т.д.), доцільно призначати симвастатин в поєднанні з триметазидином чи іншими препаратами-коректорами. Особливо слід відмітити, що цим препаратам притаманна і здатність суттєво посилювати протифіброгенні властивості симвастатину, адже процеси нефросклерозу є провідними в механізмах прогресування ниркової патології при гіпертонічній хворобі, цукровому діабеті та інших захворюваннях.

ВИСНОВКИ. 1. Перебування щурів протягом 1 місяця на ГХС дієті супроводжується зниженням клубочкової фільтрації, протеїн- і ензимурією, посиленням процесів фіброгенезу (зростання вмісту оксипроліну в нирках), розвитком оксидативного стресу (збільшення активності NADPH-оксидази та ксантиноксидази, вмісту МДА), зменшенням продукування нирками нітратів та нітритів. Ступінь накопичення ХС і ТГ в нирках вірогідно корелює з погіршенням функціонального стану нирок та посиленням процесів фіброгенезу і пероксидації.

2. Симвастатин знижує негативний вплив ГХС на функціональний стан нирок, зменшує накопичення в нирках щурів ХС та ТГ, послаблює явища оксидативного стресу і фіброгенезу.

3. Ренопротекторний ефект симвастатину найбільше посилюється триметазидином, меншою мірою тіотриазоліном і таурином, найменше – убіхіноном. Водночас триметазидин та убіхінон слабко, а тіотриазолін та таурин більшою мірою посилювали гіполіпідемічну дію симвастатину.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бєленічев І.Ф., Мазур І.А., Волошин М.А. Механізм енерготропної та антиоксидантної дії тіотриазоліну // Ліки. – 2006. – № 1-2. – С. 23-29.

2. Коренман И.М. Методы определения органических соединений. – М.: Химия, 1975. – 360 с.

3. Кузнєцова Т.П., Прошина Л.Я., Привалено М.Н. Модификация метода определения содержания оксипролина в сыворотке крови // Лаб. дело. – 1982. – № 8. – С. 8-13.

4. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.

5. Тихазе А.К., Ланкин В.З., Жарова Е.А., Колычева С.В. Триметазидин как антиоксидант

непрямого действия // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2000. – **130**, № 10. – С. 395-398.

6. Agarwal R. Effects of statins on renal function // Mayo Clin. Proc. – 2007. – **82**, № 11. – P. 1381-1390.

7. Djamali A. Oxidative stress as a common pathway to chronic tubulointerstitial injury in kidney allografts // Am. J. Physiol Renal Physiol. – 2007. – **293**, № 2. – P. F445-455.

8. Eddy A.A. Interstitial fibrosis in hypercholesterolemic rats: role of oxidation, matrix synthesis, and proteolytic cascades // Kidney Int. – 1998. – **53**, № 5. – P. 1182-1189.

9. Fukui T., Ishizaka N., Rajagopalan S. et al. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats // Circ. Res. – 1997. – **80**, № 1. – P. 45-51.

10. Hanna J., Chahine R., Aftimos G. et al. Protective effect of taurine against free radicals damage in the rat myocardium // Exp. Toxicol. Pathol. – 2004. – **56**, № 3. – P. 189-194.

11. Kantor P.E., Lucien A., Kozak R., Lopashuk G.D. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy methabolism from fatty acid oxydation to glucose oxydation by inhibiting mitochondrial Long Chain 3-Ketoacyl-Coenzym A Thiolase // Circ. Res. – 2000. – **86**. – P. 580-588.

12. Kaur H., Padi S.S., Chopra K. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury by trimetazidine: evidence of an in vivo antioxidant effect // Methods Find Exp Clin Pharmacol. – 2003. – **25**, № 10. – P. 803-809.

13. Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins // Methods Enzymol. – 1994. – **233**. – P. 346-357.

14. Morre D.M., Morre D.J. Specificity of coenzyme Q inhibition of an aging-related cell surface NADH oxidase (ECTO-NOX) that generates superoxide // Biofactors. – 2003. – **18**, № 1-4. – P. 33-43.

15. Sierra M., Gonzalez A., Gomez-Alamillo C. et al. Decreased excretion of nitrate and nitrite in essential hypertensives with renal vasoconstriction // Kidney Int. Suppl. – 1998. – **68**. – P. 10-13.

16. Suzuki H., DeLano F.A., Parks D.A. et al. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – **95**, № 8. – P. 4754-4759.

17. Trevisan R., Dodesini A.R., Lepore G. Lipids and renal disease // J. Am. Soc. Nephrol. – 2006. – **17.** – P. S145-147.

18. van Zyl-Smit R., Firth J.C., Duffield M., Marais A.D. Renal tubular toxicity of HMG-CoA reductase inhibitors // Nephrol. Dial. Transplant. – 2004. – **19**, № 12. – P. 3176-3179.

МЕХАНИЗМЫ РЕНОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ СИМВАСТАТИНА ПРИ ЕГО СОЧЕТАНИИ С ТРИМЕТАЗИДИНОМ, ТИОТРИАЗОЛИНОМ, ТАУРИНОМ И УБИХИНОНОМ У КРЫС С ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИЕЙ

О.П. Данченко

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

Резюме

Гиперхолестериновая диета на протяжении 1 месяца приводит к накоплению холестерина и триглицеридов в почках крыс, угнетению их фильтрационной способности, повреждению тубулярного аппарата, инициации оксидативного стресса и процессов фиброгенеза. Симвастатин замедляет развитие холестерин-индуцированных повреждений почек. Наиболее протекторный эффект симвастатина усиливает триметазидин, в меньшей степени – тиотриазолин, таурин и убихинон.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **гиперхолестеринемия, симвастатин, триметазидин, тиотриазолин, убихинон, почки.**

MECHANISMS OF RENOPROTECTIVE SIMVASTATIN ACTIVITY TO CONCOMINANT USE OF TRIMETAZIDINE, THIOTRIAZOLINE, TAURINE, UBIQUINONE IN RATS WITH HYPERCHOLESTEROLEMIA

O.P. Danchenko

NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY M.I. PYROHOV, VINNYTSIA

Summary

High-cholesterol diet for a 1 month in rats results in led to renal accumulation of cholesterol and triglycerides in rat kidneys, glomerular filtration depression, tubular injury, initiation of oxidative stress and fibrogenesis processes. Simvastatin delays the development of cholesterol-induced renal injuries. Supplementation of trimetazidine to simvastatin enhances more effectively nephroprotective effect, thiotriazoline as well as taurine and ubiquinone have the weaker effect.

KEY WORDS: **hypercholesterolemia, simvastatin, trimetazidine, thiotriazoline, taurine, ubiquinone, kidneys.**

Отримано 25.07.2008 р.

Адреса для листування: *О.П. Данченко, Національний медичний університет ім. М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна.*

УДК 615.35.015:577.15:615.243:615.272

ПОШУК ПЕРСПЕКТИВНИХ КОРЕКТОРІВ УЛЬЦЕРОГЕННОЇ ДІЇ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОЇДІВ

Дарвіш Алі Хусейн[1], Д.В. Семенів[2], Т.О. Куценко[2]
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ[1], ХАРКІВ
ІВАНО-ФРАНКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ[2]

Проведено порівняльне вивчення ефективності різних препаратів з противиразковою активністю за умов виразкового ураження шлунка, викликаного введенням спирто-преднізолонової суміші. Встановлено, що досліджувані препарати здатні різною мірою пригнічувати перебіг виразкового процесу. Цей факт може бути пояснений особливостями фармакологічних властивостей кожного з них. З огляду на результати експерименту, емоксипін, корвітин, вісмуту субцитрат можна назвати препаратами вибору для корекції ускладнень терапії ГКС. Застосування ж інших препаратів з цією метою рекомендують тільки за умови підбору оптимального режиму введення або комбінування їх один з одним чи вищеназваними більш ефективними препаратами для підсилення противиразкового ефекту, що є перспективою подальших досліджень.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **гастротоксичність глюкокортикостероїдів, противиразкові препарати.**

ВСТУП. Загальновідомо, що однією з найбільш небезпечних фармакологічних груп препаратів щодо ульцерогенності є глюкокортикостероїди (ГКС). Незважаючи на те, що ГКС – життєво необхідні препарати, їх цінність та клінічне застосування обмежуються завдяки великій кількості побічних ефектів, зокрема вираженій ульцерогенній дії, яка прямо пов'язана з їх механізмом дії [4, 5]. Дана проблема зумовлює необхідність пошуку шляхів корекції ГКС-індукованих гастропатій, головним чином, шляхом одночасного призначення гастропротекторних препаратів.

З цією метою експериментаторами та клініцистами запропонована ціла низка препаратів, серед яких як засоби традиційної противиразкової терапії, так і препарати-представники інших фармакологічних груп, що мають противиразкову активність [3-6, 8, 12]. Однак відомості щодо їх порівняльної ефективності в літературі не однозначні.

Тому метою нашого дослідження стало порівняльне вивчення (згідно з вимогами доказової медицини: використання однакових моделей, інформативних показників, виду тварин та ін.) гастропротекторної дії різних препаратів з противиразковою дією при ГКС-індукованому виразковому ураженні шлунка.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктами нашого порівняльного дослідження стали препарати, що відрізняються за механізмом та місцем противиразкової дії в патогенезі виразкоутворення, викликаного застосуванням ГКС, таких, як корвітин, емоксипін, гідрофільна субстанція аронії чорноплідної (стандартизований сік плодів аронії), ліпофільна субстанція аронії чорноплідної (олія плодів аронії), вісмуту субцитрат, калефлон, актовегін, метилурацил, гастрофіт, олія обліпихи, фамотидин. Вибір вказаних препаратів обумовлений тим, що для них раніше вже було доведено наявність противиразкової дії у клініці та/або експерименті, однак вони відрізняються один від одного за джерелом одержання, механізмом противиразкової дії, спектром фармакодинаміки [1, 7-11].

Так, корвітин є кверцетинвмісним препаратом з покращеними, порівняно з останнім, параметрами фармакокінетики (лікарська форма кверцетину для внутрішньовенного введення) та вираженими антиоксидантними, мембраностабілізувальними, противиразковими і протизапальними властивостями, притаманними цьому флавоноїду [1].

Емоксипін – новий синтетичний антиоксидант, похідне 3-оксипіридину, має виражені мембранопротекторні властивості, що призводять до збереження структурно-функціональної організації тканин слизової оболонки шлунка (СОШ), нормалізації транспорту нейромедіаторів, посилення синаптичної передачі, а також володіє стреспротекторним ефектом [9].

Олія та сік аронії чорноплідної – нові перспективні субстанції рослинного походження, що містять суми біологічно активних речовин (БАР) з різноплановою фармакологічною ак-

© Дарвіш Алі Хусейн, Д.В. Семенів, Т.О. Куценко, 2009.

тивністю, основними компонентами яких є каротиноїди та флавоноїди відповідно [10].

Олія обліпихи – традиційний рослинний каротинвмісний препарат з вираженими репаративними властивостями [8, 10].

Калефлон – екстракт квіток календули, що має спазмолітичну, антимікробну та протизапальну дії [7, 8].

Рослинний збір гастрофіт – композиція з 12 трав, яку широко застосовують у гастроентерології [8].

Актовегін – коректор мікроциркуляції з антиоксидантним ефектом, що останнім часом запропонований як складова комплексної схеми противиразкової терапії [11].

Метилурацил – синтетичний репарант, який традиційно застосовують при виразкових ураженнях ШКТ [8].

Вісмуту субцитрат – добре відомий синтетичний противиразковий препарат з гастропротекторним, антимікробним, протизапальним, в'яжучим та антацидним ефектами [8].

Фамотидин – класичний антисекреторний препарат [8].

Моделлю експериментальної патології, що відтворює гастротоксичну дію ГКС, було обрано модель спирто-преднізолонового ураження СОШ, яка описана у Методичних рекомендаціях ДФЦ МОЗ України [2]. Застосування даної комбінації зумовлене тим, що під впливом стероїдного гормону відбувається інгібування синтезу простагландинів, які є цитопротекторами, внаслідок чого порушується трофіка СОШ, знижується енергетичне та пластичне забезпечення тканин та підсилюється вплив агресивних факторів шлункового соку. Крім того, введення кортикостероїдів супроводжується вираженим стресом, призводить до порушення їх співвідношення з адренокортикотропним гормоном, підсилює шлункову секрецію та циркуляторну ішемію ворсинок СОШ, порушує процеси ПОЛ, виділення вільних радикалів, а також слизоутворення. На тлі цього гастродеструктивні властивості етанолу збільшуються в десятки разів, а підібрана емпірично концентрація етанолу (80 %) викликає дегідратацію та коагуляційний некроз СОШ [2, 6].

Крім того, відомо, що механізм сумарної ульцерогенної дії інгібіторів біосинтезу простагландинів та етанолу пояснюється здатністю β-ізоферменту алкогольдегідрогенази окиснювати як етанол, так і стероїди. Загальний шлях їх метаболізму є фактором, що сприяє більш вираженому ульцерогенезу [6].

Таким чином, преднізолон та етиловий спирт потенціюють ульцерогенну дію один одного, що є необхідним для досягнення 100 % відтворюваності моделі та дозволяє з більшою точністю говорити про гастропротекторні властивості досліджуваних препаратів навіть в умовах гострої моделі [2, 6].

Спирто-преднізолонову суміш у наших дослідах (преднізолон в дозі 20 мг/кг та етиловий спирт 80 % із розрахунку 0,6 мл на 100 г маси тварини) вводили безпородним білим щурам, яких попередньо витримали 24 год в голоді без обмеження пиття води, внутрішньошлунково одноразово.

Препарати, що вивчалися, вводили у добовій умовно-терапевтичній дозі (запозиченій з даних літератури або визначеній у ході раніше проведених нами досліджень) одноразово внутрішньошлунково за 1 год до введення спирто-преднізолонової суміші.

Після закінчення досліду (через 24 год після введення ульцерогенної суміші) тварин виводили з експерименту в умовах евтаназії, шлунки вилучали та проводили їх макроскопічне вивчення.

Інтенсивність виразкового ураження та противиразкову активність препаратів визначали за показниками утворення виразкових дефектів у СОШ: процентом тварин з виразками в групі, середньою площею виразок, виразковим індексом, які дозволили розрахувати інтегральний показник терапевтичного ефекту препаратів – противиразкову активність (ПВА, %), значення якої наведено в цій статті.

У наших експериментах кожна група щурів складалася з 6 голів. Тварини, які були у групах інтактного контролю (здорові щури) та контрольної патології (неліковані щури з модельною патологією), не отримували лікування. Решті груп вводили досліджувані препарати у таких дозах: корвітин – 5 мг/кг (у перерахунку на кверцетин), емоксипін – 40 мг/кг, гідрофільна субстанція аронії чорноплідної (ГСА) (стандартизований сік аронії) – 2 мл/кг, ліпофільна субстанція аронії чорноплідної (олія аронії) – 0,1 г/кг, вісмуту субцитрат – 29 мг/кг, метилурацил – 500 мг/кг, калефлон – 50 мг/кг, актовегін – 12 мг/кг, гастрофіт – 10 мл/кг, олія обліпихи – 0,1 г/кг, фамотидин – 20 мг/кг. Корвітин вводили внутрішньовенно, актовегін та емоксипін – внутрішньом'язово, інші препарати – внутрішньошлунково.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У ході експерименту встановлено, що в групі інтактного контролю змін СОШ та її звиразкування не спостерігалося, а у нелікованих тварин (контрольна патологія) мало місце інтенсивне ви-

разкоутворення, що супроводжувалося гіперемією, набряком, порушенням складчастості СОШ, появою геморагій у ній. Проводячи порівняльну оцінку результатів макроскопічного вивчення СОШ щурів в умовах спирто-преднізолонової виразки (рис. 1), за показником ПВА (розрахованим відносно групи тварин контрольної патології), слід відмітити, що досліджувані препарати різною мірою здатні коректувати гастротоксичну дію спирто-преднізолонової суміші.

Так, в результаті експерименту встановлено, що досліджувані препарати за величиною їх противиразкової активності можна розташувати таким чином: емоксипін ≥ корвітин ≥ вісмуту субцитрат > калефлон ≈ олія аронії чорноплідної ≥ сік аронії чорноплідної > актовегін ≈ гастрофіт ≈ метилурацил > олія обліпихи ≥ фамотидин.

Вищесказане свідчить про те, що найбільш ефективними при ураженні шлунка ГКС виявилися емоксипін, корвітин та вісмуту субцитрат, які можна назвати препаратами вибору в цій ситуації. Препаратами другої лінії, за даними нашого порівняльного дослідження, є рослинні препарати на основі аронії чорноплідної та календули. Наступну позицію займають актовегін, гастрофіт та метилурацил, а олія обліпихи та фамотидин виявилися найменш ефективними, виконавши противиразкову дію лише на рівні тенденції.

Така різниця у вираженні противиразкової активності препаратів, а також ранжування їх за активністю, можуть бути пояснені особливостями противиразкової дії досліджуваних препаратів та значенням різних патогенетичних ланок у реалізації ульцерогенної дії ГКС. Так, імовірно, основне місце у розвитку ГКС-гастропатії відводиться не тільки пригніченню біосинтезу простагландинів, але й активації процесів вільнорадикального окиснення та деструкції клітин СОШ з дисметаболічними порушеннями. Саме тому потужні препарати-антиоксиданти та відомий гастропротектор виявились найефективнішими у цій ситуації. Інші препарати, на наш погляд, мають меншу противиразкову активність за рахунок того, що їх антиоксидантна дія спостерігається на більш пізніх стадіях процесів вільнорадикального окиснення або ж вони діють односпрямовано на яку-небудь одну (фамотидин, метилурацил) ланку патогенезу ГКС-гастропатії, що не призводить до швидкої та ефективної нормалізації метаболічних і зменшення гастродеструктивних порушень у СОШ.

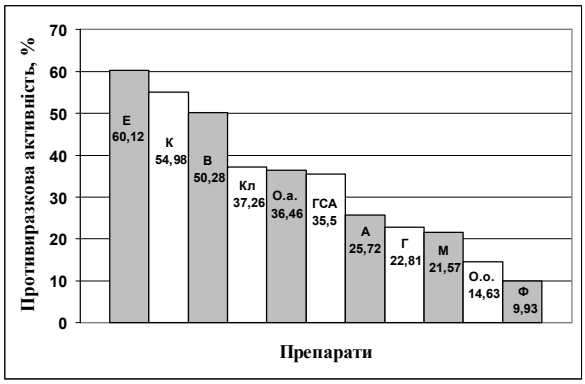


Рис. 1. Порівнювання противиразкової активності досліджуваних препаратів на моделі спирто-преднізолонової виразки у щурів. Примітка: К – корвітин, Е – емоксипін, ГСА – гідрофільна субстанція аронії, О.а. – олія аронії, В – вісмуту субцитрат, М – метилурацил, Кл – калефлон, А – актовегін, Г – гастрофіт, О.о. – олія обліпихи, Ф – фамотидин.

ВИСНОВКИ. Проведене нами порівняльне вивчення ефективності різних препаратів з противиразковою активністю в умовах виразкового ураження шлунка, викликаного введенням спирто-преднізолонової суміші, показало, що досліджувані препарати здатні різною мірою пригнічувати перебіг виразкового процесу, що можна пояснити особливостями фармакологічних властивостей кожного з них. Емоксипін, корвітин, вісмуту субцитрат є препаратами вибору для корекції ускладнень терапії ГКС. Застосування ж інших препаратів з цією метою рекомендують тільки за умови підбору оптимального режиму введення чи комбінування їх один з одним або вищеназваними більш ефективними препаратами для підсилення противиразкового ефекту, що є перспективою наших подальших досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бєлік Г.В. Експериментальне обґрунтування використання ліпосомальної форми кверцетину при серцево-судинних захворюваннях: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – Харків, 2006. – 17 с.

2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.

3. Дроговоз С.М., Куценко Т.О., Кортунова Т.В., Білоусова М.В. Використання антиоксиданту супероксиддисмутази при гострому виразковому ураженні шлунка // Одес. мед. журн. – 2001. – № 5 (67). – С. 9-11.

4. Зборовский А.Б., Тюренков И.Н. Осложнения фармакотерапии. – М.: Медицина, 2003. – 544 с.

5. Змушко Е.И., Белозеров Е.С. Медикаментозные осложнения. – С.Пб.: Питер, 2001. – 448 с.

6. Зупанець І.А., Яковлева Л.В., Прописнова В.В. Обгрунтування використання комбінації етанол-преднізолон у скринінгу гастропротекторів // Клінічна фармація. – 1998. – **2**, № 3. – С. 29-33.

7. Калугіна С.М. Оцінка антиульцерогенної дії калефлону при моделюванні ерозивно-виразкових уражень гастродуоденальної ділянки // Ліки. – 2001. – № 3-4. – С. 88-91.

8. Компендиум 2006 – Лекарственные препараты: В 2 т. / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. – К.: Морион, 2006.

9. Новиков В.Е., Ковалева Л.А., Лосенкова С.О., Климкина Е.И. Фармакология антиоксидантов на основе 3-оксипиридина // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2004. – № 1. – С. 15-26.

10. Семенів Д.В., Ліпкан Г.М., Тиха Н.Б. та ін. Порівняльна оцінка противиразкової дії рослинних олій // Ліки. – 2002. – № 1-2. – С. 111-114.

11. Современная метаболическая терапия при хроническом гастрите и язвенной болезни: Практическое пособие для врачей / Под ред. И.Н. Бойко. – С.Пб.: Невский Фонд, 2006. – 176 с.

12. Уланова В.А., Гладченко О.М. Вивчення дії екстракту шишок хмелю звичайного // Клінічна фармація. – 2007. – **11**, № 4. – С. 48-50.

ПОИСК ПЕРСПЕКТИВНЫХ КОРРЕКТОРОВ УЛЬЦЕРОГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДОВ

Дарвиш Али Хусейн[1], Д.В. Семенив[2], Т.А. Куценко[2]
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ[1], ХАРЬКОВ
ИВАНО-ФРАНКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ[2]

Резюме

Проведено сравнительное изучение эффективности различных препаратов с противоязвенной активностью в условиях язвенного поражения желудка, вызванного введением спирто-преднизолоновой смеси. Установлено, что исследуемые препараты способны в разной мере угнетать течение язвенного процесса. Этот факт может быть объяснен особенностями фармакологических свойств каждого из них. Исходя из результатов эксперимента, эмоксипин, корвитин, висмута субцитрат можно назвать препаратами выбора для коррекции осложнений терапии ГКС. Применение же других препаратов с этой целью рекомендуют только при условии подбора оптимального режима их введения или комбинирования их друг с другом или вышеназванными более эффективными препаратами для усиления противоязвенного эффекта, что является перспективой дальнейших исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **гастротоксичность глюкокортикостероидов, противоязвенные препараты.**

CHOICE OF PERSPECTIVE CORRECTORS OF GLUCOCORTICOIDS ULCEROGENIC EFFECT

Darvish Ali Khuseyn[1], D.V. Semeniv[2], T.O. Kutsenko[2]
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY[1], KHARKIV
IVANO-FRANKIVSK NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY[2]

Summary

The comparative study of effectiveness of different antiulcer drugs in ethanol-prednisolon-induced gastric ulceration was carried out. It was revealed that drugs which were under study, decrease gastric ulceration but their effectiveness is different. This fact may be explained by the peculiarities in pharmacodynamics of used drugs. According to the results of our comparative investigation, emoxipin, korvitin, bismuth subcitrate are the drugs of choice for treatment of glucocorticosteroid-induced gastric ulceration. The usage of other drugs with the same purpose is recommended only in case the choosing the optimal dosing regimen or their combination with the drugs of first choice (listed above) for increase of therapy effectiveness. That is the next step of these investigations.

KEY WORDS: **gastrotoxicity of glucocorticosteroids, antiulcer drugs.**

Отримано 10.10.2008 р.

Адреса для листування: *Т.О. Куценко, вул. Локомотивна, 5, кв. 2, Харків, 61080, Україна.*

УДК 615.451.1:616.147.17-007.64

ВПЛИВ НОВОЇ МАЗІ "ЕСТАН", СТВОРЕНОЇ НА ОСНОВІ РОСЛИННИХ КОМПОНЕНТІВ, НА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ НА ТЛІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ФОРМАЛІНОВОГО ПРОКТИТУ В ЩУРІВ

К.П. Бездітко
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Наведено результати вивчення впливу нової мазі "Естан", створеної на основі екстрактів кори дуба та насіння каштана кінського, на біохімічні показники на тлі формалінового проктиту в щурів. Препаратами порівняння було обрано мазі "Геморон" і "Ауробін" та супозиторії "Гемороль". Встановлено антиоксидантні, мембраностабілізувальні та протизапальні властивості мазі "Естан", що за ефективністю перевершують препарати "Геморон" і "Гемороль" та не поступаються мазі "Ауробін". Отримані результати свідчать про доцільність подальшого вивчення мазі "Естан" з метою створення нового препарату для проктології на основі лікарської рослинної сировини.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **мазь "Естан", біохімічні показники, антиоксидантні, мембраностабілізувальні, репаративні та протизапальні властивості.**

ВСТУП. Протягом останнього десятиріччя великим попитом користуються препарати на основі рослинних компонентів, які у багатьох випадках є вагомою альтернативою синтетичним лікарським засобам. Це пов'язано з тим, що рослинні препарати, завдяки широкому спектру фармакологічних властивостей та низькій токсичності, проявляють м'яку комплексну дію і рідше викликають побічні реакції, ніж синтетичні засоби, що дозволяє проводити тривале лікування при хронічних захворюваннях [5, 7]. Вченими ВАТ "ХФЗ "Червона зірка" для місцевого лікування проктологічних захворювань розроблено новий комбінований препарат на основі екстрактів кори дуба та насіння каштана кінського – мазь "Естан". За даними літератури, екстракти цих рослин за рахунок дії біологічно активних речовин, що входять до їх складу, проявляють анальгетичні, протизапальні, антиексудативні, венопротективні, антиоксидантні, антимікробні, репаративні властивості та позитивно впливають на основні ланки патогенезу проктологічних захворювань [2, 6, 8, 9]. Метою даного дослідження стало вивчення впливу мазі "Естан" на біохімічні показники на тлі експериментального формалінового проктиту в щурів.

© К.П. Бездітко, 2009.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили у ЦНДЛ НФАУ під керівництвом доктора фармацевтичних наук, проф. Л.В. Яковлєвої. Ураження слизової оболонки прямої кишки значного ступеня досягали при моделюванні формалінового проктиту. Експеримент проведено на 52 білих безпородних статевозрілих щурах-самцях масою 170-185 г. Було сформовано 6 груп тварин: 1-ша – інтактний контроль, 2-га – позитивний контроль, 3-6 – дослідні групи, які одержували мазь "Естан" та препарати порівняння. Як препарати порівняння використовували мазі "Геморон" (ФАРМАСАЙНС Інк., Канада) й "Ауробін" (Gedeon Richter, Угорщина) та супозиторії "Гемороль" ("Herbapol", Польща). Мазі "Естан", "Геморон" та "Ауробін" вводили ректально в дозі 1 мл/кг маси тіла тварин [1]. Супозиторії "Гемороль" досліджували в дозі 120 мг/кг маси тіла щурів, яку розраховано, виходячи з терапевтичної дози для людини 2 г/кг, з урахуванням коефіцієнта видової стійкості за Ю.Р. Риболовлєвим. Формалін вводили щурам одноразово у пряму кишку на глибину 1,5 см через металевий зонд з розрахунку 0,2 мл 15 % розчину формаліну на тварину вранці натще після рефлекторного звільнення кишечника [1]. Досліджувані об'єкти вводили через 24 год після введення формаліну, надалі – раз на добу

протягом 15 днів. На 16-й день експерименту оцінювали вплив досліджуваних об'єктів на біохімічні показники. Їх вибирали відповідно до поставленого завдання: визначити ступінь протекторної дії досліджуваних препаратів в умовах експериментального проктиту. Відомо, що тяжка інтоксикація, викликана введенням формаліну, супроводжується порушенням функції печінки, що, у свою чергу, призводить до підвищення процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). На цьому ґрунтується доцільність дослідження показників стану ПОЛ і фізіологічної антиоксидантної системи (ФАС) у печінці. Зокрема, у гомогенаті печінки вивчали вміст кінцевого продукту ПОЛ – ТБК-реактантів з використанням загальновизнаної методики і рівень одного з компонентів ФАС – відновленого глутатіону (ВГ) за методом Beutler E.D. et al. [3]. У сироватці крові визначали активність АлАТ і АсАТ (метод Райтмана–Френкеля, за допомогою тест-набору "Lachema", Чехія) як маркерних ферментів цитолізу, що супроводжують запальні процеси, та рівень загального білка (біуретовий метод, тест-набір "Lachema", Чехія) і сечовини (реакція з діацетилмонооксимом, тест-набір "Lachema", Чехія) для оцінки інтенсивності запального процесу [3].

Отримані експериментальні дані обробляли методом варіаційної статистики з використанням стандартного пакету програм "Statistica 6,0".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На 16-й день експерименту у тварин групи позитивного контролю в гомогенаті печінки відмічали достовірне щодо вихідних даних зменшення рівня ВГ та збільшення рівня ТБК-активних продуктів. У сироватці крові на цей період реєстрували такі зміни: достовірне щодо вихідних даних підвищення рівня сечовини, показників АлАТ і АсАТ (табл. 1). Сукупність даних показників свідчить про виражений деструктивно-запальний процес у групі позитивного контролю. Показник рівня загального білка у сироватці крові на 16-й день експерименту не відрізнявся від інтактного контролю. Такий рівень загального білка у сироватці крові можна пояснити тим, що на тлі формалінового проктиту в групі позитивного контролю поряд із деструкцією білка відбувається його синтез для активізації репаративних процесів. Відомо, що деструктивно-запальні процеси завжди поєднуються з процесами репарації. Одним із визначальних факторів швидкості репаративної регенерації є білковий обмін. Процес репарації забезпечується необхідною кількістю білка [4]. Отже, аналіз отриманих результатів свідчить про те, що на тлі формалінового проктиту в щурів групи позитивного контролю на 16-й день дослідження спостерігали як деструктивно-запальний, так і репаративний процеси.

Таблиця 1 – **Вплив мазі "Естан" і препаратів порівняння – мазей "Геморон", "Ауробін" та супозиторіїв "Гемороль" на біохімічні показники на тлі експериментального проктиту, викликаного введенням формаліну, на 16-й день експерименту ($\bar{X}\pm S\bar{x}$)**

Показники	Доза	n	Біохімічні показники в сироватці крові				Біохімічні показники в гомогенаті печінки	
			загальний білок, г/л	сечовина, ммоль/л	АлАТ, ммоль/г·л	АсАТ ммоль/г·л	ВГ, мкмоль/г	ТБК-активні продукти, мкмоль/г
інтактний контроль	–	6	65,34± 1,19	5,62±0,11	0,56±0,02	0,66±0,05	10,77± 0,34	32,27±2,72
позитивний контроль	–	6	63,83± 2,71	9,19±0,55*	0,67±0,05*	0,97±0,04*	9,08± 0,34*	54,92±4,28*
мазь "Естан"	1,0 мл/кг	7	75,71± 3,11*/**	6,67±0,35**	0,52±0,02**	0,70±0,02**	10,82± 0,10**	32,05±3,16**
мазь "Геморон"	1,0 мл/кг	6	77,03± 3,33*/**	7,95±0,53*	0,57±0,02	0,77±0,04**	11,80± 0,71**	37,18±7,54
мазь "Ауробін"	1,0 мл/кг	6	73,78± 1,96	6,37±0,65**	0,61±0,01	0,68±0,03**	10,95± 0,33**	34,40±7,16**
супозиторії "Гемороль"	0,12 г/кг	6	72,59± 2,40	7,67±0,46*	0,66± 0,02*/***	0,85± 0,04*/**/***	10,80± 0,09**	38,68±4,95**

Примітка. * – відхилення достовірне щодо інтактного контролю, $p<0,05$; ** – відхилення достовірне щодо позитивного контролю, $p<0,05$; ***– відхилення достовірне щодо мазі "Естан", $p<0,05$.

Після лікування маззю “Естан” майже всі досліджувані біохімічні показники були на рівні інтактного контролю (ТБК-реактанти та ВГ у гомогенаті печінки, АлАТ, АсАТ та сечовина у сироватці крові). Показник загального білка достовірно перевищував аналогічний показник груп позитивного та інтактного контролю. Це дозволяє зробити висновок, що під впливом досліджуваного об’єкта мають місце досить висока активність репаративних процесів та значне пригнічення деструктивно-запальної реакції за рахунок антиоксидантних, протизапальних та мембраностабілізувальних властивостей мазі.

Застосування мазі “Геморон” на тлі формалінового проктиту приводило до таких достовірних змін щодо позитивного контролю: підвищення ВГ у гомогенаті печінки; зменшення АсАТ та збільшення загального білка у сироватці крові. Рівень сечовини у сироватці крові залишався на рівні контрольної патології. Отже, мазь “Геморон” проявила менш виражену, ніж мазь “Естан”, антиоксидантну, протизапальну, мембраностабілізувальну активність. Цей препарат за репаративною дією не поступався досліджуваній мазі. Препарат порівняння “Ауробін” позитивно впливав на перебіг формалінового проктиту. Достовірної різниці між терапевтичною дією мазей “Естан” та “Ауробін” не реєстрували. Під впливом супозиторіїв “Гемороль” на 16-й добі дослідження рівень ТБК-активних продуктів та ВГ нормалізувався до рівня інтактного контролю. Показники АлАТ та АсАТ у тварин, яких лікували супозиторіями “Гемороль”, були достовірно вищими за рівень аналогічного показника в інтактних тварин та під впливом мазі “Естан”. Рівень сечовини у сироватці крові був на рівні позитивного контролю. Загальний білок не мав достовірних відмінностей ні з позитивним, ні з інтактним контролем. Аналіз досліджуваних показників свідчить про те, що вплив супозиторіїв “Гемороль” на деструктивно-запальний процес на тлі формалінового проктиту значно менш виражений, ніж мазі “Естан”.

Отже, за результатами вивчення біохімічних показників на тлі експериментального формалінового проктиту в щурів установлено антиоксидантні, мембраностабілізувальні та протизапальні властивості мазі “Естан”, що за ефективністю перевершують препарати порівняння “Геморон” і “Гемороль” та не поступаються мазі “Ауробін”.

ВИСНОВКИ. 1. Нова вітчизняна мазь “Естан”, створена на основі рослинних компонентів, проявляє виражену терапевтичну дію на моделі експериментального формалінового проктиту в щурів.

2. За позитивним впливом на біохімічні показники на тлі експериментального формалінового проктиту в щурів мазь “Естан” перевершує препарати порівняння “Геморон” і “Гемороль” та не поступається мазі “Ауробін”.

3. Доцільно провести більш поглиблене вивчення мазі “Естан” з метою створення нового препарату на основі лікарської рослинної сировини для лікування проктологічних захворювань.

ЛІТЕРАТУРА

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.

2. Иофе А.Ю., Ткач С.М., Кузенко Ю.Г // Сучасна гастроентерологія. – 2005. – № 2. – С. 92-95.

3. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. – М.: Элиста “Джангар”, 2001. – 216 с.

4. Сучасне медикаментозне лікування ран. – Київ, 2002. – 35 с.

5. Чекман І.С. Флаваноїди – клініко-фармакологічний аспект // Фітотерапія в Україні. – 2000. – № 2. – С. 3-5.

6. Яковлєва Л.В., Карбушева І.В., Сахарова Т.С. Можливості використання препарату дубильних речовин альтану для лікування колітів. – Х.: Золоті сторінки, 2003. – 136 с.

7. Ferguson L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability // Mutation Research. – 2001. – № 475. – P. 89-111.

8. Khan M.R., Kihara M. and Omoloso A.D. Antimicrobial activity of Evodia elleryana // Fitoterapia. – 2000. – **71**, № 1.– P. 72-74.

9. Lin C.C., Hsu Y.F., Lin T.C. Antioxidant and free radical scavenging effects of the tannins // Anticancer Res. – 2001. – **21**, № 1A. – P. 237-243.

ВЛИЯНИЕ НОВОЙ МАЗИ "ЭСТАН", СОЗДАННОЙ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ, НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ФОРМАЛИНОВОГО ПРОКТИТА У КРЫС

Е.П. Бездетко
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Приведены результаты изучения влияния новой мази "Эстан", созданной на основе экстрактов коры дуба и семян каштана конского, на биохимические показатели на фоне формалинового проктита у крыс. Препаратами сравнения были выбраны мази "Геморрон", "Ауробин" и суппозитории "Гемороль". Установлены антиоксидантные, мембраностабилизирующие и противовоспалительные свойства мази "Эстан", превышающие по эффективности препараты "Геморрон" и "Гемороль" и не уступающие мази "Ауробин". Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего изучения мази "Эстан" с целью создания нового препарата для проктологии на основе лекарственного растительного сырья.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **мазь "Эстан", биохимические показатели, антиоксидантные, мембраностабилизирующие, репаративные и противовоспалительные свойства.**

INFLUENCE OF NEW OINTMENT "ESTAN", BASED OF HERBAL COMPONENTS, ON BIOCHEMICAL PARAMETERS OF THE EXPERIMENTAL FORMALIN PROCTITIS IN RATS

K.P. Bezditko
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

The results of study of new ointment "Estan", based on the extracts of oak bark and chestnut seeds are adduced in the article. Preparations of comparison were the ointment "Hemorron", the ointment "Aurobin" and the suppository "Hemorrol". As a result of biochemical study was established that the ointment "Estan" has antioxidant, membrane-stabilizing and anti-inflammatory activity. It is better than referrent preparations "Hemorron" and "Hemorrol". Effectiveness of ointment "Estan" is equal to the effectiveness of ointment "Aurobin". Therefore, the new ointment "Estan" is a perspective herbal medication for treatment of colorectal diseases.

KEY WORDS: **ointment "Estan", biochemical parameters, antioxidant activity, membrane-stabilizing activity, reparative activity, anti-inflammatory properties.**

Отримано 23.01.2009 р.

Адреса для листування: *К.П. Бездітко, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, Харків, 61002, Україна.*

УДК 576.326;591.431

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ СПІРОКАРБОНУ НА ФІЗИКО-ХІМІЧНІ Й БІОХІМІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЕРИТРОЦИТІВ ЩУРІВ У НОРМІ ТА ЗА АЛКОГОЛЬНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Л.С. Старикович[1], К.П. Дудок[1], Н.О. Сибірна[1], О.Н. Речицький[2], В.А. Єресько[2], І.Й. Влох[3], Н.М. Гринчишин[3]

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА[1]
ХЕРСОНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ[2]
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО[3]

Досліджено фізико-хімічну та біохімічну дії препарату "Спірокарбон", одержаного в результаті хімічного синтезу. Встановлено, що інкубування in vitro еритроцитів контрольних та алкоголізованих щурів із спірокарбоном призводить до змін каталазної та NO˙-синтазної активності. Статистично достовірних змін у вмісті H_2O_2 не виявлено як у контролі, так і у варіантах досліду, однак встановлено дисбаланс утворення окремих активних форм нітрогену, що достовірно корелює зі змінами NO˙-синтазної активності. Дослідження стійкості еритроцитарних мембран у присутності гемолітика (HCl) свідчить про мембранотропну дію спірокарбону.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **спірокарбон, алкогольна інтоксикація, еритроцити, каталаза, пероксид водню, NO-синтаза, нітрити, нітрати, кислотні еритрограми.**

ВСТУП. Створення лікарських препаратів шляхом хімічного синтезу є одним з перспективних напрямків сучасної біохімії, фармакології, молекулярної біології та медицини. Синтетичні препарати, маючи відповідну хімічну структуру, можуть взаємодіяти з біологічними макромолекулами (білками, нуклеїновими кислотами, ліпідами тощо) та їх комплексами. Наслідком таких реакцій може бути зміна конформаційного стану останніх, їх функції. З іншого боку, новосинтезовані препарати також доповнюють клас сполук, які використовують як маркери при дослідженні структурно-функціонального стану біологічно важливих структур. Водночас практичне застосування такого типу сполук є надзвичайно широким – від харчових преміксів до протипухлинних та радіопротекторних засобів. Таким препаратом з потенційно широким спектром дії є спірокарбон.

Спірокарбон синтезований на кафедрі біохімії Херсонського державного університету. Він являє собою конденсовану гетероциклічну сполуку, що містить у кожній з кільцевих структур по два атоми нітрогену та чотири атоми карбону, один з яких є спільним. Попередні дослідження біологічних властивостей цієї сполуки показали, що вона відзначається низькою токсичністю – LD_{50} становить 3000 мг/кг маси, а також вираженою дією на гіпоталамо-гіпофізарну нейросекреторну систему щурів, ріст, розвиток і продуктивність курей, а також на урожайність рослин [5, 9].

Оскільки за дії алкогольної інтоксикації та розвитку хронічного алкоголізму відбуваються значні порушення у структурі й функціонуванні низки типів клітин та органів, у тому числі нервової, ендокринної, імунної та кровоносної систем, нами були проведені дослідження впливу спірокарбону на еритроцити примусово алкоголізованих щурів у системі in vitro.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В дослідах використовували тричі відмиті фізіологічним розчином еритроцити контрольних безпородних самок щурів масою 150-180 г, яких утримували на раціоні віварію (12 тварин), та щурів, які щодобово протягом місяця споживали 15 % розчин етанолу замість питної води (4 тварини). Примусова алкоголізація проведена на базі науково-дослідної лабораторії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Тварин декапітували під ефірним наркозом, кров збирали в центрифужну пробірку, яка містила 2-3 краплі гепарину. Відмиті еритроцити інкубували протягом години з рівним об'ємом розчину спірокарбону (концентрація 1 мг/мл) за температури 20 °С.

© Л.С. Старикович, К.П. Дудок, Н.О. Сибірна, О.Н. Речицький, В.А. Єресько, І.Й. Влох, Н.М. Гринчишин, 2009.

Вміст гідроген пероксиду визначали за [10], нітритів та нітратів – за [4], каталазну та $NO^{\cdot}$-синтазну активність – за [1, 7] відповідно, гемолітичну стійкість еритроцитів вивчали методом кислотних ерирограм [8]. Вміст метаболітів оксигену та нітрогену, а також активність ферментів обчислювали з урахуванням концентрації білка в пробах.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В результаті проведених досліджень встановлено, що у контрольних щурів вміст H_2O_2 статистично достовірно не змінюється протягом годинної інкубації еритроцитів зі спірокарбоном, але спостерігається тенденція до зростання цього активного метаболіту оксигену порівняно з контролем (табл. 1).

Таблиця 1 – **Вміст гідроген пероксиду в еритроцитах контрольних щурів та за алкогольної інтоксикації (нмоль H_2O_2·мг$^{-1}$ білка)**

Варіанти	Без спірокарбону	Інкубація зі спірокарбоном
Контроль	1,03±0,25 (n=11)	1,34±0,26 (n=3)
Алкогольна інтоксикація	1,58±0,27(n=4)	1,36±0,46 (n=4)
T_1	0,81	0,41
T_2	1,53	0,38

Примітка. Тут і в наступній таблиці: T_1 – порівняння зразків без інкубації зі спірокарбоном та за інкубації; T_2 – порівняння контролю з алкогольною інтоксикацією.

З літератури відомо, що вміст H_2O_2 в клітинах значною мірою залежить від збалансованості процесів окиснення та відновлення. Шляхи утворення цього активного метаболіту оксигену можуть бути неферментативними та ензиматичними. Неферментативні шляхи утворення H_2O_2 в основному пов'язані з факторами, які інтенсифікують процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), наприклад за дії іонізуючого випромінювання, важких металів, деяких ксенобіотиків [3].

Стійкість клітин ссавців до дії гідроген пероксиду визначається глутатіонпероксидазною та каталазною системами. Глутатіопероксидаза звичайно функціонує за малих концентрацій H_2O_2, а каталаза – за високих. Рівень активності цих ферментів регулюється різними факторами, у тому числі й генерацією пероксиду.

Оскільки в еритроцитах ссавців основним ферментом, який розщеплює гідроген пероксид, є каталаза, наступним етапом нашої роботи було визначення активності цього ферменту.

У ході досліджень нами встановлено, що каталазна активність в еритроцитах даної серії контрольних щурів становить (301,46±20,82) нмоль H_2O_2·хв$^{-1}$·мг$^{-1}$ білка (рис. 1).

У разі попереднього інкубування еритроцитів зі спірокарбоном каталазна активність достовірно зменшується. Оскільки основним місцем локалізації цього ферменту є пероксисоми, то причиною зміни активності каталази можуть бути стабілізація мембранних структур і погіршення екстракції цього ферменту в розчин за дії гемолітика та одночасного впливу спірокарбону. Отже, при гемолізі еритроцитів контрольних щурів частина каталази за умов дії спірокарбону залишається зв'язаною з мембранними структурами і не переходить у розчинну фракцію.

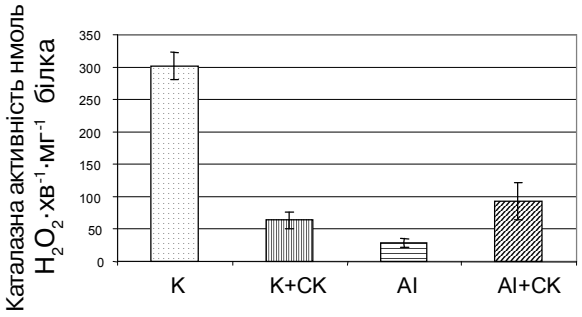


Рис. 1. Каталазна активність (нмоль H_2O_2·хв$^{-1}$·мг білка$^{-1}$) в різних варіантах досліду: К – контроль; К+СК – еритроцити контрольних щурів, які інкубували зі спірокарбоном; АІ – еритроцити щурів з алкогольною інтоксикацією; АІ+СК – алкогольна інтоксикація та інкубування еритроцитів зі спірокарбоном.

Дослідження каталазної активності за умов тривалої алкогольної інтоксикації показало, що відбувається достовірне зниження активності цього ферменту порівняно з контрольними тваринами (майже в 11 разів). Така зміна активності каталази зумовлюється в основному пригніченням рівня біосинтетичних процесів унаслідок токсичної дії ацетальдегіду на попередники еритроїдних клітин кісткового мозку. Можливою є також інактивація каталази за безпосереднього впливу етанолу чи продуктів його метаболізму на структурну організацію цього ферменту. Вірогідним є порушення фізико-хімічних властивостей мембранних структур, які зазнають окисної модифікації ліпідної або білкової компоненти.

Оскільки алкогольна інтоксикація впливає не тільки на рівень окисно-відновних процесів у клітині, але й на їх регулювання, до якого

залучені шляхи утворення та утилізації NO, нами проведені дослідження активності NO·-синтази та рівня нітратів і нітритів у контрольних та алкоголізованих щурів з наступною інкубацією еритроцитів з розчином спірокарбону (рис. 2).

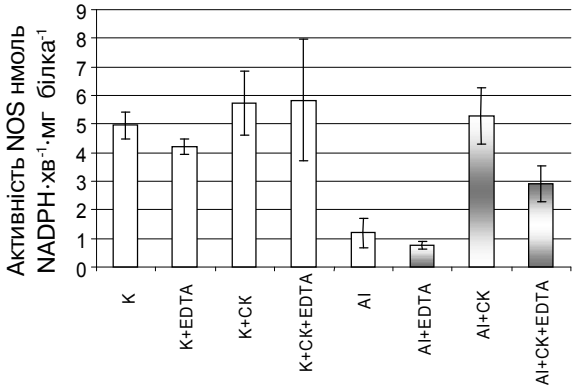


Рис. 2. NO·-синтазна активність у різних варіантах досліду: К – контроль; К+EDTA – активність ферменту в присутності EDTA; К+СК – контроль за інкубації зі спірокарбоном; К+СК+EDTA – контроль у присутності EDTA та спірокарбону; АІ – алкогольна інтоксикація; АІ+EDTA – активність ферменту за алкогольної інтоксикації та в присутності EDTA; АІ+СК – алкогольна інтоксикація та інкубація еритроцитів зі спірокарбоном; АІ+СК+EDTA – еритроцити алкоголізованих щурів у присутності спірокарбону та EDTA.

Отже, за алкогольної інтоксикації в еритроцитах активність як сумарної NOS, так і віродгідно індуцибельної NOS (у присутності EDTA) була достовірно нижчою, ніж у всіх варіантах контролю. Натомість інкубація зі спірокарбоном призводила до нівелювання різниці в активності обох форм ферменту порівняно з контролем. Причиною таких змін може бути або мембранотропна дія спірокарбону, або безпосереднє активування NOS у присутності цієї речовини.

Про утилізацію утвореного NO· певною мірою свідчать інші метаболіти нітрогену, в тому числі нітрити та нітрати.

У фізіологічних умовах NO· може реагувати з молекулярним киснем з утворенням двоокису азоту, який у водних розчинах перетворюється на аніони NO_2^- та NO_3^- [3]. Водночас NO· може взаємодіяти із супероксид-аніоном з утворенням пероксинітриту, який є сильним окисником, здатним окиснювати SH- та NH_2-групи білків, а також взаємодіяти з іонами металів, наприклад з утворенням ферум-нітрозильних комплексів. Отже, за активністю NO·-синтази, з одного боку, та за вмістом нітратів і нітритів – з іншого можна певною мірою судити про вплив активних метаболітів нітрогену на регулювання окисно-відновних процесів у клітині.

У результаті проведених досліджень виявлено зміну вмісту нітритів і нітратів в еритроцитах дослідних щурів (табл. 2).

Таблиця 2 – **Вміст нітритів і нітратів в еритроцитах щурів за інкубації зі спірокарбоном (нмоль·мг білка$^{-1}$)**

Варіанти	Контроль			Алкогольна інтоксикація		
	нітрити	сума нітритів та нітратів	нітрати	нітрити	сума нітритів та нітратів	нітрати
Без СП	1,01±0,20 n=4	2,17±0,20 n=4	1,16±0,29 n=4	0,57±0,12 n=3	0,59±0,23 n=3	0,02±0,001 n=3
Із СП	0,75±0,22 n=3	1,14±0,082 n=3	0,58±0,21 n=3	2,85±0,63 n=4	2,73±0,85 n=3	0 n=3
T_1	0,88	4,68	1,61	3,56	2,43	
T_2	1,02	5,27		3,13	1,87	

Аналіз отриманих результатів свідчить про те, що зменшення вмісту нітритів і нітратів корелює зі зниженням NO·-синтазної активності за умов алкогольної інтоксикації. Це вказує на диспропорцію регуляторних механізмів за вказаної патології. Крім того, вказана диспропорційність підтверджується і зміною співвідношення різних метаболітів нітрогену: якщо у контрольних тварин це співвідношення практично відповідає 1:1 (між нітритами і нітратами), то у разі алкогольної інтоксикації всі досліджувані форми нітрогену представлені виключно нітритами. Інкубація зі спірокарбоном хоча і призводить до зростання рівня нітритів, однак не сприяє нормалізації процесів перетворення активних форм нітрогену. Для підтвердження наших припущень щодо впливу спірокарбону на еритроцитарні мембрани проведено аналіз кислотної стійкості мембран еритроцитів.

Раніше проведені нами дослідження компонентів системи периферичної крові дозволили зробити висновок, що у хворих з II стадією алкоголізму, які були прийняті у клініку на стаціонарне лікування, стабільність еритроцитарних мембран є нижчою порівняно з

еритроцитами здорових донорів [2, 6]. Отримані результати підтвердилися і в модельних дослідах на щурах, які приймали протягом 1-6 міс. 15 % розчин етанолу та їх першого (F 1) покоління [2]. Вивчення впливу спірокарбону на кінетику гемолізу еритроцитів крові здорових донорів та хворих на алкоголізм II стадії методом побудови кислотних еритрограм показало, що спірокарбон певною мірою впливає на стабілізацію еритроцитарних мембран [6].

На рисунку 3 наведено результати дослідження впливу спірокарбону на мембрани еритроцитів крові щурів, алкоголізованих протягом 1 міс. Показано, що спірокарбон призводить до зниження відсотка фракції еритроцитів з підвищеною чутливістю до гемолітика. Водночас ліва інфлексія еритрограми свідчить про зростання пулу еритроцитів з підвищеною стійкістю до гемолітика (рис. 3, серія 2).

Водночас за інкубації еритроцитів контрольних тварин зі спірокарбоном не виявлено достовірних відмінностей кінетики гемолізу еритроцитів.

Отримані результати досліджень свідчать про те, що спірокарбон здатний стабілізувати мембранні структури еритроцитів. Цей препарат унаслідок особливостей своєї структури може блокувати (екранувати) заряджені групи на поверхні мембран еритроцитів або впливати на зміну конформаційного стану білково-ліпідної компоненти.

Отже, in vitro спірокарбон призводить до стабілізування мембранних структур і підтримання певного рівня каталазної та NO•-синтазної активності у розчинній фракції гемолізатів еритроцитів, що значною мірою корелює зі змінами вмісту активних метаболітів оксигену та нітрогену.

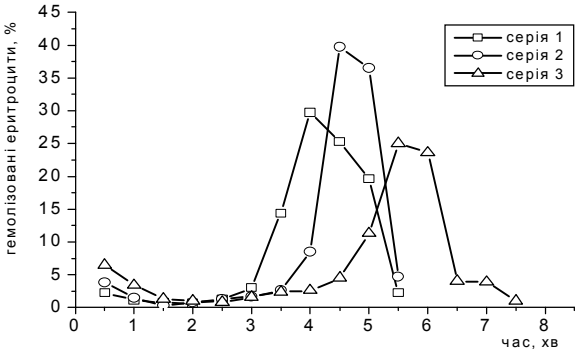


Рис. 3. Усереднені типові еритрограми крові щурів за дії спірокарбону in vitro: серія 1 – еритроцити алкоголізованих щурів (1 місяць) (n=4); серія 2 – еритроцити алкоголізованих щурів (1 місяць) + спірокарбон (n=4); серія 3 – еритроцити контрольних щурів (n=10).

ВИСНОВКИ. 1. Інкубування відмитих фізіологічним розчином еритроцитів крові контрольних та алкоголізованих щурів зі спірокарбоном in vitro призводить до змін каталазної та NO•-синтазної активності.

2. Вміст активних форм нітрогену достовірно корелює зі змінами NO•-синтазної активності, що супроводжується дисбалансом утворення їх окремих форм.

3. Основним ефектом інкубування відмитих еритроцитів зі спірокарбоном є його мембранотропна дія.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гирин С.В. Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах // Лаб. диагностика. – 1999. – № 4. – С. 45-46.

2. Дудок К.П., Влох І.Й., Дудок Т.Г. та ін. Структурно-функціональний стан еритроцитів за стресу, викликаного алкогольною інтоксикацією // 2-й з'їзд Українського товариства клітинної біології: Збірник тез. Київ, 23-26 жовтня 2007. – С. 61.

3. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшова Е.Б. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспект. – М.: Маик, 2001. – 343 с.

4. Кіселик І.О., Луцик М.Д., Шевченко Л.Ю. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гетатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології // Лаб. діагностика. – 2001. – № 3. – С. 43-45.

5. Кошелева В.Д., Бойко Р.Т., Ересько В.А. Влияние спирокарбона на гипоталамо-гипофизарную нейросекреторную систему (ГГНС) растущих животных // Материалы Всеукр. науч.-практ. конф.: Сб. тез. – Херсон, 1994. – С. 103.

6. Речицький О.Н., Єресько В.А., Дудок К.П., Сибірна Н.О. Дослідження впливу "спірокарбону" на структурно-функціональний стан еритроцитарних мембран периферичної крові здорових людей та хворих на алкоголізм // Матеріали III Всеукр. наук.-практ. конф. "Теорія і практика сучасного природознавства", присвяченої 90-річчю утворення Херсонського держ. ун-ту: Зб. стат. – Херсон, 2007. – С. 47-52.

7. Сумбаев В.В., Ясинская И.М. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс //Совр. пробл. токсикол. – 2000. – **3**. – С. 3-5.

8. Терсков И.А., Гительзон И.И. Метод химических (кислотах) эритрограмм // Биофизика. – 1954. – **11**, вып. 2. – С. 259-266.

9. Трибрат Т.П., Ересько В.А. Влияние биологически активных веществ на рост и яичную продуктивность птицы кросса «Хайсекс браун» // Материалы Всеукр. науч.-практ. конф.: Сб. тез. – Херсон, 1994. – С. 101.

10. Bartosr G. Detekcya nadtlenku vodoru. Detekcya wytwazania H_2O_2 na podstawie utleniania czerwieni fenolove // Druga twarz tlenu. – Wyd. naucowe PMN: Warszawa, 1995. – S. 371.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СПИРОКАРБОНА НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭРИТРОЦИТОВ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Л.С. Старикович[1], Е.П. Дудок[1], Н.А. Сибирная[1], О.Н. Речицкий[2], В.А. Ересько[2], И.И.Влох[3], Н.М. Гринчишин[3]

ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ИВАНА ФРАНКО[1]
ХЕРСОНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ[2]
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО[3]

Резюме

Исследовано физико-химическое и биохимическое действия препарата "Спирокарбон", полученного в результате химического синтеза с использованием природных источников. Установлено, что инкубирование in vitro эритроцитов контрольных и алкоголизированных крыс со спирокарбоном приводит к изменениям каталазной и $NO^{\bullet}$-синтазной активности. Статистически достоверных изменений в содержании H_2O_2 не выявлено как в контроле, так и в вариантах опыта, однако установлен дисбаланс образования отдельных активных форм нитрогена, что достоверно коррелирует с изменениями $NO^{\bullet}$-синтазной активности. Исследования стойкости эритроцитарных мембран в присутствии гемолитика (HCl) свидетельствует о мембранотропном действии спирокарбона.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **спирокарбон, алкогольная интоксикация, эритроциты, каталаза, перекись водорода, NO-синтаза, нитриты, нитраты, кислотные эритрограммы.**

INFLUENCE OF SPIROCARBON ON PHYSICAL, CHEMICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF RAT ERYTHROCYTES UNDER NORMAL CONDITIONS AND DURING ALCOHOLIC INTOXICATION

L.S. Starykovych[1], K.P. Dudok[1], N.O. Sybirna[1], O.N. Rechytsky[2], V.A. Yeresko[2], I.Y. Vlokh[3], N.M. Grynchyshyn[3]

LVIV NATIONAL UNIVERSITY BY IVAN FRANKO[1]
KHERSON STATE UNIVERSITY[2]
LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY DANYLO HALYTSKY[3]

Summary

Physical, chemical and biochemical effects of spirocarbon were investigated. The changes of catalase and NO synthase activities after incubation of red blood cells with spirocarbon in vitro were proved. Reliable changes in content of H_2O_2 have not been discovered statistically in all investigated groups. However, disbalance of nitrogen active form formation, which for certain correlates with the changes of $NO^{\bullet}$ synthase activity, was shown. Examination of membrane firmness of red blood cells under presence of hemolytic factor (HCl) testifies influence of spirocarbon on erythrocyte membranes.

KEY WORDS: **Spirocarbon, alcoholic intoxication, erythrocytes, catalase, H_2O_2, $NO^{\bullet}$ -synthase, nitrites, nitrates, erythrogrames.**

Отримано 27.10.2008 р.

Адреса для листування: *Л.С. Старикович, вул. Люблінська, 91, кв. 40, Львів, 79054, Україна.*

УДК 577.152.34;577.349

ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ І НІТРИТНОЇ МЕТГЕМОГЛОБІНЕМІЇ НА ВМІСТ МЕТГЕМОГЛОБІНУ В КРОВІ СТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ І ЇХ НАЩАДКІВ У ДИНАМІЦІ РАННЬОГО ПОСТНАТАЛЬНОГО РОЗВИТКУ

В.І. Чорна
ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Досліджено розвиток гемічної гіпоксії за дії малих доз іонізуючого випромінювання при одноразовому і фракціонованому рентгенівському опроміненні (0,25 Гр). Визначено вплив експериментальної гемічної гіпоксії на вміст метгемоглобіну в крові щурів-самок, а також їх потомства одного приплоду протягом постгіпоксичного періоду. В результаті експерименту встановлено, що рентгенівське опромінення, як і хронічне введення нітриту натрію, спричиняє підвищення вмісту метгемоглобіну в крові щурів, що свідчить про розвиток різних форм гемічної гіпоксії залежно від терміну постгіпоксичного періоду.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **гемічна гіпоксія, рентгенівське опромінення, метгемоглобін.**

ВСТУП. Одним із наслідків радіаційного впливу на організм є розвиток гіпоксичного стану. При дії іонізуючого випромінювання змінюються гемодинамічні показники, такі, як загальний церебральний обсяг крові, церебральний паренхімний обсяг крові, церебральний кров'яний потік та церебральний кров'яний індекс [12]. Визначено, що опромінення спричиняє зменшення вмісту еритроцитів [2], зниження концентрації гемоглобіну при одноразовому та фракціонованому опроміненні [12].

Поряд із модифікацією гемодинамічних показників, радіація сприяє також розвитку гемічного гіпоксичного стану, зумовленого окисненням гемоглобіну (Hb) до метгемоглобіну (MetHb) [6]. Метгемоглобінемія відбивається перш за все на стані центральної нервової, серцево-судинної і дихальної систем, а також на багатьох біохімічних процесах в організмі, порушує ферментні системи, які захищають гемоглобін від окиснення [3]. У зв'язку з підвищеним вмістом метгемоглобіну в крові порушуються процеси нормального окиснення та збільшується вміст недоокиснених продуктів обміну в тканинах [2]. З усіх різновидів гіпоксичних станів найменш вивченою є гемічна форма гіпоксії.

При гемічній гіпоксії відбуваються процеси інтенсифікації перекисного окиснення ліпідів, збільшення активності лізосомних ферментів у сироватці крові [4]. Порушення гемодинаміки та мікроциркуляції в комплексі з метгемоглобінемією сприяє розвитку вторинної тканинної гіпоксії. Особливо небезпечне гіпоксичне ушкодження для незрілого мозку. Показано, що гіпоксичне ураження головного мозку – основна причина виникнення дитячої патології від локального ушкодження певних систем організму до генералізованих порушень, що призводять до летального наслідку [13]. Порушення гомеостазу динамічних систем мозку внаслідок пренатальної гіпоксії та асфіксії є одним із найбільш небезпечних ускладнень у неонатології.

Киснева недостатність на ранніх стадіях особистого розвитку призводить до порушень формування, диференціювання і дозрівання різних структур і метаболічних шляхів у нервовій тканині. Навіть одноразова тяжка гіпоксія, перенесена в антенатальний чи перинатальний період, викликає тривалий, багатостадійний патологічний процес [7]. На жаль, робіт, присвячених вивченню цього питання, дуже мало. З огляду на це, метою даного експерименту було з'ясування внеску гемічної гіпоксії у розвиток радіобіологічного ефекту малих доз радіації за одноразовою і фракціонованою діями та визначення вмісту метгемоглобіну в крові щурів у динаміці постгіпоксичного періоду.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження була кров щурів лінії Вістар різного віку (статевозрілих і тварин віком 1, 6, 12 діб). Експерименти проводили згідно із Загальними принципами експериментів на тваринах, схваленими на Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 2001) та узгодженими з положен-

© В.І. Чорна, 2009.

нями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, Франція, 1985). Щурів опромінювали на апараті РУМ-17. У модельних експериментах з вивчення ефектів низьких рівнів радіації застосовували дозу 25 сГр. Опромінення відбувалося за таких технічних умов: напруга – 150 кВ, сила струму – 6 мА, фільтри – 0,5 мм Cu + 2 мм Cu, потужність дози – 0,26 сГр/хв, фокусна відстань – 1,86 м. Опромінення в малих дозах здійснювали двома способами: одноразовий безперервний вплив протягом терміну, необхідного для досягнення дози 25 сГр; хронічний вплив, тривале фракціоноване опромінення протягом 25 діб із добовою дозою 1 сГр і сумарною дозою 25 сГр.

Термін дослідження після опромінення в діапазоні низьких доз – 1, 12, 24, 120 і 168 год. Для вивчення можливих механізмів, пов'язаних із метгемоглобінутворюючим впливом іонізуючого випромінювання, використано модель гемічної гіпоксії. В ролі агента, який викликає утворення метгемоглобіну, був нітрит натрію (2 % $NaNO_2$, виготовлений на фізіологічному розчині).

Розчин вводили інтраперинатально самкам протягом 14 діб щодня, з 5 до 19 доби вагітності. Загальна кількість введеного одній тварині нітриту натрію складала 0,9 мг/кг маси (по 60 мкг/кг кожного дня). Контрольним самкам вводили фізіологічний розчин в еквівалентній дозі. Нащадків першого покоління, отриманих від контрольних та гіпоксичних самок, декапітували на 1, 6 та 12 доби постнатального розвитку.

Ступінь тяжкості гемічної гіпоксії оцінювали за кількістю метгемоглобіну в крові щурів, який визначали за допомогою методу Евелина та Меллой [1]. Результати піддавали статистичній обробці з використанням критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Встановлено, що тотальне рентгенівське опромінення щурів за дози 0,25 Гр індукує утворення збільшеного вмісту метгемоглобіну в крові, що призводить до розвитку гіпоксичного стану (рис. 1). В основі розвитку гіпоксичного ушкодження за гемічним типом лежить зниження забезпечення тканин киснем внаслідок підвищення рівня інактивованого гемоглобіну-метгемоглобіну [6].

Як свідчать дані, наведені на рисунку 1, рентгенівське опромінення спричиняє розвиток гемічної гіпоксії легкого ступеня або хронічної метгемоглобінемії [6]. Аналізуючи дані щодо вмісту MetHb у крові опромінених щурів, можна зробити висновок, що одноразовий радіаційний вплив має більший метгемоглобінутворюючий ефект порівняно з фракціонованим опроміненням. Визначено, що опромінення викликає зменшення вмісту еритроцитів у крові, зниження концентрації гемоглобіну [15] при одноразовому та фракціонованому опроміненні [11].

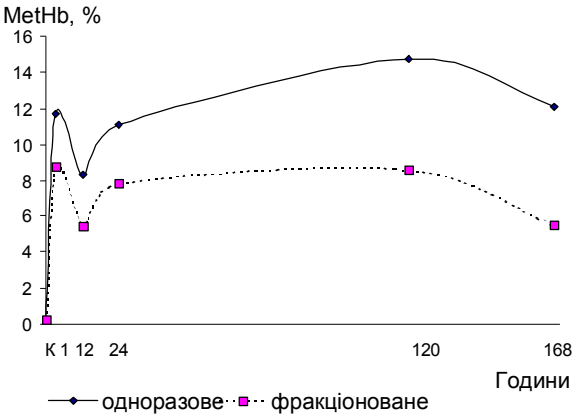


Рис. 1. Вміст метгемоглобіну в крові щурів після тотального опромінення за дози 0,25 Гр: А – одноразового; Б – фракціонованого (M±m, n=6).

Експериментально спричинений гіпоксичний стан під дією нітриту натрію в дорослих самок викликає гемічну гіпоксію середньої тяжкості по вмісту MetHb у крові до 28 %, а у нащадків першого покоління, які перенесли пренатальну гемічну гіпоксію, в динаміці онтогенетичного розвитку встановлено легкий ступінь тяжкості гемічної гіпоксії (табл. 1) [6].

Таблиця 1 – **Вміст метгемоглобіну в крові щурів у динаміці постгіпоксичного періоду (M±m, n=6)**

Дорослі щури		Нащадки	
постгіпоксичний період самки після народження, доби	вміст MetHb в крові щурів, %	період постнатального розвитку, доби	вміст MetHb в крові щурів, %
контроль	0,1±0,008	контроль	0,1±0,009
1	28,0±0,026	1	0,1±0,007
6	25,0±0,031	6	10,0±0,021
12	15,0±0,022	12	13,3±0,018

У зв'язку з підвищеним вмістом метгемоглобіну в крові змінюються процеси пероксидації ліпідів, причому з усіх видів гіпоксії за гемічної форми ці процеси перебігають найбільш інтенсивно, і їх пов'язують з помітною акумуляцією катехоламінів, дефіцитом антиокиснювальної системи, зниженням цитохром-с-активності [14]. У вагітних тварин, на останній стадії пренатального розвитку плода, розвивається стан компенсованого метаболічного ацидозу, який пов'язаний з низьким рівнем бікарбонатів та CO_2 в крові й характеризується гіпоксією [10]. Організм, що розвивається, є найбільш чутливим до гіпоксичного впливу. Навіть невеликі зміни в кисневому забезпеченні тканин головного мозку можуть приводити до розвитку патологічних наслідків [9]. Нітрити, які вводяться вагітним з їжею та водою, здатні проникати крізь плацентарний бар'єр, і природним є факт, що збільшений вміст нітриту зумовлює розвиток гемічної гіпоксії плода [8]. Нами встановлено, що пренатальна хронічна метгемоглобінемія середньої тяжкості призводить до значного підвищення смертності серед нащадків. У нащадків гіпоксичних щурів-самок в перші години після народження смертність перевищувала даний показник контрольної групи в 3,5 раза. Відрізнявся також і показник виживання щурят від гіпоксичних і контрольних самок. Так, через тиждень після народження смертність серед контрольних нащадків дорівнювала нулю, а серед гіпоксичних складала 12,5 %.

Що стосується впливу гемічної гіпоксії на розвиток плода і взаємозв'язок процесів метаболізму білків у тканинах ЦНС в системі "плід – вагітна тварина", а також на розвиток головного мозку в процесі онтогенетичного періоду, то ці процеси досі вивчено недостатньо. Відомо, що стан компенсованого метаболічного ацидозу, який виникає в останній період пренатального онтогенезу в глибоковагітних щурів, тісно пов'язаний з гемічною гіпоксією, посиленням гліколітичних і гальмуванням аеробних процесів у тканинах, посиленням білкового катаболізму [10].

Метаболічний ацидоз і зміщення pH крові в бік ацидозу при хронічній метгемоглобінемії розглядають як компенсаторну реакцію організму у відповідь на кисневу недостатність, оскільки у підкисленому середовищі віддача O_2 оксигемоглобіном відбувається при більш високому Pa_{O2} [5].

Слід зазначити, що Hb як субстрат окиснення, перетворюючись у MetHb, підвищує свою пероксидазну активність і стає каталізатором оксидативних процесів.

ВИСНОВОК. Рентгенівське опромінення за дози 25 сГр, як і хронічне введення нітриту натрію, спричиняє підвищення вмісту метгемоглобіну в крові щурів, що свідчить про розвиток гемічної гіпоксії. Максимальні рівні концентрації метгемоглобіну визначено через 120 год після одноразового і фракціонованого опромінення. Гіпоксичний стан під дією нітриту натрію у дорослих самок спричиняє гемічну гіпоксію середньої тяжкості, а у нащадків –легкий ступінь тяжкості гемічної гіпоксії (3).

ЛІТЕРАТУРА

1. Биохимические методы исследования в клинике / Под ред. А.А. Покровского. – М.: Медицина, 1969. – 652 с.

2. Волкова Н.В. Изменение систем крови при воздействии некоторых метгемоглобинообразователей // Проблемы ранней диагностики и профилактики профессиональных заболеваний химической этиологии. – Л., 1973. – С. 88-91.

3. Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина. – Л.: Медицина, 1968. – 324 с.

4. Лещинська І.О., Дука Т.І., Шаповалова М.С., Чорна В.І. Вміст нервовоспецифічних білків NCAM, ГФКБ та S100B у сироватці крові після одноразового опромінення у дозі 0,25 Гр // Укр. радиол. журн. – 2000. – **8**, вып. 2, № 2. – С. 164-167.

5. Маньковская И.Н., Вавилова Г.Л., Харламова О.Н. и др. Активность маркерных ферментов клеточных мембран у крыс при адаптации к гипоксической гипоксии // Укр. биохим. журн. – 1997. – **69**, № 2. – С. 79-87.

6. Механизмы развития и компенсации гемической гипоксии / Под ред. М.М. Середенко. – К.: Наук. думка, 1989. – 200 с.

7. Перинатальная патология / Под ред. М. Студеникина, Ю. Кюльца, Г. Эггерса. – М.: Медицина, 1984. – С. 45-82.

8. Степанковская Г.К., Цыганенко О.Н., Слободяник О.Я. и др. Трансплацентарный перенос нитратов и их влияние на плод человека // Врач. дело. – 1993. – № 9. – С. 52-56.

9. Сулима О.Г. Проблема гіпоксично-ішемічних пошкоджень ЦНС у новонароджених // Укр. вісник психоневрології. – 1995. – Вип. 3, № 7. – С. 49-51.

10. Тупицька О.М., Захаренко М.О., Мельничук Д.О. та ін. Деякі аспекти взаємозв'язку обміну речовин вагітних тварин та їх плодів // Укр. біохім. журн. – 1997. – **69**, № 2. – С. 35-40.

11. Kashet H.S., Eman G., Helal E. et al. Mortality and body weight loss correlation with hematological and chromosomal changes with chronic g-irradiation and possible recovery // Int. J. Rad. Medicine. – 2005. – № 2. – P. 100-109.

12. Keyeux A., Brucher J.M., Ochrymowicz-Bemelmans D., Charlier A.A. Late effects of X irradiation on regulation of cerebral blood flow after whole-brain exposure in rats // Radiat. Res. – 1997. – **147**, № 5. – P. 621-630.

13. Mazurek A. Pediatric trauma: overiew of the problem // J. Post. Anesth. Nurs. – 1991. – **6**, № 5. – P. 331-335.

14. Par K.E., Jou I., Gwag B. Nerve growth factor potentinates the oxidative necrosis of striatal cholinergic neurons // Neuroreports. – 2002. – № 9. – P. 687-689.

15. Rana K., Malthotra N., Molbotra R. Effect of radiation on some hematological parametres and its modifications by vitamin E in chick // Indian Exp. Biol. – 2002. – **30**, № 1. – P. 60-61.

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ И НИТРИТНОЙ МЕТГЕМОГЛОБИНЕМИИ НА СОДЕРЖАНИЕ МЕТГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС И ИХ ПОТОМСТВА В ДИНАМИКЕ РАННЕГО ПОСТНАТАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

В.И. Черная
ДНЕПРОПЕТРОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Исследовано развитие гемической гипоксии при действии малых доз ионизирующего излучения при однократном и фракционированном облучении крыс (0,25 Гр). Определено влияние экспериментальной гемической гипоксии на содержание метгемоглобина в крови крыс-самок, а также их потомства одного приплода в динамике постнатального развития. В результате эксперимента установлено, что рентгеновское облучение, как и хроническое введение нитрита натрия, приводит к повышению содержания метгемоглобина в крови крыс, что свидетельствует о развитии различных форм гемической гипоксии в зависимости от срока постгипоксического периода.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **гемическая гипоксия, рентгеновское облучение, метгемоглобин.**

INFLUENCE OF IONIZING RADIATION AND NITRITE METHAEMOGLOBINEMY ON METHAEMOGLOBIN CONTENT IN BLOOD OF ADULT RATS AND THEIR POSTERITY IN DYNAMICS OF EARLY POSTNATAL DEVELOPMENT

V.I. Chorna
DNIPROPETROVSK NATIONAL UNIVERSITY

Summary

The development of haemic hypoxia under low doses of ionizing irradiation action at single and fractioned radiation of rats (0,25 Gr) was researched. The influence of experimental haemic hypoxia on haemoglobin conteint in blood of both female rats and their posterity in dynamics of postnatal development was established. As a result of experiment it was obtained that both X-ray radiation and chronic introduction of sodium nitrite lead to increasing of methaemoglobin in rat blood and testified to the development of different forms of haemic hypoxia in dependence on posthypoxic period stage.

KEY WORDS: **haemic hypoxia, X-ray radiation, methaemoglobin.**

Отримано 17.10.2008 р.

Адреса для листування: *В.І. Чорна, Дніпропетровський національний університет, просп. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна.*

УДК 615.218:54.062:542.61

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ТА ЕКСТРАКЦІЯ ДЕЗЛОРАТАДИНУ ОРГАНІЧНИМИ РОЗЧИННИКАМИ З ВОДНИХ РОЗЧИНІВ ЗАЛЕЖНО ВІД РН СЕРЕДОВИЩА

О.Б. Поляк

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Розроблено УФ-спектрофотометричну методику кількісного визначення дезлоратадину в етанолі. Вивчено ефективність екстракції дезлоратадину хлороформом, діетиловим етером та гексаном з водних розчинів при різних значеннях pH середовища. Результати досліджень можуть бути використані при хіміко-токсикологічному аналізі дезлоратадину.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **дезлоратадин, УФ-спектрофотометрія, кількісне визначення, екстракція, хіміко-токсикологічний аналіз.**

ВСТУП. На сьогодні відомо понад 150 антигістамінних препаратів, які широко використовують для лікування різних проявів алергії. Інтоксикації препаратами даної групи займають одне з провідних місць серед отруєнь лікарськими засобами. Усім відомі випадки отруєнь антигістамінними препаратами, які проявляють седативну та холінолітичну дії (димедрол, піпольфен, супрастин, тавегіл та ін.). В останні десятиріччя XX століття з'явилося II покоління H_1-гістаміноблокуючих препаратів, які не проникають крізь гематоенцефалічний бар'єр і не мають вираженої холінолітичної активності, тому їх широко використовують у медичній практиці (терфенадин, астемізол, лоратадин) [2, 6]. Фармакодинаміка цих препаратів має, мабуть, інший напрямок, проте в літературі також описані неодноразові випадки отруєнь даними препаратами, в тому числі лоратадином [5].

В наш час з'явилися препарати III покоління (фексофенадин, дезлоратадин, норастемізол), які є активними метаболітами неседативних антигістамінних засобів. Передбачається, що ці препарати будуть мати терапевтичні переваги над своїми попередниками. Дія даних препаратів на людський організм ще неповністю вивчена. Рекомендується обережно використовувати лоратадин та дезлоратадин, враховуючи побічні ефекти інших неседативних антигістамінних препаратів та порівняно короткий термін застосування лоратадину та його метаболіту в клінічній практиці [7].

© О.Б. Поляк, 2009.

В літературі описані випадки кардіотоксичної дії дезлоратадину при прийманні його в терапевтичних дозах щурами, морськими свинками, собаками [9-11].

В хіміко-токсикологічному відношенні дезлоратадин практично не досліджували, відсутні методи кількісного визначення даного препарату, придатні для хіміко-токсикологічного аналізу, не розроблені методи ізолювання дезлоратадину з об'єктів біологічного походження [3, 8], тому дослідження в цьому напрямку є актуальними.

Мета нашої роботи полягала у визначенні дезлоратадину методом УФ-спектрофотометрії та вивченні умов його екстракції з водних розчинів залежно від природи розчинника і pH середовища.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Попередньо нами були зняті УФ-спектри дезлоратадину в етанолі, 0,1 моль/л розчині кислоти хлоридної, хлороформі (концентрація препарату – 10 мг/л). Спектри знімали на спектрофотометрі СФ-46 у діапазоні довжин хвиль 220-310 нм в кюветі з оптичним шляхом 10,0 мм.

Встановлено, що в усіх вивчених розчинах дезлоратадин в діапазоні довжин хвиль 220-310 нм має характерні смуги поглинання. При цьому в різних розчинниках спостерігається різний максимум поглинання: в етанолі – при довжині хвилі (246±2) нм, в 0,1 моль/л розчині кислоти хлоридної – при (280±2) нм і в хлороформі – при (248±2) нм.

Для кількісного визначення дезлоратадину ми використовували дані спектра в етанолі

(найбільше значення питомого і молярного показників поглинання), тому що спектр в 0,1 моль/л розчині кислоти хлоридної не має чітких максимумів, а з хлороформними розчинами незручно працювати через його леткість (при зберіганні змінюються максимуми поглинання та довжина хвилі).

Для розрахунку вмісту дезлоратадину в розчинах користувались градуювальним графіком або рівнянням прямої, яке було розраховано за допомогою методу найменших квадратів [1]:

$A = 0{,}0446\,C - 0{,}005$, (1)

де A – оптична густина розчину;

C – вміст дезлоратадину в пробі, мкг.

Коефіцієнт кореляції r = 0,9998.

Побудова градуювального графіка (етанольний розчин дезлоратадину). Готували стандартний розчин дезлоратадину в етанолі, в 1 мл якого містилось 200 мкг препарату. Шляхом його розведення одержували розчини дезлоратадину з концентраціями 25, 20, 16, 10, 8, 5, 4, 2 мг/л. Оптичну густину одержаних розчинів вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 (довжина хвилі λ=(246±2) нм) в кюветі з оптичним шляхом 10,0 мм. Як розчин порівняння використовували етанол. За результатами вимірювання оптичної густини розраховували питомі та молярні коефіцієнти світлопоглинання та будували градуювальний графік.

Розроблений спектрофотометричний метод ми використовували для кількісного визначення дезлоратадину в розчинах різної концентрації. Розрахунок кількості дезлоратадину в розчинах здійснювали із застосуванням питомого коефіцієнта світлопоглинання або градуювального графіка (рис. 1).

Концентрацію дезлоратадину (моль/л) в розчинах за питомим показником поглинання розраховували за формулою:

$$C = \frac{\mathrm{A}}{A^{1\%}_{1\,см} \cdot b}, \quad (2)$$

де A – оптична густина;

$A^{1\%}_{1\,см}$ – питомий показник поглинання;

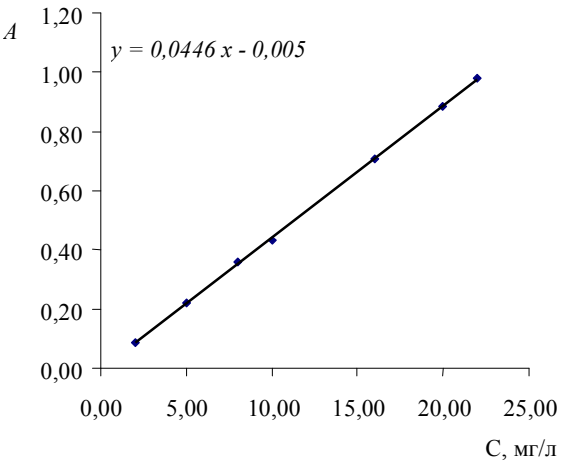
b – довжина оптичного шляху, см.

Розроблені умови кількісного визначення дезлоратадину були застосовані нами при вивченні ступеня його екстракції (R) органічними розчинниками з водних розчинів з різним значенням pH.

Для роботи використовували розчин дезлоратадину в 0,1 моль/л розчині кислоти хлоридної з концентрацією 200 мг/л, універсальну буферну суміш (УБС) [4]. Кислотність буферних розчинів контролювали потенціометрично. Використовували розчини з pH від 2,0 до 12,0. Як органічні розчинники (екстрагенти) брали свіжоперегнані хлороформ, діетиловий етер, гексан.

Екстракцію дезлоратадину проводили одноразово за такою методикою. У ділильну лійку вносили 9 мл УБС з відповідним значенням pH, додавали 1 мл розчину дезлоратадину в 0,1 моль/л кислоті хлоридній з концентрацією 200 мг/л і 10 мл органічного розчинника. Лійку струшували на механічному струшувачі протягом 10 хв (частота – 120 хв$^{-1}$) і залишали на 10 хв для розділення шарів. Шар органічного розчинника відділяли у фарфорову чашку, розчинник випаровували на водяній бані при температурі 40-50 °С (діетиловий етер – при кімнатній температурі). До сухих залишків додавали по 10 мл етанолу, перемішували протягом 10 хв і в отриманих розчинах визначали кількість екстрагованого дезлоратадину спектрофотометром СФ-46 та за побудованим градуювальним графіком (див. рис. 1). При відділенні органічного розчинника через шар безводного натрій сульфату спостерігали зменшення ступеня екстракції на 5-6 % за рахунок процесів сорбції.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати обчислення питомих та молярних коефіцієнтів світлопоглинання і побудови градуювального графіка наведені в таблиці 1 та на рисунку 1. Обробку отриманих даних проводили з використанням програми Excel пакета



Регресійна статистика

Множинний R	0,999846
R^2	0,999692
Нормований R^2	0,999631
Стандартна похибка	0,006534
Спостереження	7

Рис. 1. Градуювальний графік для спектрофотометричного визначення дезлоратадину в етанолі.

програм Microsoft Office 2000 Professional. На основі даних, наведених в таблиці 1 і на рисунку 1, можна зробити висновок, що оптична густина розчинів дезлоратадину в етанолі підпорядковується закону світлопоглинання Бугера-Ламберта-Бера в інтервалах концентрацій від 2 до 22 мг/л.

Результати спектрофотометричного визначення дезлоратадину в розчинах за допомогою розробленої методики наведені в таблиці 2. Вони свідчать про те, що відносна похибка методу становить 1,18 %. Одержані дані є достовірними, тому що перебувають в межах довірчого інтервалу.

Таблиця 1 – **Результати статистичної обробки величини питомого ($A_{1\,см}^{1\%}$) та молярного (ε) коефіцієнтів світлопоглинання розчинів дезлоратадину в етанолі (середнє з п'яти визначень)**

Концентрація дезлоратадину, мкг/мл	Оптична густина, *A*	$A_{1\,см}^{1\%}$		ε	
		$A_{1\,см}^{1\%} i$	Метрологічні характеристики	ε_i	Метрологічні характеристики
2,0	0,085	425,00	$\overline{X}$ = 439,23 *S* = 8,46 $S\overline{x}$ = 3,19 $\Delta\overline{X}$ = 7,82 μ = 1,78 $X+\Delta\overline{X}=$ = 439,23 ± 7,82	13210,28	$\overline{X}$ = 13652,59 *S* = 262,77 $S\overline{x}$ = 99,16 $\Delta\overline{X}$ = 242,94 μ = 1,78 $X+\Delta\overline{X}=$ =13652,59±24,94
5,0	0,221	442,00		13738,69	
8,0	0,358	447,50		13909,64	
10,0	0,430	430,00		13365,69	
16,0	0,706	441,25		13715,37	
20,0	0,885	442,50		13754,23	
22,0	0,982	446,36		13874,21	

Таблиця 2 – **Результати спектрофотометричного визначення дезлоратадину в етанолі, розраховані за градуювальним графіком (середнє з трьох визначень)**

Концентрація дезлоратадину, мг/л	Оптична густина, *A*	Знайдено дезлоратадину		Метрологічні характеристики
		мг/л	%	
2,0	0,085	2,0	100,00	$\overline{X}$ = 100,2 *S* = 1,27 $S\overline{x}$ = 0,48 $\Delta\overline{X}$ = 1,18 ε = 1,18 $X+\Delta\overline{X}=$ = 100,2 ± 1,18
5,0	0,221	4,9	98,00	
8,0	0,358	8,1	101,25	
10,0	0,430	9,9	99,00	
16,0	0,706	16,2	101,25	
20,0	0,885	20,2	101,00	
22,0	0,982	22,2	100,90	

Результати визначення ступеня екстракції дезлоратадину наведені на рисунку 2. Вони вказують на те, що екстракція дезлоратадину має місце вже в кислих розчинах. Так, при pH 2,0 ступінь одноразової екстракції хлороформом складає 17,0 %, діетиловим етером – 9,5 %. У випадку з гексаном екстракція дезлоратадину практично не залежить від pH середовища й становить 7,0-11,0 %. Максимальний ступінь екстракції дезлоратадину хлороформом (83,0-94,0 %) має місце при pH 7-8, діетиловим етером (78,0 %) – при pH 11.

Таким чином, найбільш придатним розчинником для виділення дезлоратадину з водних розчинів є хлороформ. Гексан зручно використовувати для очищення витяжок з біологічного матеріалу від співекстрактивних речовин в кислому середовищі.

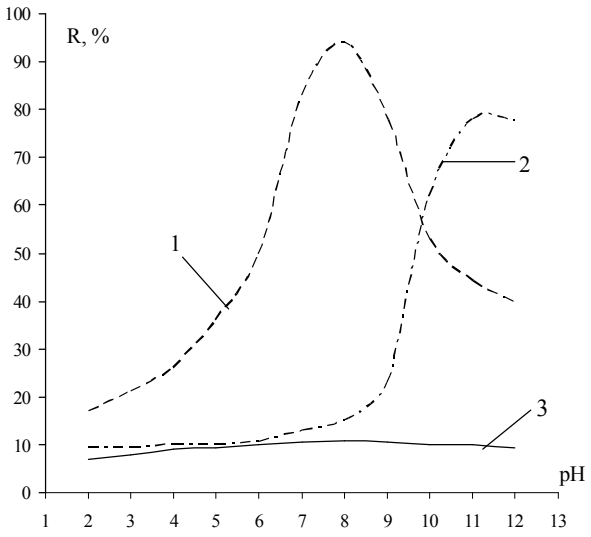


Рис. 2. Залежність ступеня екстракції дезлоратадину від pH середовища та природи органічного розчинника: 1 – хлороформ; 2 – діетиловий етер; 3 – гексан.

ВИСНОВКИ. 1. Розроблено УФ-спектрофотометричну методику кількісного визначення

дезлоратадину в етанолі (відносна похибка – 1,18 %, підпорядкування основному закону світлопоглинання в межах 2,0-22,0 мг/л).

2. Ефективність екстракції дезлоратадину з водних розчинів залежить від pH середовища та природи органічного розчинника: максимальний ступінь екстракції дезлоратадину хлороформом (83,0-94,0 %) має місце при pH 7-8, екстракція гексаном практично не залежить від pH середовища й становить 7,0-11,0 %.

3. Результати даних досліджень можуть бути використані для розробки оптимальних умов ізолювання дезлоратадину з біологічного матеріалу при хіміко-токсикологічному аналізі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Алесковский Б.В., Бардин В.В., Байчинова Е.С. Физико-химические методы анализа. – Л.: Химия, 1988. – 376 с.

2. Бертрам Г. Катцунг. Базисная и клиническая фармакология. – М.: Бином, 1998. – **1**. – 612 с.

3. Болотов В.В., Стадніченко Е.І., Бондар В.С. Посібник до практичних занять з токсикологічної хімії. – Х.: Основа, 1997. – 165 с.

4. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. – М.: Химия, 1979. – 312 с.

5. Поляк О.Б. Хіміко-токсикологічне дослідження лоратадину: Автореф. дис. … канд. фарм. наук. – Х., 2005. – 20 с.

6. Руководство по медицине / Под ред. Р. Беркоу, Э. Флетчера. – М.: Мир, 1997. – **1**. – С. 210-215.

7. Abdelaziz M., Khair O. The potential of active metabolites of antihistamines in the management of allergic disease // Allergy. – 2000. – **55**. – P. 425-434.

8. Clarke's isolation and identification of drugs. Second Edition / Consulting Edition A.S. Moffat. – London.: The Pharmaceutical Press, 1986. – 1223 p.

9. Igawa A., Cheng C.P., Little W.C. Desloratadine, but not fexofenadine, increases heart rate in dogs before and after heart failure // Allergy. – 2001. – **56** (suppl. 68). – P. 645.

10. Kramer J., Obejero-Paz C., Brown A. et al. Descarboethoxyloratadine is more potent than diphenhydramine, loratadine, and fexofenadine at inhibiting muscarinic type 2 (M_2) receptor-activated κ^+ current in atrial guinea pig cardiomyocytes // Chan Test Inc Neo Parkway, Cleveland, OH, USA; Departments of Psychiatry and Pharmacology, Perm State University College of Medicine, Hershey, PA, USA.

11. Offord S.J., Molnar C. Comparison of the HI-histamine and muscarinic receptor binding profiles of fexofenadin // ACI Int. – 2000. – Suppl. 2. – P. 152.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ И ЭКСТРАКЦИЯ ДЕЗЛОРАТАДИНА ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ PH СРЕДЫ

О.Б. Поляк

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

Разработано УФ-спектрофотометрическую методику количественного определения дезлоратадина в этаноле. Изучено эффективность экстракции дезлоратадина хлороформом, диэтиловым эфиром и гексаном из водных растворов при разных значениях pH среды. Результаты исследований могут быть использованы при химико-токсикологическом анализе дезлоратадина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **дезлоратадин, УФ-спектрофотометрия, количественное определение, экстракция, химико-токсикологический анализ.**

UV-SPECTROPHOTOMETRICAL DETECTION AND EXTRACTION OF DESLORATADINE BY ORGANIC SOLVENTS FROM AQUEOUS SOLUTIONS IN DEPENDENCE ON PH OF MEDIUM

O.B. Polyak

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

The UV-spectrophotometrical technique of quantitative detection of desloratadine in ethanol has been developed. The efficiency of desloratadine extraction by chloroform, ether and hexan from aqueous solutions at different meanings of medium pH has been investigated. The results of researches can be used for chemical and toxicological analysis of desloratadine.

KEY WORDS: **desloratadine, UV-spectrophotometry, quantitative detection, extraction, chemical and toxicological analysis.**

Отримано 11.09.2008 р.

Адреса для листування: *О.Б. Поляк, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.*

УДК 616.379-008.64:577.117

ІНДУКОВАНІ ДІАБЕТОМ ПОРУШЕННЯ ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ ТА ФУНКЦІЙ МІТОХОНДРІЙ У МОЗКУ ЩУРІВ

Т.М. Кучмеровська, І.О. Шиманський, Г.В. Донченко, М.М. Великий, Н.М. Гуріна, А.П. Клименко

ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ, КИЇВ

ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМ. Р.Є. КАВЕЦЬКОГО, КИЇВ

Виявлено взаємозв'язок між порушеним енергетичним метаболізмом у тканині мозку та функціональним станом мітохондрій, що свідчить про їх важливу роль в індукції дисфункцій нервових клітин за цукрового діабету. Введення діабетичним тваринам ацетил-L-карнітину показало його ефективну нейропротекторну дію на енергетичний метаболізм. Одержані результати свідчать про доцільність застосування ацетил-L-карнітину в клініці лікування діабетичної нейропатії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **цукровий діабет, нейропатія, ацетил-L-карнітин, мембранний потенціал, ATP, ATP/ADP.**

ВСТУП. Останнім часом зростає кількість даних про те, що цукровий діабет (ЦД) призводить до істотних змін у функціонуванні головного мозку [7]. Це відносно малодосліджене ускладнення має назву "діабетична енцефалопатія". Більшість нейрохімічних змін у ЦНС за діабету є вторинними відносно цереброваскулярних і метаболічних порушень [5]. У ряді досліджень виявлено, що мітохондрії можуть відігравати важливу роль у забезпеченні нормального функціонування мозку [14]. Відомо, що у функціонуванні мітохондрій важлива роль належить L-карнітину, який бере участь у транспорті жирних кислот через внутрішню мітохондріальну мембрану до матриксу, де вони окиснюються, продукуючи енергію в різних тканинах [16]. Більше того, крім участі карнітину в β-окисненні довголанцюгових жирних кислот, він також сприяє клітинній дезінтоксикації, оптимізує метаболічні реакції з участю коферменту А, а також обмін глюкози та білків [12].

Накопичення довголанцюгових жирних кислот, а також порушення їх β-окиснення внаслідок дефіциту L-карнітину та/або його етерифікованих похідних можуть негативно впливати на функцію нервових клітин за ЦД, зокрема порушуючи цілісність цитоплазматичної та мітохондріальної мембран, внутрішньоклітинний метаболізм та енергоутворення [9].

Метою даної роботи було з'ясування наявності можливого зв'язку між порушеннями енергетичних процесів головного мозку щурів та функціональним станом мітохондрій, а також можливих механізмів нейропротекторної дії ацетил-L-карнітину (AL-карнітин).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 150-170 г. Цукровий діабет (6 тижнів) викликали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину, розчиненого в 0,1 М цитратному буфері, pH=4,5, у дозі 60 мг/кг маси тіла. Рівень глюкози крові визначали за допомогою глюкометра Precision Xtra *Plus* (MediSense UK Ltd., Oxon, UK). AL-карнітин у дозі 150 мг/кг вводили щурам внутрішньоочеревинно упродовж 2-х тижнів після 4-х тижнів розвитку ЦД.

Тварин декапітували натщесерце під легким ефірним наркозом. Швидко вилучали мозок, поміщали в холодний фізіологічний розчин та гомогенізували в 0,32 М сахарозі (співвідношення 1:9). Синаптосоми головного мозку виділяли методом диференційного центрифугування в градієнті густини сахарози за методом I.P. Abita et al. [4]. В основу процедури виділення мітохондрій було покладено метод, описаний P.I. Moreira et al. [13]. Мембранний потенціал мітохондрій визначали за поглинанням родаміну 123 (Rh123) спектрофлуорометричним методом [17].

Рівень ATP та АДР визначали ферментативно за H.U. Bergmeyer у депротеїнізованих

© Т.М. Кучмеровська, І.О. Шиманський, Г.В. Донченко, М.М. Великий, Н.М. Гуріна, А.П. Клименко, 2009.

та деіонізованих кислотних екстрактах [6]. Вміст білка – за O.H. Lowry et al. [11]. Статистичний аналіз одержаних даних здійснювали, використовуючи стандартний t-критерій Стьюдента для некорельованих виборок [2].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При експериментальному ЦД рівень глюкози крові у щурів підвищувався у 4,7 раза порівняно з контрольними тваринами і становив (22,5±2,7) ммоль/л. Відомо, що за ЦД інтенсифікуються процеси перекисного окиснення ліпідів, що супроводжується порушенням структури та функцій біологічних мембран [8]. У свою чергу, спонтанне та індуковане окиснення ненасичених жирних кислот активними формами кисню призводить до зменшення їх відносного вмісту та зростання співвідношення насичені/ненасичені жирні кислоти. При цьому спостерігаються зміни впорядкованості мембранних фосфоліпідів, які викликають порушення плинності мембран, а також зміни у функціонуванні іонотранспортних структур, що може позначатись на генеруванні мембранних потенціалів [1].

Як свідчать дані, представлені на рисунку 1, діабет призводив до суттєвого зниження мембранного потенціалу мітохондрій з головного мозку щурів, оскільки флуоресценція Rh123 підвищувалась на 21 %. Ці зміни супроводжувались зменшенням як вмісту АТР (рис. 2), так і співвідношення ATP/ADP в синаптосомах головного мозку тварин (рис. 3), що свідчить про індуковані діабетом порушення у функціонуванні електронно-транспортного ланцюга та енергетичного спряження процесу перенесення електронів із синтезом АТФ (окисне фосфорилювання ADP). Отримані дані можуть вказувати на недостатню ефективність за умов цукрового діабету механізму дихального контролю, оскільки зазвичай зниження ATP/ADP посилює інтенсивність дихання мітохондрій, тобто процес спряження окиснення субстратів та фосфорилювання ADP з утворенням АТР.

Виявлений в синаптосомах мозку дефіцит АТР деякою мірою пояснює встановлене в наших попередніх дослідженнях зниження активності Na^+,K^+-АТРази, що може бути однією з причин часткової деполяризації синаптичних мембран [15]. Не виключено також, що зміни мембранного потенціалу за ЦД супроводжуються порушенням пресинаптичної функції, зокрема підвищенням вивільнення серотоніну нервовими закінченнями [3].

На сьогодні вважають, що потенційна терапевтична роль ацетил-карнітину в лікуванні церебральної ішемії, яка супроводжує розвиток діабетичної нейропатії, полягає у впливі на механізми, що включають більш швидке відновлення та покращення енергетичного обміну мозку, а також зниження рівня L-карнітину протягом ранньої постішемічної реперфузії [10]. Дійсно, введення AL-карнітину призводило до суттєвого відновлення функцій мітохондрій за рахунок підвищення їх мембранного потенціалу, як і вмісту АТР та співвідношення ATP/ADP в синаптосомах мозку (див. рис. 1-3). Можна вважати, що нейропротекторна дія AL-карнітину реалізується через його здатність модифікувати переважно ті мембраноасоційовані процеси, які залежать від рівня енергоутворення у клітинах. Однак нами не виявлено будь-якого істотного впливу AL-карнітину на рівень глюкози плазми крові.

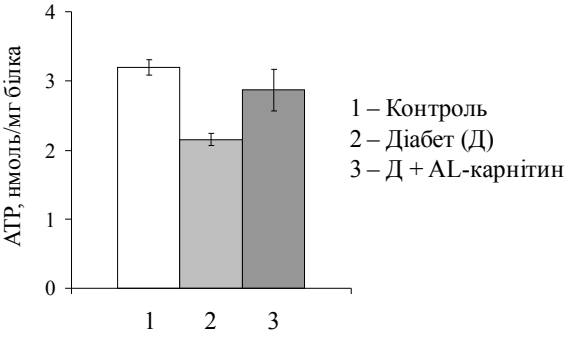


Рис. 2. Вміст АТР в синаптосомах мозку (M±m, n=5-7).

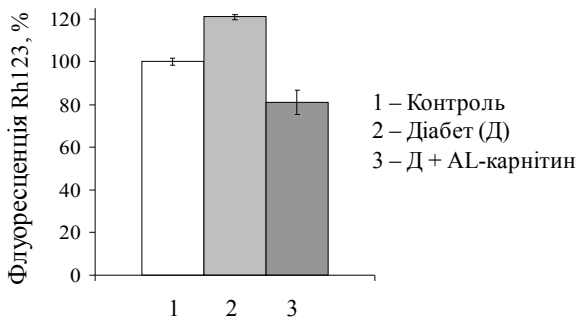


Рис. 1. Мітохондріальний мембранний потенціал (delta psi) (M±m, n=5).

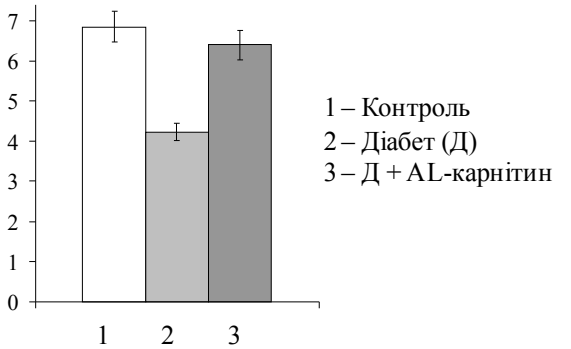


Рис. 3. Співвідношення ATP/ADP в синаптосомах головного мозку (M±m, n=5-7).

Таким чином, у роботі встановлено тісний взаємозв'язок між порушеним енергетичним метаболізмом та функціональним станом мітохондрій, що може відігравати важливу роль в індукції дисфункцій нервових клітин за цукрового діабету.

Позитивна нейропротекторна дія AL-карнітину на функціонування мозку переважно може опосередковуватись його нормалізуючим впливом на енергетичний метаболізм. Отримані дані доповнюють наше розуміння метаболічних порушень за діабетичної нейропатії та сприятимуть розробці нових ефективних препаратів на основі AL-карнітину, дія яких спрямована на корекцію енергетичних процесів.

ВИСНОВКИ. 1. Експериментальний стрептозотоциновий діабет супроводжується порушеннями енергетичного метаболізму в тканині мозку та функціонального стану мітохондрій.

2. Ацетил-L-карнітин здатен проявляти нормалізуючу дію на енергетичний метаболізм за цукрового діабету.

ЛІТЕРАТУРА

1. Губский Ю.И., Борюшко А.Г., Шнурко Д.В. и др. Взаимодействие антиоксидантов различной химической структуры с фосфолипидным бислоем // Укр. биохим. журн. –1994. – **66**, № 2. – С. 47-53.

2. Плохинский И.А. Биометрия. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1970. – 368 с.

3. Шиманський І.О., Донченко Г.В., Клименко А.П. Кучмеровська Т.М. Механізми індукованих цукровим діабетом порушень процесу вивільнення серотоніну синаптосомами головного мозку щурів: ефект нікотинаміду // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 4. – С. 130-136.

4. Abita I.P., Chicheportiche R., Schweitz M. Effect of neurotoxins (veratridine, sea anemonetoxin, tetrodotoxin) on transmitter accumulation. Release by nerve terminals in vitro // Biochemistry. – 1977. – **16**, № 9. – P. 1838-1864.

5. Adili F., Larijani B., Haghighatpanah M. Diabetic patients: Psychological aspects // Ann. NY Acad. Sci. – 2006. – **1084**. – P. 329-349.

6. Bergmeyer H.U. Methods of Enzymatic Analysis. – NY S.-F., Z.: Verlag Chemie, Weinheim, 1974. – **4**. – 2300 p.

7. Biessels G.J., Kappelle A.C., Bravenboer B. et al. Cerebral function in diabetes mellitus // Diabetologia. – 1994. – **37**, № 7. – P. 643-650.

8. Cotter M.A., Love A., Watt M.J. et al. Effects of natural free radical scavengers on peripheral nerve and neurovascular function in diabetic rats // Diabetologia. – 1995. – **38**, № 11. – P. 1285-1294.

9. Hagen T.M., Wehr C.M., Ames B.N. Mitochondrial decay in aging. Reversal through supplementation of acetyl-L-carnitine and N-tert-butyl-alpha-phenyl-nitrone // Ann. NY Acad. Sci. – 1998. – **20**, № 854. – P. 214-223.

10. Ido Y., McHowat J., Chang K.C. et al. Neural dysfunction and metabolic imbalances in diabetic rats. Prevention by acetyl-L-carnitine // Diabetes. – 1994. – **43**, № 12. – P. 1469-1477.

11. Lowry O.H., Rosenrough N.I., Farr A.L., Randal R.I. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, № 1. – P. 265-275.

12. Mingrone G. Carnitine in type 2 diabetes // Ann. NY. Acad. Sci. – 2004. – **1033**. – P. 99-107.

13. Moreira P.I., Santos M.S., Moreno A.M. et al. Increases vulnerability of brain mitochondria in diabetic (Goto-Kakizaki) rats with aging and amyloid-β exposure // Diabetes. – 2003. – **52**. – P. 1449-1456.

14. Nicholls D.G. Bioenergetics and transmitter release in the isolated nerve terminal // Neurochem. Res. – 2003. – **10**. – P. 1433-1441.

15. Obrosova I., Kuchmerovskaya T., Parkhomets P. et al. Effect of AL-01576 on brain neurotransmission in STZ-diabetic and galactose-fed rats // Elsevier Science B.V. Ed.: N. Hotta, D.A. Greene, I.D. Ward, A.A.F. Sima, A.I.M. Boulton. – 1995. – P. 249-255.

16. Wolfgang M.J., Kurama T., Dai Y. The brain-specific carnitine palmitoyltransferase-1c regulates energy homeostasis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – **103**, № 19. – P. 7282-7287.

17. Zhao Kesheng, Zhao Guo-Min, Wu D. et al. Cell-permeable peptide antioxidants targeted to inner mitochondrial membrane inhibit mitochondrial swelling oxidative cell death, and reperfusion injury // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, № 33. – P. 34682-34690.

ИНДУЦИРОВАННЫЕ ДИАБЕТОМ НАРУШЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА И ФУНКЦИЙ МИТОХОНДРИЙ В МОЗГЕ КРЫС

Т.М. Кучмеровская, И.А. Шиманский, Г.В. Донченко, Н.Н. Великий, Н.М. Гурина, А.П. Клименко
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А.В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАИНЫ, КИЕВ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ И РАДИОБИОЛОГИИ ИМ. Р.Е. КАВЕЦКОГО, КИЕВ

Резюме

Обнаружено взаимосвязь между нарушенным энергетическим метаболизмом в ткани мозга и функциональным состоянием митохондрий, что свидетельствует об их важной роли в индукции дисфункций нервных клеток при сахарном диабете. Введение диабетическим животным ацетил-L-карнитина показало его эффективное нейропротекторное действие на энергетический метаболизм. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения ацетил-L-карнитина в клинике лечения диабетической нейропатии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **сахарный диабет, нейропатия, ацетил-L-карнитин, мембранный потенциал, ATP, ATP/ADP.**

DIABETES-ASSOCIATED IMPAIRMENT OF ENERGY METABOLISM AND MITOCHONDRIAL FUNCTION IN RAT BRAIN

T.M. Kuchmerovska, I.O. Shymansky, H.V. Donchenko, M.M. Velyky, N.M. Hurina, A.P. Klymenko
INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY BY O.V. PALLADIN OF NAS OF UKRAINE, KYIV
INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, ONCOLOGY AND RADIOBIOLOGY BY R.YE. KAVETSKY OF NAS OF UKRAINE

Summary

It was established a close relation between impaired energy metabolism and mitochondrial dysfunction related to diabetes. These data suggest substantional role of these abnormalities in derangement of brain function associated with diabetes. Beneficial action of acetyl-L-carnitine treatment on nervous cells function was found which is most likely mediated by its normalizing effect on energy metabolism. It was suggested that acetyl-L-carnitine action could be useful in clinic treatment of diabetic neuropathy.

KEY WORDS: **diabetes mellitus, neuropathy, acetyl-L-carnitine, membrane potential, ATP, ATP/ADP.**

Отримано 27.10.2008 р.

Адреса для листування: *Т.М. Кучмеровська, Інститут біохімії ім. І.В. Палладіна НАН України, вул. Леонтовича, 9, Київ, 01601, Україна.*

УДК 615.014.21/.453:582.998 + 577.112.37/.164.2

ІДЕНТИФІКАЦІЯ І КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЦИНК АСПАРАГІНАТУ В БАГАТОКОМПОНЕНТНОМУ ЛІКАРСЬКОМУ ЗАСОБІ

В.М. Коваль, Л.В. Вронська
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

При підготовці аналітико-нормативної документації на нові лікарські засоби перш за все розробляють методики ідентифікації і кількісного визначення діючих речовин. Нами розроблено методику атомно-абсорбційного визначення вмісту цинк аспарагінату в новому лікарському засобі, що містить вітаміни та сухі рослинні екстракти.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **цинк аспарагінат, атомно-абсорбційний аналіз, тонкошарова хроматографія, таблетки.**

ВСТУП. Імунна система захищає організм від проникнення "чужих" білків – мікробних, вірусних, паразитарних, рослинних тощо. Вона знищує власні тканини і клітини, що піддалися трансформації, переродженню, старінню, відмиранню. З розвитком техніки і технології, забрудненням навколишнього середовища, розвитком хімії, наслідками Чорнобильської трагедії спостерігається поширення алергічних, онкологічних та інших захворювань. Це пов'язують з порушенням імунної системи організму [3]. Для її регуляції як лікарські засоби використовують імуномодулятори, тобто речовини, що проявляють вплив на окремі механізми імунних реакцій [4].

На особливу увагу заслуговують імуностимулятори рослинного походження, зокрема на основі ехінацеї. Найчастіше ехінацею поєднують з кислотою аскорбіновою та мікроелементами, особливо із солями цинку. Цинк є компонентом ряду металоферментів (карбоангідраза, лужна фосфатаза, карбоксипептидаза, алкогольдегідрогеназа, оксидоредуктаза, трансферази, гідролази, ізомерази й ін.), бере участь у реакціях синтезу ДНК, інсуліну, синтезу і розпаду РНК, у метаболізмі ліпідів і білків, сприяє нормальному функціонуванню Т-лімфоцитів, проявляючи імуномодулюючу дію. Знижуючи неспецифічну проникність мембран клітин, попереджує розвиток фіброзу [5, 7].

Серед солей цинку в останні роки використовують цинк аспарагінат. Цинк аспарагінат як монопрепарат застосовують при багатьох патологіях: у комплексній терапії хронічної дихальної недостатності, при фіброзі легень, пневмосклерозі, хронічних формах туберкульозу легень, вторинних імунодефіцитах, дефіциті цинку, цирозі печінки, як загальнозміцнювальний засіб у людей літнього віку. Тому перспективним стало створення лікарського засобу, який поєднав би у собі імуномодулюючі властивості ехінацеї, посилені цинк аспарагінатом і аскорбіновою кислотою.

Метою нашої роботи була розробка методики ідентифікації і кількісного визначення цинк аспарагінату в таблетках, які містять малу кількість цинк аспарагінату і значну кількість аскорбінової кислоти та сухого екстракту ехінацеї.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Випробування з тотожності цинк аспарагінату проводили з використанням характерних фармакопейних реакцій на іони цинку з певною модифікацією пробопідготовки та за допомогою методу тонкошарової хроматографії (ТШХ) з метою ідентифікації аспарагінат-іонів. Для ТШХ застосовували хроматографічні пластинки із шаром силікагелю G фірми "Merck". З метою розчинення і підготовки зразків цинк аспарагінату для хроматографічного виявлення використовували аміаку розчин концентрований кваліфікації "чда". Проявлення аспарагінової частини молекули цинк аспарагінату проводили шляхом обробки хроматограм розчином нінгідрину кваліфікації "чда".

Дослідження кількісного вмісту виконували на атомно-абсорбційному спектрофотометрі novAA 300, використовуючи як джерело резонансного монохроматичного випромінювання лампу з порожнистим цинковим катодом. Як джерело атомізації застосовували полум'я, яке отримували шляхом горіння суміші ацетилен-

© В.М. Коваль, Л.В. Вронська, 2009.

повітря, висота полум'я – 6 мм. Вимірювали оптичну густину полум'я при аналітичній довжині хвилі поглинання атомів цинку 213,9 нм і ширині щілини 0,2 мм, струмі лампи 10 мА.

Для приготування стандартних розчинів цинку використовували стандарт Lot № HC 763718 Multi Element Standart Solution VII CertiPur (24 elements in dilute Nitric acid) фірми "Merck" з концентрацією цинку 100 мг/л і високоочищену воду.

Для мінералізації зразків таблеток застосовували нітратну і сульфатну кислоти кваліфікації чистоти "осч". У роботі використовували фільтрувальний папір беззольний щільністю "червона стрічка".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Цинк аспарагінат не описаний в Державній Фармакопеї України [1], а також провідних фармакопеях світу [5] як субстанція чи реактив. Тому є актуальною розробка методів його аналізу як в субстанції, так і в складі комплексних лікарських засобів.

Дослідження тотожності цинк аспарагінату. Цинк аспарагінат за зовнішнім виглядом є білим кристалічним сипучим порошком, малорозчинним у воді, але розчинним в розчині аміаку. Тому саме аміачний розчин цинк аспарагінату піддавали випробуванням на встановлення тотожності іонів цинку та аспарагінової частини (аспарагінат-іони).

Методика ідентифікації іонів цинку в цинк аспарагінаті. 0,6 г порошку розтертих таблеток поміщають в центрифужну пробірку місткістю 15 мл, додають 5 мл розчину аміаку розведеного Р1, перемішують протягом 5 хв і центрифугують (*випробуваний розчин*).

До 1 мл випробуваного розчину, попередньо нейтралізованого хлористоводневою кислотою розведеною Р, додають 1,5 мл розчину калій фероціаніду Р, утворюється білий осад, не розчинний у кислоті хлористоводневій розведеній Р.

Методика ідентифікації аспарагінат-іонів у цинк аспарагінаті. 0,3 г порошку розтертих таблеток, попередньо очищених від оболонки, поміщають у мірну колбу місткістю 50 мл, додають 2 мл розчину аміаку розведеного і 5 мл води Р, розчиняють при інтенсивному перемішуванні протягом 10 хв, доводять об'єм розчину водою Р до позначки та фільтрують (*випробуваний розчин*).

Розчин порівняння. 10 мг стандартного зразка кислоти аспарагінової поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, додають 2 мл розчину аміаку розведеного Р1, доводять об'єм розчину водою Р до позначки і перемішують.

На лінію старту хроматографічної пластинки із шаром силікагелю G ("Merck", скляна основа) розміром 15х20 з товщиною шару 0,25 мм наносять в точку 15 мкл (3 мкг аспарагінат-іонів) випробуваного розчину і в окрему точку 5 мкл (1 мкг аспарагінової кислоти) розчину порівняння. Пластинку сушать на повітрі й поміщають у камеру із сумішшю розчинників кислота оцтова льодяна – вода Р – бутанол Р (20:20:60). Коли фронт розчинників пройде 15 см від лінії старту, пластинку виймають з камери, сушать на повітрі й обробляють розчином нінгідрину Р. Пластинку нагрівають при температурі від 100 до 105 ^{o}C протягом 15 хв.

На хроматограмі випробуваного розчину повинна проявитися рожево-фіолетова пляма на одному рівні та однакова за забарвленням з плямою на хроматограмі розчину порівняння кислоти аспарагінової.

Дослідження і розробка методики кількісного визначення цинк аспарагінату. З метою кількісного визначення солей цинку можна застосувати класичний титриметричний метод – комплексонометрію. Для аналізу вмісту сполук цинку в субстанціях рекомендовано саме цей фармакопейний метод аналізу. Експериментально встановлено, що комплексонометричне титрування чистої речовини цинк аспарагінату можливе в умовах, описаних у Державній Фармакопеї України, або в умовах, рекомендованих у ДФ X видання. Точність, правильність і відтворюваність методики комплексонометричного титрування цинк аспарагінату в субстанції відповідають вимогам титриметрії.

При спробі визначення за такими ж методиками цинк аспарагінату в складі таблеток, які містять сухий екстракт ехінацеї і кислоту аскорбінову, ми зіткнулись одразу з багатьма труднощами. Перший фактор – тривале відділення цинк аспарагінату від інших компонентів препарату, оскільки при незначній його кількості, порівняно з кількістю сухого екстракту, аскорбінової кислоти і допоміжних речовин таблеток, розчин є в'язким, погано і довго фільтрується навіть через найпористіші фільтри. Фільтрування під вакуумом ускладнює пробопідготовку і підвищує похибку аналізу, центрифугування теж значно збільшує трудомісткість, тривалість і похибку аналізу. Другий чинник, який був найбільш вагомим, – невелика кількість цинк аспарагінату в складі таблеток. Цей фактор зумовив необхідність застосування розведених розчинів титрантів і титрування з мікробюретки, що, у свою чергу, викликало знову зростання похибки аналізу. Третій фактор, який унеможливив використання класичної комплексонометрії, – забарвлен-

ня отриманого у процесі пробопідготовки досліджуваного розчину препарату (яскравий оранжево-жовтий колір досліджуваного розчину не дав змоги надійно фіксувати кінець титрування з рекомендованими ДФУ індикаторами).

З огляду на отримані результати, було вирішено вивчити можливість атомно-абсорбційного визначення цинк аспарагінату в складі таблеток. При дослідженні поведінки цинк аспарагінату в умовах атомно-абсорбційного визначення встановлено, що з метою одержання надійних і відтворюваних результатів вимірювання оптичної густини необхідно перевести досліджувану сіль з органічним аніоном в неорганічну сіль. Вимірювання оптичних густин модельних розчинів цинк аспарагінату не давали відтворюваних значень. Найбільш ймовірно, що у полум'ї не повністю, а тому не відтворювано відбувалась атомізація, можливо, мало місце утворення важколетких карбідів цинку. Все це приводило до отримання невідтворюваних результатів. Тому було прийнято рішення проводити пробопідготовку шляхом мінералізації. Обрали "мокрий" спосіб мінералізації як простіший і експресніший.

Експериментальним шляхом встановлено, що для швидкої і повної мінералізації оптимальною окиснювальною сумішшю є суміш кислот сульфатної та нітратної у співвідношенні 1:1. Мінералізацію порошку розтертих таблеток, у яких визначали вміст цинк аспарагінату, проводили у колбі К'єльдаля, нагріваючи вказаний порошок із сумішшю кислот на пальнику так, щоб у колбі відбувалось спокійне кипіння суміші. Мінералізацію виконували практично до отримання прозорого розчину і закінчення виділення бурих парів нітроген (IV) оксиду – це займало близько 15-20 хв. Внаслідок окиснення всі органічні речовини були видалені з розчину, а в розчині отримали цинк сульфат. Одержаний розчин кількісно переносили у мірну колбу місткістю 100 мл та доводили об'єм розчину водою дистильованою до позначки і перемішували. Оскільки до складу таблеток входять окремі допоміжні речовини (тальк), які не мінералізуються і не розчиняються у сульфатній та нітратній кислотах, то після отримання розчину мінералізату його фільтрували через беззольний паперовий фільтр "червона стрічка". Безпосередньо перед фотометруванням досліджуваних розчинів їх розбавляли до одержання необхідної оптимальної концентрації.

При розробці методики атомно-абсорбційного визначення цинку необхідно було дослідити лінійність залежності оптичної густини полум'я від концентрації цинку в розчині. Експериментально встановлено, що в межах концентрації цинку в розчині від 0,5 до 5,00 мкг/см^3 ця залежність є лінійною і невипадковою (коефіцієнт кореляції оптичної густини полум'я і концентрації цинку в розчині r=0,99899). Результати визначення оптичної густини полум'я залежно від концентрації цинку та деякі метрологічні характеристики лінійної залежності наведено у таблиці 1.

Таблиця 1 – **Результати вимірювання оптичної густини розчинів при визначенні лінійності**

Концентрація стандартного розчину цинку, мкг/см^3	Оптична густина полум'я	Метрологічні характеристики
0,5	0,0219	Рівняння прямої: y=0,00668+0,03408·x Коефіцієнт кореляції r=0,99899 Точка перетину з віссю ординат a=0,00668 Тангенс кута нахилу b=0,03408 Залишкова сума квадратів відхилень $5,8 \cdot 10^{-5}$
1,00	0,0391	
1,25	0,0511	
2,00	0,0737	
2,50	0,0964	
3,00	0,1083	
3,75	0,1355	
5,00	0,1749	

Дослідження правильності розробленої методики визначення вмісту цинку аспарагінату в таблетках були проведені методом введено-знайдено. Для цього виготовлено експериментальні таблетні сумішки, які містили цинк аспарагінат в кількості від 70 до 130 % від декларованої у таблетці. Точні наважки цих експериментальних сумішей пройшли відповідну пробопідготовку і вимірювання. Результати визначення вмісту цинк аспарагінату в експериментальних сумішах наведено в таблиці 2.

За своєю природою атомно-абсорбційний метод аналізу є високоселективним. Щоб перевірити специфічність (селективність) визначення цинк аспарагінату в комбінації з іншими діючими і допоміжними речовинами, було підготовлено зразок своєрідного плацебо – модельну суміш, яка містила аскорбінову кислоту, сухий екстракт ехінацеї та допоміжні речовини у кількостях, що відповідають їх вмісту в таблетці. Для отримання маси сумішки, однакової із середньою масою таблетки, в плацебо, замість цинк аспарагінату, додавали

Таблиця 2 – **Результати перевірки правильності методики атомно-абсорбційного визначення вмісту цинк аспарагінату в таблетках**

Кількість діючої речовини від декларованої в таблетці, %	Вміст цинк аспарагінату в одній таблетці, г		Частка регенерації (відсоток знайденого), %
	Введено	Знайдено	
70	0,0174	0,0169	97,13
80	0,0203	0,0207	101,97
90	0,0222	0,0219	98,65
100	0,0250	0,0244	97,60
110	0,0271	0,0274	101,11
120	0,0298	0,0295	98,99
130	0,0328	0,0327	99,70

відповідну наважку крохмалю. Після проведення мінералізації та всіх операцій, як і з досліджуваним розчином, експериментально було встановлено, що плацебо не поглинає монохроматичного резонансного випромінювання з довжиною хвилі 213,9 нм (аналітична лінія цинку) – оптична густина полум'я практично дорівнювала нулю, тобто неселективного поглинання не спостерігалося. Всі метрологічні характеристики вивчали за методиками, описаними в першому доповненні до ДФУ [2].

Методика кількісного визначення вмісту цинк аспарагінату в таблетках, які містять значну кількість сухого екстракту ехінацеї і вітаміни. 0,6 г (точна наважка) порошку розтертих таблеток поміщають у колбу К'єльдаля, обережно додають 5 мл кислоти сірчаної Р і по краплях 5 мл кислоти азотної Р. Колбу накривають малою лійкою і ставлять на піщану баню, яку нагрівають на газовому пальнику. Проводять мінералізацію протягом 15-20 хв, слідкуючи за забарвленням отримуваної суміші. Коли розчин стане безбарвним і з'являться важкі білі пари, припиняють мінералізацію і дають охолонути колбі з розчином.

Отриманий розчин кількісно переносять за допомогою води дистильованої у мірну колбу місткістю 100 мл і доводять об'єм розчину водою дистильованою до позначки та перемішують. 5,0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл і доводять об'єм розчину водою дистильованою до позначки та перемішують (*випробуваний розчин*).

Попеременно вимірюють поглинання випробуваного розчину і стандартних розчинів цинку на атомно-абсорбційному спектрометрі при довжині хвилі 213,9 нм (джерело резонансного випромінювання – лампа з цинковим катодом, джерело атомізації – повітряно-ацетиленове полум'я).

За результатами вимірювання стандартних і досліджуваного розчинів розраховують концентрацію цинку (C_x) в досліджуваному розчині у мкг/см^3.

Вміст цинк аспарагінату (X) в грамах, рахуючи на середню масу таблетки, визначають за формулою:

$$X = \frac{C_x \cdot 10^{-2} \cdot b}{5 \cdot 0{,}1976 \cdot m},$$

де C_x – концентрація випробуваного розчину, мкг/см^3;

b – середня маса таблетки, г;

m – маса наважки порошку розтертих таблеток, взятих для аналізу, г;

0,1976 – частка цинку в цинк аспарагінаті.

Результати дослідження таблеток на вміст цинк аспарагінату наведено в таблиці 3.

Таблиця 3 – **Результати атомно-абсорбційного визначення цинк аспарагінату в таблетках**

Маса наважки, г	Оптична густина полум'я	Концентрація цинку в розчині, мкг/см^3	Знайдено цинк аспарагінату в одній таблетці, г	Метрологічні характеристики P=0,95 n=5
0,6035	0,0937	2,554	0,0257	$\overline{X}$ =0,251
0,5983	0,0896	2,433	0,0247	S=6,2·10^{-4}
0,5990	0,0911	2,476	0,0251	t=2,78
0,6005	0,0886	2,403	0,0243	ΔX=8·10^{-4}
0,6012	0,0934	2,544	0,0257	X=0,0251±0,0008
				ε =3,19%

Таким чином, розроблена методика є специфічною для визначення цинк аспарагінату в таблетках, які містять аскорбінову кислоту і сухий екстракт ехінацеї. Вона характеризується коректною точністю і відтворюваністю, лінійною залежністю в аналітичній ділянці ±30 % відносно декларованої кількості визначуваної речовини у препараті.

ВИСНОВКИ. 1. Запропоновано методику ідентифікації цинк аспарагінату в складі багатокомпонентного лікарського засобу: цинк – за реакцією з калій фероціанідом, аспарагінат-іони – методом ТШХ.

2. Розроблено методику кількісного визначення цинк аспарагінату в складі багатокомпонентного лікарського засобу методом атомно-абсорбційної спектроскопії. Методика характеризується специфічністю, коректною точністю і відтворюваністю, лінійністю у межах визначуваного вмісту. Вона може бути використана для достовірної оцінки якості препарату за вмістом цинк аспарагінату.

ЛІТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр. – 1-ше вид. – Харків: РІГЕР, 2001. – 556 с.

2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр. – 1-ше вид. Доповнення 1. – Харків: РІГЕР, 2004. – С. 187-214.

3. Дроговоз С.М., Николенко В.В., Слободянюк Т.А. Фармакологический анализ рынка иммуностимуляторов в Украине // Провізор. – 1999. – № 6.

4. Лазарева Д.И., Алехин В.К. Стимуляторы иммунитета. – М., 1985.

5. Bor N.M. Zinc and copper deficiency in patients with allergic diseases and treatment with zinc sulfate – preliminary report // New Istanbul Contribution to Clinical Science. –1980. – **13**. – P. 58-59.

6. British Pharmacopeia 5 ed. – 2007// www.pharmacopeia.co.uk

7. Cunningham-Rundles S. Physiological and Pharmacological effects of zinc on immune response // Ann. NY Acad. Sci. – 1990. – **587**. – P. 113-122.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИНК АСПАРАГИНАТА В МНОГОКОМПОНЕНТНОМ ЛЕКАРСТВЕННОМ СРЕДСТВЕ

В.Н. Коваль, Л.В. Вронская

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

При подготовке аналитико-нормативной документации на новые лекарственные средства в первую очередь разрабатывают методики идентификации и количественного определения действующих веществ. Нами разработана методика атомно-абсорбционного определения содержания цинк аспарагината в новом лекарственном средстве, которое содержит витамины и сухие растительные экстракты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **цинк аспарагинат, атомно-абсорбционный анализ, тонкослойная хроматография, таблетки.**

TIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF ZINC ASPARTATE IN MULTICOMPONENT DRUG

V.M. Koval, L.V. Vronska

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

At preparation of analytical normative document regarding the new drugs the methods of identification and quantitative determination of active matters are developed in the first instance. We are developing the method of atomic absorption determination of maintenance of zinc aspartate in a new drug which contains vitamins and dry herbal extracts.

KEY WORDS: **zinc aspartate, atomic absorption analysis, thin-layer chromatography, tablets.**

Отримано 11.10.2008 р.

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

УДК 615.916'1:546.815/.819+546.33]-06:612.015.11-092.9

ЗМІНИ АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У ЩУРІВ ЗА УМОВ КОМБІНОВАНОГО ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ ХЛОРИДОМ СВИНЦЮ ТА НІТРИТОМ НАТРІЮ

Я.І. Гонський, М.І. Куліцька
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Комбінована дія хлориду свинцю та нітриту натрію на організм щурів призводить до суттєвого зниження антиоксидантного статусу. Найбільш виражені зміни зафіксовано на 4-ту добу експерименту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **антиоксидантна система, щури, печінка, інтоксикація, нітрит натрію, хлорид свинцю, комбінована дія.**

ВСТУП. Зростання техногенного забруднення довкілля важкими металами, а також азотовмісними речовинами, зумовлено хімізацією промисловості й сільського господарства, інтенсивним розвитком металургійної та автомобільної індустрій, безконтрольним прийманням лікарських засобів, наркоманією, наслідками аварії на Чорнобильській АЕС тощо [8, 19, 22, 24, 25].

Одним із найбільш небезпечних і токсичних серед важких металів є свинець і його сполуки [5, 9, 12, 23, 31], які при надходженні в організм навіть у малих концентраціях здатні накопичуватися в органах і тканинах. Негативний вплив солей свинцю на організм людини і тварин посилюється у комбінації з нітритами і нітратами, які надходять в організм людини в основному з продуктами харчування і питною водою [1, 6, 15, 18, 27, 28, 33].

Головними шляхами надходження даних токсичних речовин в організм є дихальні шляхи і шлунково-кишковий тракт. Це призводить до гострої і хронічної інтоксикації та викликає зростання уражень різних органів і систем, в тому числі печінки.

У літературі є повідомлення про вплив солей важких металів та азотовмісних сполук за роздільного ураження організму [3, 6, 9, 12, 15, 23, 27, 29], проте в реальному житті частіше має місце комбінована дія вказаних токсикантів [2, 4, 5, 10, 13, 14, 18, 20, 26, 30]. Тому всебічне вивчення токсичної дії ксенобіотиків на організм людини є одним із центральних завдань медичної і біологічної науки.

© Я.І. Гонський, М.І. Куліцька, 2009.

Метою роботи було вивчення антиоксидантної системи у щурів за умов експериментально змодельованого комбінованого ураження піддослідних тварин хлоридом свинцю та нітритом натрію.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 60 лабораторних щурах-самцях масою 180-190 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Гостре токсичне ураження моделювали шляхом одноразового внутрішньошлункового введення за допомогою зонда хлориду свинцю в дозі 6,5 мг/кг маси тіла тварини (1/15 LD_{50}) [5] та нітриту натрію в дозі 70 мг/кг маси тіла (1/3 LD_{50}) [4, 27].

Піддослідних тварин було поділено на 2 групи: 1-ша – контрольна (інтактна); 2-га – уражені хлоридом свинцю та нітритом натрію. Для досліджень використовували кров та печінку. Щурів виводили з експерименту шляхом кровопускання за умов тіопенталового наркозу на 1, 4, 7 і 14-ту доби від моменту інтоксикації. Дослідження виконували відповідно до "Науково-практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин та роботи з ними" [11].

Стан антиоксидантної системи (АОС) оцінювали за активністю глутатіонпероксидази (ГП) та глутатіонредуктази (ГР) [16], рівнем церулоплазміну (ЦП) [21], вмістом відновленого глутатіону (Г-SH) [32] та активністю супероксиддисмутази (СОД) [28].

Кількісні показники обробляли статистично з використанням програми "Exel Microsoft" [17]. Достовірність різниці між досліджуваними показниками визначали за t-критерієм Стьюдента [7].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати досліджень представлено в таблиці 1. Як видно з наведених даних, свинець-нітритна інтоксикація організму супроводжується суттєвим зниженням АОС в крові та печінці піддослідних тварин. Так, вміст відновленого глутатіону в крові на 1-шу добу експерименту зменшився з (2,22±0,06) до (1,23±0,03) ммоль/л. Наведені цифрові величини статистично достовірно ($p<0,001$) відрізнялися між собою. При цьому останній показник виявився меншим за попередній на 44,6 %. На 4-ту добу досліду вміст Г-SH у крові становив (1,06±0,03) ммоль/л, що було менше за аналогічну контрольну величину на 52,2 %. На 7-му добу експерименту досліджуваний показник підвищився на 28,3 %. Як видно, останній показник достовірно відрізнявся від контрольного ($p<0,001$). На 14-ту добу досліду вміст Г-SH у крові досягав (1,56±0,06) ммоль/л, тобто був меншим на 29,7 % відносно контролю.

Майже аналогічна динаміка спостерігалася при зміні концентрації ЦП у крові. Так, на 1-шу добу досліду вказаний показник зменшився на 33,4 %. Між наведеними цифровими величинами встановлена також статистично достовірна різниця ($p<0,001$). На 4-ту добу експерименту досліджуваний показник статистично достовірно відрізнявся ($p<0,001$) від такого ж в контрольній групі й був меншим на 38,6 %. На 7-му добу експерименту рівень ЦП мав тенденцію до зростання порівняно з попереднім показником і був меншим на 36,5 % відносно контролю. На 14-ту добу досліду концентрація ЦП у крові виявилася найвищою порівняно з такими показниками 1, 4 та 7-ї діб досліду і меншою на 29,1 % порівняно з такими ж контрольними параметрами. Отримані дані свідчать про те, що вміст Г-SH і ЦП в крові, які характеризують антиоксидантну систему організму, під впливом досліджуваних ксенобіотиків суттєво знижувався, що свідчить про істотне порушення антиоксидантного захисту. Найбільш вираженими зміни досліджуваних біохімічних показників були на 4-ту добу досліду.

Аналогічні зміни спостерігалися і в тканині печінки. Так, вміст Г-SH у печінці здорових тварин становив (3,46±0,09) ммоль/г, а під впливом досліджуваних ксенобіотиків уже на 1-шу добу досліду цей показник зменшився на 30,9 %. Наведені цифрові величини між собою статистично достовірно ($p<0,001$) відрізнялися. Найбільш зниженим, у 2,1 раза, вміст Г-SH у печінці за дії на організм вказаних ксенобіотиків виявився на 4-ту добу досліду. Різниця на 7 і 14-ту доби експерименту склала, відповідно, 42,5 та 32,9 % порівняно з контролем.

Дослідження активності глутатіонпероксидази показало, що уже на 1-шу добу даний показник достовірно ($p<0,001$) зменшився з (23,30±0,24) до (12,11±0,30) ммоль/(хв•кг). Зниження активності ГП на 4-ту добу досліду склало 53,4 %, на 7-му – 27,5 % і на 14-ту – 19,2 % відносно контролю. Активність ГР в неураженій печінці становила (11,26±0,30) ммоль/(хв•кг), а на 1-шу добу експерименту за дії на організм тварин досліджуваних хімічних чинників зменшилася до (7,86±0,21) ммоль/(хв•кг), тобто на 30,2 %. Між наведеними цифровими величинами існувала статистично достовірна різниця ($p<0,001$). Встановлено також, що на 4-ту добу досліду ступінь зниження досліджуваного показника був

Таблиця 1 – **Динаміка показників антиоксидантної системи в крові та печінці тварин за дії на організм хлориду свинцю та нітриту натрію (M±m)**

Показники	дослідний матеріал	Групи спостережень				
		контрольна (інтактна)	уражені $PbCl_2$+$NaNO_2$, доба експерименту			
			1	4	7	14
Г-SH, ммоль/л	Кров	2,22±0,06	1,23±0,03***	1,06±0,03***	1,36±0,04***	1,56±0,06**
Г-SH, ммоль/г	Печінка	3,46±0,09	2,39±0,06***	1,62±0,06***	1,99±0,07***	2,32±0,06***
ЦП, мг/л	Кров	225,4±6,3	150,1±4,2***	138,4±4,0***	143,1±4,2***	159,8±4,8***
ГП, ммоль/(хв·кг)	Печінка	23,30±0,24	12,11±0,30***	10,85±0,30***	16,90±0,48***	18,82±0,54**
ГР, ммоль/(хв·кг)		11,26±0,30	7,86±0,21***	7,24±0,21***	8,49±0,24**	9,42±0,27**
СОД, ум.од./мг		0,620±0,018	0,430±0,012**	0,390±0,011***	0,470±0,012**	0,530±0,015*

Примітка. * – величини, що статистично достовірно відрізняються від контрольних: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$.

найбільш вираженим і складав 35,7 %, а на 7 і 14-ту доби – на 24,6 та 16,3 % відповідно.

Відомо, що СОД першою вступає в процес знешкодження гідроперекисів, які утворюються в результаті надходження в організм ксенобіотиків. Тому в умовах змодельованого експерименту активність СОД зазнавала також виражених змін. Так, на 1-шу добу досліду вказаний вище показник зменшився з (0,620±0,018) до (0,430±0,012) ум.од./мг. Наведені цифрові величини статистично достовірно відрізнялися між собою ($p<0,01$). На 4-ту добу досліду активність СОД знизилася на 37,1 % і складала (0,390±0,011) ум.од./мг, що статистично достовірно ($p<0,001$). На 7-му добу експерименту активність СОД в печінці зменшилася на 24,2 %, а на 14-ту – на 14,5 % порівняно з контрольною групою.

На основі одержаних результатів та даних літератури можна вважати, що виявлені зміни показників АОС у крові й печінці зумовлені зв'язуванням свинцем функціональних груп ферментів. Крім того, хлорид свинцю та нітрит натрію могли викликати зворотне неконкурентне інгібування цих ферментів, про що свідчить тенденція до зростання даних показників в останні дні експерименту.

ВИСНОВКИ. 1. За комбінованої дії на організм щурів хлориду свинцю та нітриту натрію відбувається істотне пригнічення антиоксидантної системи.

2. Найбільш виражені зміни досліджуваних біохімічних показників були на 4-ту добу експерименту.

3. На 14-ту добу досліду відбувається деяке відновлення порушених показників, але рівня норми вони не досягають.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. Всестороннє вивчення стану антиоксидантного статусу за комбінованої дії на організм різних хімічних факторів є перспективним для впровадження в клініку нових методів діагностики тяжкості токсичного ураження печінки, а також сприятиме розробці адекватних методів корекції та профілактики техногенних уражень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ажипа Я.И., Реутов В.П., Каюшин Л.П. Биологические и медико-биологические аспекты проблемы загрязнения окружающей среды нитратами и нитритами // Физиол. человека. – 1990. – **16**, № 3. – С. 131-149.

2. Головко Л.Л., Гонський Я.І., Кліщ І.М. Вплив поєднаного введення нітритів та солей важких металів на стан захисних систем організму в експерименті // Вісник наукових досліджень. – 2004. – № 3. – С. 122-123.

3. Гонский Я.И., Корда М.М., Клищ И.Н. Роль антиоксидантной системы в патогенезе токсического гепатита // Патол. физиол. и эксперим. тер. – 1996. – № 2. – С. 43-45.

4. Гонський Я.І., Борис М.І. Динаміка показників пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантної системи у щурів, уражених натрію нітритом і кадмію хлоридом // Мед. хімія. – 2007. – **9**, № 4. – С. 58-61.

5. Гонський Я.І., Головко Л.Л. Стан захисних систем організму за умов поєднаної дії солей кадмію та свинцю // Мед. хімія. – 2004. – **6**, № 1. – С. 10-13.

6. Горішна О.В. Рівень оксиду азоту в крові дітей, які вживають питну воду з підвищеним вмістом нітратів // Перинатол. та педіатрія. – 2002. – № 1. – С. 50-51.

7. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процесов. – Л.: Медицина, 1978. – 294 с.

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

9. Зербино Д.Д., Соломенчук Т.Н., Поспишиль Ю.А. Свинец – этиологический фактор поражения сосудов: основные доказательства // Архив патологии. – 1997. – № 1. – С. 9-12.

10. Кіцула Л.М. Біологічна дія сумішей нітрату та нітриту натрію зі свинцем на організм білих щурів // Гигиена населенных мест: Сб. научных тр. – К., 2001. – Т. 1, вып. 38. – С. 284-285.

11. Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайфетдінова Г.А. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. – К.: Авіцена, 2002. – 156 с.

12. Корбакова А.И., Соркина Н.С., Молодкина Н.Н. и др. Свинец и его действия на организм (обзор литературы) // Медицина труда и пром. экол. – 2001. – № 5. – С. 29-34.

13. Коршун М.М. Проблема комбінованої дії на організм пріоритетних хімічних забруднювачів ґрунту // Довкілля та здоров'я. – 2002. – № 4 . – С. 50-56.

14. Коршун М.М., Колесова Н.А., Веремій М.І. та ін. Експериментальне вивчення механізмів комбінованої дії малих доз пестицидів, нітратів, солей свинцю та кадмію // Современные проблемы токсикологии. – 2001. – № 3. – С. 46-50.

15. Котюжинська С.Г. Порівняльна характеристика впливу нітриту натрію на систему гемостазу in vivo та in vitro // Вісник наукових досліджень. – 2002. – № 1. – С. 108-109.

16. Круглікова Г.О., Штутман І.М. Глутатіонпероксидазна та глутатіонредуктазна активність печінки щурів після введення селеніту натрію // Укр. біохім. журн. – 1976. – № 2. – С. 227-233.

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

18. Митченков В.Т., Мянник Л.Э., Ней Ю.К., Сергеева Ж.В. Влияние нитратов и нитритов на токсич-

ность и накопление свинца и кадмия в организме крыс // Токсикол. вестн. – 1996. – № 6. – С. 23-26.

19. Нариси вікової токсикології / За ред. І.М. Трахтенберга. – К.: Авіцена, 2005. – 256 с.

20. Острівка О.І., Гонський Я.І. Порушення антиоксидантної, NO-систем, ендогенної інтоксикації за дії нітриту натрію і хлориду кадмію та їх корекція L-аргініном // Мед. хімія. – 2007. – **9**, № 4. – С. 38-41.

21. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – 168 с.

22. Сердюк А.М. Навколишнє середовище і здоров'я населення України // Довкілля і здоров'я. – 1998. – № 4. – С. 2-6.

23. Соломенчук Т.М. Артеріальна гіпертензія і її фактори ризику у працівників, які зазнають впливу промислових сполук свинцю // Укр. кардіол. журн. – 1996. – № 2. – С. 56-58.

24. Трахтенберг И.М. Книга о ядах и отравлениях. Очерки токсикологии. – К.: Наук. думка, 2000. – 366 с.

25. Трахтенберг И.М. Тяжелые металлы как химические загрязнители производственной и окружающей среды // Довкілля та здоров'я. – 1997. – № 2. – С. 48-51.

26. Федоренко В.І. Комбінована дія пестицидів та важких металів // Гигиена населенных мест. – К., 2001. – Т. 1, вып. 38. – С. 286-289.

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

28. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678-681.

29. Шугалей И.В., Целинский И.В., Малинина Т.В. О токсическом действии нитрита натрия // Гигиена и санитария. – 1991. – № 4. – С. 49-53.

30. Янчук В.В., Власик Л.І. Особливості комбінованої дії натрію нітрату та свинцю ацетату на рівні смертельних доз щурів різного віку // Буковинський мед. вісн. – 2002. – **6**, № 1. – С. 173-175.

31. Dasani B.M., Kawanishi H. The gastrointestinal manifestation of gunshot-induced lead poisoning // J. Clin. Gastroenterol. – 1994. – **19**, № 4. – P. 296-299.

32. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // Arch. Bioch. Biophys. – 1959. – **82**. – P. 70-77.

33. Laskin J.D., Heck D.E., Gardner C.R., Laskin D.L. Prooxidant and antioxidant functions of nitric oxide in liver toxicity // Antioxid. Redox. Signal. – 2001. – Apr. 3 (2). – P. 261-271.

ИЗМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ ХЛОРИДОМ СВИНЦА И НИТРИТОМ НАТРИЯ

Я.И. Гонский, М.И. Кулицкая

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

Комбинированное действие хлорида свинца и нитрита натрия на организм крыс приводит к существенному снижению антиоксидантного статуса. Наиболее выраженные изменения зафиксировано на 4-е сутки опыта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **антиоксидантная система, крысы, печень, интоксикация, хлорид свинца, нитрит натрия, комбинированное действие.**

CHANGES OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN RATS AT COMBINED IMPAIRMENT BY LEAD CHLORIDE AND SODIUM NITRITE

Ya.I. Honsky, M.I. Kulitska

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

The combined action of lead chloride and sodium nitrite in the rats organism causes the significant depression of antioxidant status. The most significant changes were revealed on the 4th day of experiment.

KEY WORDS: **antioxidant system, rats, liver, intoxication, sodium nitrite, lead chloride, combined influence.**

Отримано 25.09.2008 р.

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

УДК 615.14.24:615.456:615.38

ТЕХНОЛОГІЧНИЙ І ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ПРИ ВИГОТОВЛЕННІ ІНФУЗІЙНОГО РОЗЧИНУ З МАЛАТАМИ

Т.А. Борисенко, Р.С. Коритнюк, Л.Л. Давтян
НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ ІМЕНІ П.Л. ШУПИКА

У статті наведено методики кількісного визначення катіонів натрію, калію, кальцію і магнію, а також хлорид-іонів та глюкози в інфузійному розчині з малатами.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **комплексонометричне титрування, аргентометрія, йодометрія, полуменева фотометрія, кальцій, магній, глюкоза, калій, натрій, хлорид-іони.**

ВСТУП. Контроль якості лікарських засобів є одним із ключових моментів виробництва. Відповідно до сучасних вимог, контроль якості повинен здійснюватися на всіх технологічних етапах виробництва. Для виконання цих вимог нами були розроблені методи кількісного аналізу для досліджуваного інфузійного розчину з малатами.

Найбільш поширеним методом визначення кількісного вмісту іонів кальцію і магнію є комплексонометричне титрування. Окреме визначення солей кальцію і магнію при їх одночасній присутності у розчині базується на тому, що розчинність сполук солей, що титруються, залежить від величини pH в досліджуваному розчині. Так, аліквотну частину розчину спочатку титрують з індикатором протравним чорним 11 при pH=9 за присутності аміачного буфера, при цьому титруються обидві солі [9]. Індикатор протравний чорний 11 утворює з іонами магнію, кальцію та цинку комплекси червоного чи фіолетового забарвлення. Однак для титрування іонів кальцію він є непридатним, оскільки перехід забарвлення у цьому випадку не чіткий. Навпаки, при титруванні суміші кальцію і магнію отримуємо чітку кінцеву точку титрування. Це пов'язано з тим, що умовна константа стійкості комплексу іонів магнію з натрію едетатом менша, ніж для комплексу з іонами кальцію, тому при титруванні з натрію едетатом першими реагують іони кальцію, в межах стрибка відбувається реакція між іонами магнію та натрію едетату [6]. В іншій аліквотній частині визначають сіль кальцію. В розчин додають декілька мілілітрів концентрованого розчину натрію гідроксиду, внаслідок чого pH розчину зростає до 12. За цих умов солі магнію осаджуються у вигляді гідроксиду магнію, далі титрують сіль кальцію [9]. Як індикатор для визначення іонів кальцію застосовують мурексид, однак ДФУ наводить методику визначення іонів кальцію з індикатором кальконкарбоновою кислотою [3]. Європейська фармакопея V вид. та Британська фармакопея 2000 року зазначають, що кальконкарбонова кислота є індикатором, який дозволяє визначити кальцій за присутності магнію та інших металів [11].

Для визначення кількісного вмісту глюкози у розчинах існує декілька методів. У зв'язку з наявністю в розчині малат-іонів, які є оптично активними, рефрактометричний метод кількісного визначення глюкози є непридатним. Тому ми використовували йодометричний метод, в основі якого лежить окиснення глюкози до глюконової кислоти. Визначення кількісного вмісту глюкози в препараті проводили методом зворотної йодометрії, оскільки глюкоза повільно реагує з дийодом, а для стехіометричного необоротного окиснення глюкози необхідне лужне середовище [1, 10]. В лужному середовищі проходить реакція дисмутації йоду, в результаті якої утворюється гіпойодид, який і окиснює глюкозу.

Для кількісного визначення галогенідів в аналітичній практиці найбільш широко використовують аргентометрію (метод Мора, Фаянса-Ходакова), тіоціанатометрію (метод Фольгарда). Метод Мора найбільш простий у виконанні, але однією з умов його проведення є наявність у розчині нейтрального або слаболужного середовища (pH=6,3-10,5). В кислому середовищі розчиняється аргентуму хромат [1, 7, 10]. До того ж, у нейтральному середовищі можливе утворення малорозчин-

© Т.А. Борисенко, Р.С. Коритнюк, Л.Л. Давтян, 2009.

них сполук срібла з малат-іонами. Перевагою методу Фольгарда є титрування у кислому середовищі. Ми використовували непрямий метод Фольгарда. Він полягає в тому, що досліджуваний розчин підкислюють нітратною кислотою, додають індикатор (феруму (III) амонію сульфат) та невелику кількість (0,1 мл) 0,1 М розчину тіоціанату амонію, а потім титрують розчином срібла нітрату до зникнення буро-оранжевого забарвлення комплексу $[Fe(NCS)_3]$. При розрахунках необхідно враховувати об'єм розчину срібла нітрату, використаний на взаємодію з феруму тіоціанатом [1, 5, 10].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом нашого дослідження був інфузійний розчин, що містив катіони натрію, калію, кальцію, магнію, хлорид, ацетат та малат-іони, а також глюкозу. Кількісне визначення компонентів розчину проводили за загальноприйнятими методиками, описаними в ДФУ та ДФ XI, з деякою модифікацією для досліджуваного розчину. Вміст катіонів кальцію та магнію, хлорид-іонів та глюкози визначали за допомогою титриметричних методів аналізу. Для кількісного визначення катіонів натрію та калію використовували полуменевофотометричний метод і прилад ПАЖ-3. Статистичну обробку результатів проводили відповідно до вимог ДФУ [4].

Методика кількісного визначення іонів кальцію в інфузійному розчині.

50 мл розчину поміщали у конічну колбу на 500 мл, доводили об'єм розчину водою Р до 300 мл, додавали 6 мл розчину натрію гідроксиду концентрованого Р, близько 15 мг індикаторної суміші кальконкарбонової кислоти Р і титрували 0,05 М розчином натрію едетату до переходу фіолетового забарвлення у синє.

1 мл 0,05 М розчину натрію едетату відповідає 0,002004 г іонів кальцію, якого в препараті повинно бути 0,093-0,107 мг.

Вміст іонів кальцію (мг) на 1 мл досліджуваного розчину розраховували за формулою:

$$X = \frac{V \times КП \times T \times 1}{V_{д/а}} \times 1000,$$

де X – вміст катіонів натрію в 1 мл розчину, мг;

V – об'єм натрію едетату, використаний на титрування, мл;

КП – коефіцієнт поправки до полярності розчину натрію едетату;

Т – титр іонів кальцію до 0,05 М розчину натрію едетату;

1 – коефіцієнт для переходу до 1 мл розчину;

$V_{д/а}$ – об'єм розчину, взятий для аналізу, мл;

1000 – коефіцієнт переходу від вмісту в грамах до міліграмів.

Методика кількісного визначення іонів магнію в інфузійному розчині.

Вміст іонів магнію визначали за різницею об'єму натрію едетату, використаного на титрування сумарного вмісту катіонів кальцію і магнію у розчині, та об'єму натрію едетату, використаного на титрування іонів кальцію. Сумарний вміст кальцію і магнію визначали за такою методикою [2, 8, 9].

50 мл досліджуваного розчину поміщали у конічну колбу на 250 мл, додавали 10 мл буферного розчину аміаку з pH 9,5=10,0 та 0,1 г індикаторної суміші протравного чорного 11 і титрували 0,05 М розчином натрію едетату до переходу червоно-фіолетового забарвлення в синє.

1 мл 0,05 М розчину натрію едетату відповідає 0,001215 г іонів магнію, якого в препараті повинно бути 0,059-0,063 мг.

Вміст іонів магнію (мг) на 1 мл досліджуваного розчину розраховували за формулою:

$$X = \frac{(V_1 - V) \times КП \times T \times 1}{V_{д/а}} \times 1000,$$

де X – вміст катіонів магнію в 1 мл розчину, мг;

V_1 – об'єм натрію едетату, використаний на титрування суми кальцію і магнію, мл;

V – об'єм натрію едетату, використаний на титрування кальцію, мл;

КП – коефіцієнт поправки до полярності розчину натрію едетату;

Т – титр іонів магнію до 0,05 М розчину натрію едетату;

1 – коефіцієнт для переходу до 1 мл розчину;

$V_{д/а}$ – об'єм розчину, взятий для аналізу, мл;

1000 – коефіцієнт переходу від вмісту в грамах до міліграмів.

Методика кількісного визначення глюкози в інфузійному розчині.

1 мл препарату поміщали у конічну колбу з притертою пробкою на 250 мл, додавали 20 мл води Р, 10 мл 0,05 М розчину йоду і 15 мл 0,1 М натрію гідроксиду. Колбу закривали і поміщали на 10-15 хв у темне місце, потім додавали 5 мл кислоти сірчаної розведеної і йод, що виділився, титрували 0,1 М розчином натрію тіосульфату.

Паралельно проводили контрольний дослід.

1 мл 0,05 М розчину йоду відповідає 0,009008 г глюкози безводної, якої в препараті повинно бути 0,0485-0,0505 г.

Вміст глюкози в 1 мл препарату розраховували за формулою:

$$X = \frac{(V_к - V) \times КП \times T \times 1}{V_{д/а}},$$

де *X* – вміст глюкози безводної в 1 мл розчину, г;

$V_к$ – об'єм 0,1 М розчину натрію тіосульфату, використаний на титрування у контрольному досліді, мл;

V – об'єм 0,1 М розчину натрію тіосульфату, використаний на титрування в основному досліді, мл;

КП – коефіцієнт поправки до полярності 0,1 М розчину натрію тіосульфату;

T – титр глюкози до 0,05 М розчину йоду;

1 – коефіцієнт для переходу до 1 мл розчину;

$V_{д/а}$ – об'єм розчину, взятий для аналізу, мл.

Методика кількісного визначення хлорид-іонів в інфузійному розчині.

5 мл препарату поміщали у конічну колбу на 50 мл, підкислювали 5 мл розчину азотної кислоти розведеної, додавали 0,1 мл індикатора феруму (III) амонію сульфату та 0,1 мл 0,1 М розчину тіоціанату амонію. Виникало буро-оранжеве забарвлення внаслідок утворення феруму (III) тіоціанату. Титрували 0,1 М розчином срібла нітрату до знебарвлення розчину. При розрахунках від об'єму срібла нітрату, використаного на титрування, віднімали об'єм, використаний на взаємодію з феруму (III) тіоціанатом (0,1 мл).

1 мл 0,1 М розчину срібла нітрату відповідає 0,003545 г хлорид-іонів, яких в розчині повинно бути 3,439-3,651 мг.

Вміст хлорид-іонів в 1 мл препарату розраховували за формулою:

$$X = \frac{(V - 0{,}1) \times КП \times T \times 1}{V_{д/а}} \times 1000,$$

де *X* – вміст хлорид-іонів в 1 мл розчину, мг;

V – об'єм 0,1 М розчину срібла нітрату, мл;

0,1 – об'єм 0,1 М розчину срібла нітрату, використаний на взаємодію з феруму (III) тіоціанатом, мл;

КП – коефіцієнт поправки до полярності 0,1 М розчину срібла нітрату;

T – титр хлорид-іонів до 0,1 М розчину срібла нітрату;

1 – коефіцієнт для переходу до 1 мл розчину;

$V_{д/а}$ – об'єм розчину, взятий для аналізу, мл;

1000 – коефіцієнт переходу від грамів до міліграмів.

Визначення концентрації катіонів натрію в інфузійному розчині.

1 мл препарату поміщали у колбу на 100 мл і доводили водою Р до мітки, 10 мл одержаного розчину поміщали у колбу на 100 мл і доводили водою Р до мітки (досліджуваний розчин).

Проводили калібрування приладу за допомогою розчину робочого стандартного зразка, починаючи з розчину з більшою концентрацією досліджуваного іона.

По черзі вимірювали емісію досліджуваного розчину та розчину $РСЗ_{Na3}$, проводячи не менше п'яти паралельних вимірювань для кожного розчину.

Вміст іонів натрію (мг) в 1 мл досліджуваного розчину розраховували за формулою:

$$X_{мг/мл} = \frac{C(X) \times 2{,}299\, мг/мл}{C(РСЗ_{Na3})},$$

де $X_{мг/мл}$ – вміст іонів натрію в досліджуваному розчині, мг/мл;

C(X) – показання приладу для досліджуваного розчину, мг/л;

$C(РСЗ_{Na3})$ – показання приладу для розчину $РСЗ_{Na3}$, мг/л;

2,299 мг/мл – номінальний вміст іонів натрію в препараті, вказаний у розділі "Іонний склад".

Вміст іонів калію у препараті повинен становити 2,230-2,368 мг/мл.

Приготування розчину робочого стандартного зразка для визначення іонів натрію. 0,1271 г натрію хлориду Р, висушеного до постійної маси при температурі 130 °С, розчиняли у невеликій кількості води Р і доводили об'єм розчину водою Р до 250 мл. Розчин містив 200 мкг іонів натрію в 1 мл (розчин А). 2,0 мл; 4,0 мл; 5,75 мл; 7,5 мл; 9,5 мл розчину А поміщали у мірні колби на 500 мл і доводили водою Р до мітки. Отримували розчини $РСЗ_{Na1}$, $РСЗ_{Na2}$, $РСЗ_{Na3}$, $РСЗ_{Na4}$, $РСЗ_{Na5}$, які містили, відповідно, 0,8 мг/л, 1,6 мг/л, 2,3 мг/л, 3,0 мг/л та 3,8 мг/л іонів натрію.

Визначення концентрації катіонів калію в інфузійному розчині.

1 мл препарату поміщали у мірну колбу на 100 мл, доводили водою Р до мітки. 10 мл одержаного розчину поміщали у мірну колбу на 100 мл і доводили водою до мітки (досліджуваний розчин).

Проводили калібрування приладу за допомогою розчину робочого стандартного зразка, починаючи з розчину з більшою концентрацією досліджуваного іона.

По черзі вимірювали емісію досліджуваного розчину та розчину $РСЗ_{К3}$, проводячи не менше п'яти паралельних вимірювань для кожного розчину.

Вміст іонів калію (мг) в 1 мл досліджуваного розчину розраховували за формулою:

$$X_{мг/мл} = \frac{C(X) \times 0{,}782 мг/мл}{C(РСЗ_{К3})},$$

де $X_{мг/мл}$ – вміст іонів калію в досліджуваному розчині, мг/мл;

C(X) – показання приладу для досліджуваного розчину, мг/л;

$C(РСЗ_{К3})$ – показання приладу для розчину $РСЗ_{К3}$, мг/л.

0,782 мг/мл – номінальний вміст іонів натрію в препараті, вказаний у розділі "Іонний склад".

Вміст іонів калію у препараті повинен становити 0,759-0,805 мг/мл.

Приготування розчину робочого стандартного зразка для визначення іонів калію. 0,2288 г калію хлориду Р, висушеного до постійної маси при 130 °С, розчиняли у невеликій кількості води Р і доводили об'єм розчину до 200,0 мл. Розчин містив 600 мкг іонів калію в 1 мл (розчин А). 0,25 мл; 0,5 мл; 0,65 мл; 0,8 мл; 1,0 мл розчину А поміщали у мірні колби на 500 мл і доводили водою Р до мітки. Отримували розчини $РСЗ_{К1}$, $РСЗ_{К2}$, $РСЗ_{К3}$, $РСЗ_{К4}$, $РСЗ_{К5}$, які містили 0,3 мг/л, 0,6 мг/л, 0,78 мг/л, 0,96 мг/л та 1,2 мг/л іонів калію відповідно.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Використані нами методики кількісного аналізу дозволяють визначити кількість компонентів розчину. Визначений вміст іонів перебуває в допустимих межах, відносна похибка визначення не перевищує 2 % (табл. 1).

Розраховані метрологічні характеристики використаних методик кількісного визначення компонентів розчину показали, що похибка одиничного визначення не перевищує 5 % (табл. 2).

Таблиця 1 – **Результати визначення кількісного вмісту складових розчину**

Іон	Вміст за прописом, мг/мл	Допустиме відхилення, мг/мл	Визначений вміст, мг/мл	Відносна похибка визначення, %
Натрій	2,299	2,230 – 2,368	2,267	1,39
Калій	0,782	0,759 – 0,805	0,7799	0,27
Магній	0,061	0,059 – 0,063	0,0606	0,66
Кальцій	0,100	0,093 – 0,107	0,101	1,00
Хлорид	3,545	3,439 – 3,651	3,542	0,08
Глюкоза, г/мл	0,05	0,0485 – 0,0515	0,04994	0,12

Таблиця 2 – **Метрологічні характеристики методик кількісного визначення компонентів розчину**

Іон	μ	ν	$\overline{X}$	s	P	t(P,ν)	Δ_x	ε, %
Натрій	2,299	4	2,267	0,023903	95%	2,7764	0,066364	2,93
Калій	0,782	4	0,7799	0,008429	95%	2,7764	0,023405	3,00
Магній	0,061	4	0,0607	0,000698	95%	2,7764	0,00194	3,19
Кальцій	0,100	4	0,10124	0,001043	95%	2,7764	0,002896	2,86
Хлорид	3,545	4	3,542	0,031937	95%	2,7764	0,088671	2,50
Глюкоза, г/мл	0,05	4	0,04994	0,000757	95%	2,7764	0,002102	4,21

Примітка. m – справжнє значення вимірюваної величини;
ν – число ступенів свободи, перемінний обсяг вибірки при послідовному аналізі;
$\overline{X}$ – середнє значення вибірки;
s – стандартне відхилення;
P – довірча ймовірність;
t(P,ν) – критерій Стьюдента;
Δ_x – півширина довірчого інтервалу одиничного визначення;
ε – відносна невизначеність результату окремого визначення.

ВИСНОВКИ. Розроблено методики кількісного визначення катіонів натрію, калію, кальцію та магнію, хлорид-іонів і глюкози, які наведені в ДФУ і довідковій літературі. Запропоновані методики аналізу дозволяють визначити кількісний вміст компонентів розчину з відносною похибкою кількісного визначення та похибкою одиничного вимірювання, які не перевищують 2 і 5 % відповідно.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аналітична хімія: Навчальний посібник / В.В. Болотов, О.М. Свєчнікова, С.В. Колісник та ін. – Х.: Вид-во НФаУ; Оригінал, 2004. – 480 с.

2. Государственная Фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.

3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-ше вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.

4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". – 1-ше вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.

5. Методы анализа лекарств / Максютина Н.П., Каган Ф.Е., Кириченко Л.А., Митченко Ф.А. – К.: Здоров'я, 1984. – 224 с.

6. Основы аналитической химии: В 2 кн. Кн. 2. Методы химического анализа: Учебник для вузов / Ю.А. Золотов, Е.Н. Дорохова, В.И. Фадеева и др; Под ред. Ю.А. Золотова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 2000. – 494 с.

7. Руководство к лабораторным занятиям по фармацевтической химии / Под ред. П.Л. Семенова. – М.: Медицина, 1978. – 360 с.

8. Справочник провизора-аналитика / Под ред. Д.С. Волоха, Н.П. Максютиной. – К.: Здоров'я, 1989. – 200 с.

9. Фармацевтический анализ лекарственных средств / В.А. Шаповалова, В.А. Заболотный, И.Т. Депешко и др.; Под ред. В.А. Шаповаловой. – Харьков: ИМП "Рубикон", 1995. – 400 с.

10. Фармацевтичний аналіз: Навчальний посібник / П.О. Безуглий, В.О. Грудько, С.Г. Леонова та ін.; За ред. П.О. Безуглого. – Х.: Вид-во НФАУ; Золоті сторінки, 2001. – 240 с.

11. British Pharmacopoeia. – 2000.

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ИНФУЗИОННОГО РАСТВОРА С МАЛАТАМИ

Т.А. Борисенко, Р.С. Корытнюк, Л.Л. Давтян
НАЦИОНАЛЬНАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ ИМЕНИ П.Л. ШУПИКА

Резюме

В статье приведены методики количественного определения катионов натрия, калия, кальция и магния, а также хлорид-ионов и глюкозы в инфузионном растворе с малатами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА*:* **комплексонометрическое титрование, аргентометрия, йодометрия, пламенная фотометрия, кальций, магний, глюкоза, калий, натрий, хлорид-ионы.**

TECHNOLOGICAL AND PHYSICOCHEMICAL CONTROL IN MANUFACTURING INFUSION SOLUTION WITH MALATES

T.A. Borysenko, R.S. Korytnyuk, L.L. Davtyan
NATIONAL MEDICAL ACADEMY OF POST-GRADUATE EDUCATION BY P.L. SHUPIK

Summary

Methods of quantitative determination of sodium, potassium, calcium, magnesium cations, as well as chloride-ions and glucose in the infusion solution with malate-ions are shown at this article.

KEY WORDS*:* **titration, argentometry, iodometry, flaming photometry, calcium, magnesium, glucose, potassium, sodium, chloride-ions.**

Отримано 30.01.2009 р.

Адреса для листування: *Т.А. Борисенко, вул. Дорогожицька, 9, Київ, 04112, Україна.*

УДК 546.48+615.099

ВПЛИВ БАД "ВИСОКОЯКІСНИЙ КОМПЛЕКС КАЛЬЦІЮ" НА АНТИОКСИДАНТНИЙ ЗАХИСТ І ПОКАЗНИКИ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ КАДМІЄВОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ

Г.М. Ерстенюк, Р.М. Назарук, О.М. Рожко
ІВАНО-ФРАНКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

У статті наведено результати дослідження впливу БАД на стан антиоксидантного захисту та показники периферійної крові за умов кадмієвої інтоксикації. Дослідження проведено на білих безпородних щурах-самцях масою 140-180 г. За інтоксикації кадмієм знижуються активність церулоплазміну та насиченість трансферину залізом, зменшуються кількість еритроцитів та концентрація гемоглобіну, порушується стійкість еритроцитарних мембран. Застосування БАД стабілізує досліджувані показники на 21-28 доби.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **кадмієва інтоксикація, біологічно активна добавка, церулоплазмін, трансферин, резистентність еритроцитів.**

ВСТУП. Антропогенне забруднення довкілля, особливо важкими металами, викликає стурбованість через негативні наслідки для здоров'я людей [4, 6, 7]. Надходження важких металів в організм здійснюється комплексно з водою, повітрям, продуктами харчування, і таким чином формується їх сумарна добова доза. Відомо, що до 70 % важких металів в організм людини потрапляє з продуктами харчування [10]. До одних з найбільш небезпечних, в токсикологічному розумінні, ксенобіотиків відносять кадмій [9]. Його вплив визначається високою токсичністю, здатністю проникати в організм та накопичуватися в ньому, зокрема в еритроцитах, печінці, кістках, проявляючи політропну дію. Іони кадмію мають антагоністичну дію стосовно ряду есенційних елементів, зокрема кальцію, цинку заліза, міді, селену, і змінюють їх метаболізм, що супроводжується зміною активності металоферментів та розвитком оксидативного стресу. З огляду на вищевикладене, викликає інтерес дослідження впливу БАД на регуляцію прота антиоксидантного гомеостазу і показники периферійної крові за умов експериментальної кадмієвої інтоксикації.

Метою роботи було вивчення впливу БАД на активність церулоплазміну, насиченість трансферину залізом, стан еритроцитарних мембран, число еритроцитів та концентрацію гемоглобіну за умов експериментальної кадмієвої інтоксикації.

© Г.М. Ерстенюк, Р.М. Назарук, О.М. Рожко, 2009.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на 77 нелінійних білих щурах-самцях масою 140-180 г, яких утримували в стандартних умовах віварію. Тварин було поділено на три групи: 1-ша – інтактні; 2-га – тварини, яким вводили хлорид кадмію ($CdCl_2$) у дозі 1,2 мг/кг маси тіла протягом 10 днів; 3-тя – тварини, в раціон яких після завершення введення токсину включали БАД. Активність церулоплазміну, насиченість трансферину плазми крові залізом визначали за методом Г.О. Бабенко [1], кислотну резистентність еритроцитів – за методом Гітельзона-Терскова [8], концентрацію загального гемоглобіну в крові – гемоглобінціанідним методом, кількість еритроцитів підраховували у камері Горяєва. Матеріал для дослідження забирали під легким ефірним наркозом на 1, 7, 14, 21 та 28 доби після завершення введення $CdCl_2$ та у відповідні періоди на фоні корекції. Результати обробляли статистично за загальноприйнятими методиками з використанням коефіцієнта Стьюдента [3].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Одержані нами дані вказують на суттєві зміни в системі "церулоплазмін – трансферин". Зокрема, активність церулоплазміну достовірно знижувалась протягом всього досліджуваного періоду і на завершення експерименту була на 27,58 % меншою за показники інтактних тварин (рис. 1). Однією з причин такого зниження може бути пряма руйнівна дія кадмію як антагоніста міді [2], що витісняє мідь з активного центру церулоплазміну, а також порушен-

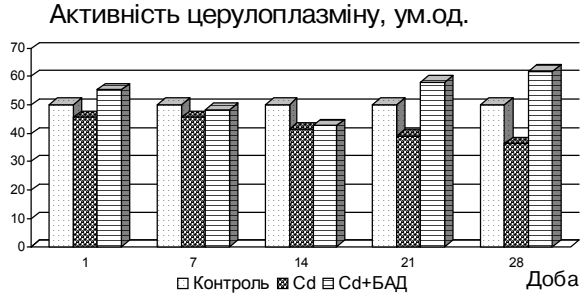


Рис. 1. Динаміка змін активності церулоплазміну в процесі кадмієвої інтоксикації та при корекції.

ня білоксинтезувальної функції печінки. Підтвердженням цього є літературні дані, а також власні гістологічні дослідження печінки після введення хлориду кадмію [5].

Функціонально церулоплазмін тісно пов'язаний з іншим глікопротеїном плазми крові – трансферином. Зв'язуючи іони заліза, трансферин захищає клітини від токсичної дії активних форм кисню, таких, як: пероксиди, супероксидні й гідроксильні радикали. З тривалістю інтоксикації кадмієм спостерігалось зменшення насиченості трансферину залізом порівняно з інтактними тваринами (рис. 2).

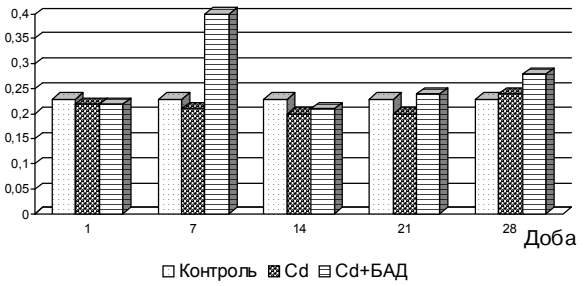


Рис. 2. Насиченість трансферину залізом за умов кадміозу та при корекції.

Зниження цього показника свідчить про порушення зв'язування іонів Fe^{2+}, які здатні індукувати вільнорадикальні процеси в організмі та мають важливе значення для функціонування еритроцитів.

Проведене нами дослідження кислотної резистентності еритроцитів за умов кадмієвої інтоксикації показало суттєвий перерозподіл у популяції циркулюючих еритроцитів, що проявлялось зростанням числа еритроцитів підвищеної стійкості на 35,75 % (рис. 3) і високостійких – на 157,5 %, зниженням низькостійких еритроцитів майже на 47,44 %, а середньостійких – на 20,47 % у пізній період експерименту.

Результати дослідження показників периферійної крові за умов кадмієвої інтоксикації

Рис. 3. Параметри еритрограми в динаміці тривалої інтоксикації кадмієм та корекції.

засвідчили істотне зменшення кількості еритроцитів (рис. 4) та концентрації загального гемоглобіну (рис. 5). Найнижчі рівні зафіксовано на 7-14 доби після завершення введення токсиканта.

Рис. 4. Кількість еритроцитів у периферійній крові щурів за умов кадмієвої інтоксикації та при введенні БАД.

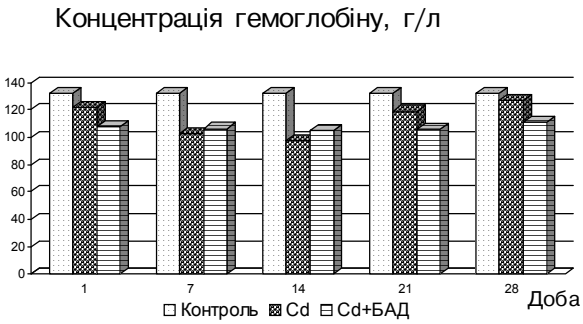


Рис. 5. Вплив БАД на концентрацію гемоглобіну в тварин за умов кадмієвої інтоксикації.

Застосування БАД дозволило встановити підвищення антиоксидантної активності плазми крові, що проявлялось достовірним ($p<0,001$) зростанням активності церулоплазміну, за винятком 14-ї доби експерименту, коли зміни були неістотними. Зростання ферооксидазної активності церулоплазміну приводило до високого ступеня насиченості трансферину плазми крові, що зменшувало загрозу розвитку оксидативного стресу. Дослідження засвідчили вірогідне ($p<0,001$) підвищення даного показника на 7, 21 і 28 доби корекції кадмієвої інтоксикації.

При введенні БАД значно підвищувалась кислотна резистентність еритроцитів, концентрація гемоглобіну в крові лікованих тварин зазнавала значно менших змін. Поряд із цим, слід відмітити різке зростання числа еритроцитів у групі лікованих щурів відносно як інтактних, так і тварин, які не отримували БАД. Такий масивний викид еритроцитів на 1-14 доби експерименту, очевидно, можна розглядати як компенсаторну реакцію кісткового мозку на введення БАД, а також зменшення інтенсивності гемолізу еритроцитів.

ВИСНОВКИ. 1. За умов експериментальної кадмієвої інтоксикації спостерігається порушення антиоксидантного захисту, що супроводжується зниженням активності церулоплазміну і насиченості трансферину залізом.

2. При моделюванні кадмієвої інтоксикації відмічається порушення процесів еритропоезу, що проявляється зменшенням кількості еритроцитів та концентрації гемоглобіну.

3. Введення в дієту досліджуваних препаратів призводить до стабілізації антиоксидантного захисту організму тварин, стійкості мембран еритроцитів та показників периферійної крові на 21-28 доби експерименту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабенко Г.О. Визначення мікроелементів і металоферментів у клінічних лабораторіях. – К.: Здоров'я, 1968. – 147 с.

2. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии. – К.: Чернобыльинформ, 1997. – 202 с.

3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

4. Горобец П.Ю., Ильченко И.Н., Ляпунов С.М., Шугаева Е.Н. Распространенность экологически зависимых нарушений нервно-психического развития у детей в возрасте 4-7 лет при хроническом воздействии тяжелых металлов в малых дозах // Профилактика заболеваний и укрепление здоровья. – 2005. – № 1. – С. 14-20.

5. Дєльцова О.І., Ерстенюк Г.М., Назарук Р.М., Грищук М.І. Гістоструктурні зміни деяких внутрішніх органів за умов кадмієвої інтоксикації // Галицький лікарський вісник. – 2002. – **8**, № 2. – С. 31-33.

6. Забродский П.Ф. Механизмы токсического действия металлов и их влияние на иммунную систему // Токсикол. вестник. – 1998. – № 6. – С. 9-15.

7. Мищенко В.П., Тимофеева С.В., Паненко В.А., Шерер В.В. Экологически индуцированная плацентарная недостаточность // Междунар. мед. журн. – 1999. – № 3. – С. 112-114.

8. Сибірна Н.О., Великий М.М. Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові: Методичний посібник. – Львів, 1997. – С. 38-42.

9. Трахтенберг И.М., Тычинин В.А., Талакин Ю.Н. и др. К проблеме носительства тяжелых металлов // Журн. АМН України. – 1999. – **5**, № 1. – С. 87-95.

10. Grawford A.W., Bruin H.J. Concentration in surface Ca, P, F, Zn, Fe and Sr during white spotformation // J. dent. Res. – 1983. – **62**. – P. 964-968.

ВЛИЯНИЕ БАД "ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННЫЙ КОМПЛЕКС КАЛЬЦИЯ" НА АНТИОКСИДАНТНУЮ ЗАЩИТУ И ПОКАЗАТЕЛИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ УСЛОВИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КАДМИЕВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

А.М. Эрстенюк, Р.М. Назарук, О.М. Рожко

ИВАНО-ФРАНКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

В статье представлены результаты исследования влияния БАД на состояние антиоксидантной защиты и показатели периферической крови при условии кадмиевой интоксикации. Исследования проведены на белых беспородных крысах-самцах массой 140-180 г. При интоксикации кадмием снижаются активность церулоплазмина и насыщенность трансферрина железом, уменьшаются количество эритроцитов и концентрация гемоглобина, нарушается стойкость эритроцитарных мембран. Применение БАД стабилизирует исследуемые показатели на 21-28 сутки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **кадмиевая интоксикация, биологически активная добавка, церулоплазмин, трансферрин, резистентность эритроцитов.**

INFLUENCE OF BIOLOGICALLY ACTIVE ADDITION "HIGH GRADE CALCIUM COMPLEX" ON ANTIOXIDANT DEFENCE AND INDICES OF PERIPHERAL BLOOD IN CASE OF EXPERIMENTAL CADMIC INTOXICATION

H.M. Ersteniuk, R.M. Nazaruk, O.M. Rozhko
IVANO-FRANKIVSK STATE MEDICAL UNIVERSITY

Summary

The aim of the work was to investigate the influence of biologically active addition "High Grade Calcium Complex" on indices of antioxidant defence and erythrocyte resistance in case of cadmic intoxication. The research was carried out on 77 white underbred male-rats with body mass 140-180 gr. In case of cadmic intoxication ceruloplazmin activity and transferrin saturation with iron as well as the quantity of erythrocytes and the concentration of hemoglobin were decreasing; etythrocyte membrane strength lesion took place. The application of biologically active addition stabilizes the indices under research on the 21-28th days of experiment.

KEY WORDS: **cadmic intoxication, biologically active addition, ceruloplazmin, transferrin, erythrocyte resistance.**

Отримано 27.10.2008 р.

Адреса для листування: *Г.М. Ерстенюк, Івано-Франківський державний медичний університет, вул. Галицька, 2, Івано-Франківськ, 76000, Україна.*

УДК 577.112.82

МЕТОД ОТРИМАННЯ ТА ВИДІЛЕННЯ 36 КДА ФРАГМЕНТА СТРЕПТОКІНАЗИ

С.П. Гаврилюк[1], О.М. Савчук[2], Л.І. Остапченко[1]
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА[1]
ШИЖИР ІНТЕРНЕШНЛ ХХК[2]., МОНГОЛІЯ, УЛААНБААТАР

В останні роки встановлено, що при ферментативному гідролізі деякі пептиди зберігають активність нативних білків. Нами було показано принципову можливість отримання високочистого, за даними електрофорезу, та функціонально активного 36 кДа фрагмента стрептокінази, що відкриває нові підходи як до створення тромболітичних агентів нового покоління, так і до дослідження білок-білкових взаємодій в системі гемостазу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **стрептокіназа, 36 кДа фрагмент стрептокінази, α-хімотриптичний гідроліз, електрофорез, хроматографія.**

ВСТУП. Стрептокіназа (Ск), екзогенний бактерійний білок, є антигеном для організму людини, який стимулює утворення значної кількості антитіл при внутрішньосудинному введенні. Тромболітична терапія Ск, при наявності в організмі людини антистрептокіназних антитіл, як "повторна імунізація" викликає масивні алергічні реакції, навіть анафілактичний шок [2]. Зважаючи на це, створення лікарського препарату на основі функціонально активного фрагмента стрептокінази (ФСк) може вирішити дану проблему, а використання ФСк як тонкого біохімічного реагенту дозволить більш повно розкрити механізми функціонування системи фібринолізу.

Раніше було показано, що при гідролізі Ск утворюється 36 кДа фрагмент (36-ФСк), який проявив деяку стрептокіназну активність. Але однозначних результатів не одержано [1]. З огляду на вищесказане, ми поставили за мету отримати високомолекулярний 36-ФСк для визначення його біологічної активності й імуногенності в організмі тварин.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Ск отримували з комерційного препарату хроматографією на Blue-sepharose [6] в 0,05 М тріс-HCl буфері, pH 7,4. 36-ФСк одержували протеолізом з панкреатичним бичачим α-хімотрипсином у ТБС, pH 7,4, при 10-36 °С за різного співвідношення фермент:субстрат протягом 3-20 хв. Об'єм інкубаційного середовища складав 1,5 мл. Реакцію зупиняли шляхом додавання PMSF до кінцевої концентрації 3 мМ. Активність Ск визначали за її здатністю активувати плазміноген за допомогою хромогенного субстрату S_{2251} [4, 7]. Чистоту Ск, ФСк контролювали методом електрофорезу [9] з наступним аналізом електрофореграми за допомогою Total Lab Software.

ФСк виділяли хроматографічними методами (Superose 12B 10/300; Mono Q 5/10 і DEAE-sepharose 10/16 в 0,02 М Na_2HPO_4-цитратному буфері, pH 8,0, елюція градієном pH або NaCl). Отримані фракції концентрували системою тангенсального фільтрування MidJet, картридж 30 см з розміром пор 1 кДа.

Кількість білка визначали спектрофотометрично [3].

Використано обладнання, а також програмне забезпечення і хроматографічні сорбенти від GE Healthcare AB (Швеція). Всі реагенти одержано від Sigma (Німеччина).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Комерційні препарати Ск містять сироватковий альбумін людини, який стабілізує препарат, а також візуалізує його після ліофілізації. Ск відділяли від альбуміну методом афінної хроматографії у 0,05 М тріс-HCl буфері, pH 7,4. Отримані результати очистки на колонці Blue Sepharose HP, результати електрофоретичного аналізу та аналізу біологічної активності однозначно свідчать про те, що з комерційного препарату нами виділена нативна Ск, яка є електрофоретично гомогенною та не містить домішок інших білків.

© С.П. Гаврилюк, О.М. Савчук, Л.І. Остапченко, 2009.

Для гідролізу Ск використовували різні ферменти: пепсин, трипсин, папаїн, плазмін та ін. [5]. Попередні дослідження дозволили нам зупинитися на α-хімотрипсині, який розщеплював Ск на декілька фрагментів, основним з яких був 36-ФСк [1]. Для визначення оптимальних умов нами проведено серію аналітичних гідролізів Ск α-хімотрипсином. У ході електрофоретичного аналізу встановлено, що найбільше накопичення 36-ФСк відбувалось за 10 хв при +20 °С і pH 7,4 інкубаційного середовища.

При співвідношенні ферменту до субстрату з попередніх досліджень (1:25) отримати оптимальний вихід 36-ФСк не вдалося, оскільки вся Ск і, значною мірою, 36-ФСк піддавалися гідролізу з утворенням ФСк з меншою молекулярною масою [1]. Тому проведено серію гідролізів із ваговим співвідношенням фермент:субстрат 1:25; 1:50; 1:75; 1:100; 1:150. Як видно з результатів (табл. 1) програмного аналізу співвідношення в гідролізаті білка (Ск – смуга А) і пептидів (ФСк), при високому ваговому співвідношенні α-хімотрипсин:Ск (1:100–1:150) за інкубації в оптимальних умовах в гідролізаті виявили Ск (смуга А – 47 кДа), яка не була повністю гідролізована. При більш високих концентраціях ферменту ця смуга зникала, що свідчило про повний гідроліз Ск. Накопичення цільового 36-ФСк (смуга Г) відбувалося поступово при зростанні концентрації ферменту і досягало максимуму при співвідношенні 1:75, а потім дещо знижувалося через можливе підвищення автогідролізу α-хімотрипсину і подальшого гідролізу 36-ФСк до ФСк з меншою молекулярною масою, наприклад 7 кДа фрагмента (смуга З). Таким чином, на основі аналізу отриманих результатів зроблено висновок, що найбільш високий вихід 36-ФСк можна отримати при співвідношенні фермент:субстрат – 1:75 протягом 10 хв, температурі +20 °С і pH 7,4. Вихід 36-ФСк за цих умов складав 60 % від маси використаної Ск.

Таблиця 1 – **Відносна кількість стрептокінази та фрагментів її α-хімотриптичного гідролізу протягом 10 хв при +20°С, pH 7,4, за різного співвідношення фермент:субстрат (дані цифрової обробки сканованої електрофореграми програмою Total Lab Software)**

Смуга на електрофореграмі	Молекулярна маса, кДа	Відносна кількість білка або фрагмента у смузі (%) за різного співвідношення фермент:субстрат				
		1:25	1:50	1:75	1:100	1:150
А – стрептокіназа	47	0	0	0	1,03	2,17
Б – фрагмент	42	1,14	0,05	0,05	0,05	0,08
В – фрагмент	40	52,35	32,86	18,73	8,06	0
Г – фрагмент	36	30,39	44,67	60,78	43,79	27,41
Д – фрагмент	30	0,92	1,89	2,55	4,02	8,71
Е* – фрагмент	20	3,02	4,76	5,33	31,12	48,89
Ж* – фрагмент	14	2,97	4,18	4,49	7,02	9,11
З – фрагмент	7	9,21	11,59	7,02	4,91	3,63
Сумарно		100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Примітка. * – відносна кількість білка, вирахована сумарно для пулу смуг в даній зоні.

Для виділення та очистки ФСк використовували різні біохімічні методи: препаративний електрофорез в ПААГ, хроматографію на обернених фазах або хроматографію гідрофобної взаємодії [1]. Але з огляду на наявність в гідролізаті чотирьох груп Фк (див. табл. 1), близьких за молекулярною масою (А-В: 40-47 кДа, Г-Д: 30-36 кДа, Е*: 20 кДа, Ж*-З: 7-14 кДа), ми вважали, що, використовуючи відповідний гель-фільтраційний сорбент (Superose 12B з ефективною зоною розділення білків 25-150 кДа), буде можливо повністю або частково виділити 36-ФСк з гідролітичної суміші.

В результаті хроматографічного розділення α-хімотриптичного гідролізу Ск на Superose 12B одержано 4 основні фракції: 1 – 42-47 кДа, 2 – 31-37 кДа, 3 – 13-22 кДа, 4 – 6-8 кДа. 36-ФСк знаходився у фракції 2. Всі фракції збирали для електрофоретичного аналізу в ПААГ (рис. 1), який показав, що 36-ФСк повністю очищено від низькомолекулярних і частково від високомолекулярних ФСк (наприклад, значні домішки 30 кДа пептидів).

Зважаючи на те, що різні ФСк повині мати різні ізоелектричні точки, що може дозволити поділити їх при зміні pH буфера чи іонної сили, ми вдалися до іонообмінної хроматографії, а саме: (а) очистка на Mono Q у 0,02 M Na_2HPO_4-цитратному буфері з використанням pH градієнта, (б) очистка на DEAE-sepharose за тих

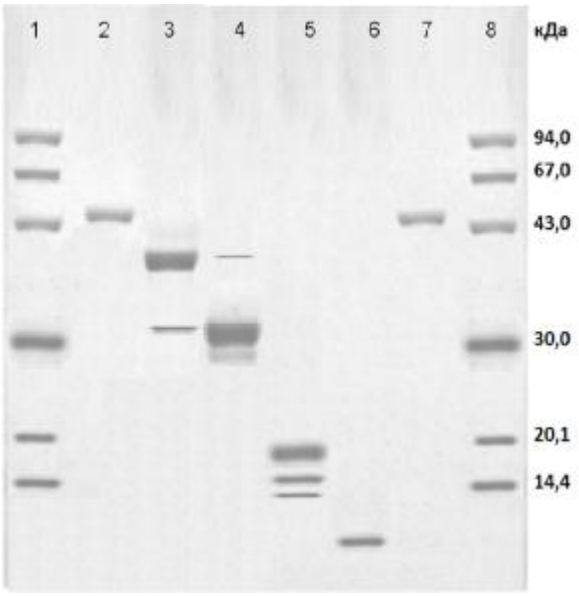


Рис. 1. Електрофореграма фракцій 1-4, отриманих з колонки Superose 12B 10/300 після гель-фільтрації α-хімотриптичного гідролізату Ск:

1, 8 – набір стандартів LMW;
3 – фракція 1 (42-47 кДа);
5 – фракція 3 (13-22 кДа);
2, 7 – стрептокіназа;
4 – фракція 2 (31-37 кДа);
6 – фракція 4 (6-8 кДа).

же умов, (в) очистка на DEAE-sepharose за тих же умов, але із застосуванням градієнта NaCl.

Вибір цих типів іонообмінної хроматографії був обумовлений декількома чинниками. По-перше, необхідно було провести порівняння сильного і слабкого аніонообмінників відносно "захоплення" цільового пептиду з фракції, що наноситься на колонку. По-друге, важливим було з'ясувати міцність зв'язування пептидів із сорбентом та можливість їх елюції за допомогою як градієнта pH, так і нейтралізації заряду градієнтом солі NaCl.

Очистка на Mono Q сефарозі у 0,02 М Na_2HPO_4-цитратному буфері з використанням pH градієнта дала змогу отримати три додаткові фракції: незв'язаний матеріал (фракція 1) та фракції 2 і 3. Електрофоретичний аналіз цих фракцій (рис. 2, треки 1-3) показав, що з незв'язаним матеріалом від 36-ФСк (фракція 3) відокремлюються ФСк з меншою молекулярною масою (30-34 кДа), але цільовий фрагмент залишається ще достатньо забрудненим низько- і високомолекулярними ФСк (≈40 кДа) з частково відокремленої фракції 2.

Очистка на DEAE-сефарозі у 0,02 М Na_2HPO_4-цитратному буфері з використанням pH градієнта. Одержано чотири фракції: незв'язаний матеріал (фракція 1) та фракції 2, 3 і 4. Електрофоретичний аналіз цих фракцій, результати якого представлені на рисунку 2 (треки 4-7), показав, що з незв'язаним матеріалом від 36-ФСк відокремлюються фрагменти з меншою молекулярною масою (30-34 кДа), як і на Mono Q. Елюція з DEAE-sepharose градієнтом pH допомагає додатково видалити низькомолекулярні фрагменти, які концентруються у фракції 4, але також не забезпечує повної очистки цільового 36-ФСк від високомолекулярних фрагментів (≈40 кДа) із частково відокремленої фракції 2.

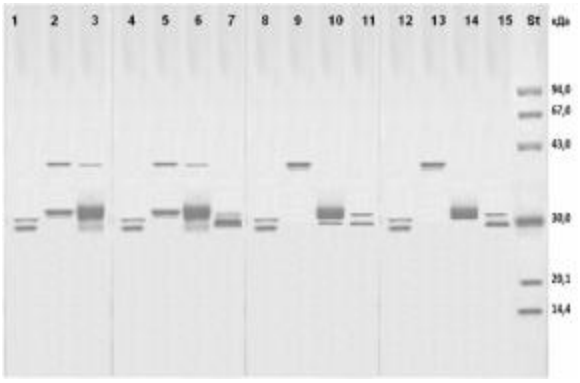


Рис. 2. Електрофореграма фракцій, що містять фрагменти Ск, з іонообмінних колонок Mono Q 5/10 в градієнті pH (треки 1-3), DEAE-sepharose HP 10/16 в градієнті pH (треки 4-7), DEAE-sepharose HP 10/16 в лінійному градієнті NaCl (треки 8-11) і DEAE-sepharose HP 10/16 в ступінчастому градієнті NaCl (треки 12-15):

1, 4, 8, 12 – фракція 1, що не зв'язалася;
2, 5, 9, 13 – фракція 2;
3, 6, 10, 14 – фракція 3;
4, 7, 11, 15 – фракція 4;
St – набір стандартів молекулярної маси LMW.

При майже однаковій ємності двох сорбентів, які порівнювали, градієнт pH на Mono Q формувався більш плавно, ніж на DEAE-superose, завдяки наявності постійного позитивного заряду, але елюція з DEAE-superose за допомогою градієнта pH відбувалась з вищою ефективністю (наявність додаткової фракції 4). Це дало надію, що за допомогою градієнта солі NaCl, який формується лінійно незалежно від заряду сорбенту або буфера, буде можливим виділити 36-ФСк у чистому вигляді.

Очистка на DEAE-сефарозі у 0,02 М Na_2HPO_4-цитратному буфері з використанням градієнта NaCl. Отримано чотири фракції: фракцію 1 (незв'язаний матеріал) та фракції 2, 3 і 4. Електрофоретичний аналіз цих фракцій, результати якого представлені на рисунку 2 (треки 8-11), показав, що з незв'язаним матеріалом від 36-ФСк відокремлюються фрагменти з меншою молекулярною масою (30-34 кДа), як на Mono Q, так і на DEAE-

superose в градієнті pH. Високомолекулярні ФСк (≈40 кДа) із фракції 2 також повністю відокремлюються від 36-ФСк, елюція з DEAE-sepharose градієнтом NaCl. Відділення фракції 3 від 4, де концентруються низькомолекулярні ФСк, відбувається майже повністю. Проекція градієнта NaCl (20, 30, 40 і 50 mS/см^2) дозволяє розрахувати ступінчастий градієнт NaCl, за допомогою якого можна повністю розділити всі фракції при хроматографуванні на DEAE-sepharose. Причому нанесення зразка з концентрацією NaCl 20 mS/см^2 зменшує час відмивання від фракції 1, що не зв'язується, зменшує час і об'єми буферів витрачених на елюцію фракцій і, таким чином, дозволяє сконцентрувати фракції, які одержують, а найголовніше – повністю розділити фракції 3 і 4, що не вдалося зробити на Mono Q, DEAE-superose в лінійному градієнті pH і NaCl, про що свідчать дані, наведені на рисунку 3. Отриманий за допомогою іонообмінної хроматографії на DEAE-superose в ступінчастому градієнті NaCl електрофоретично чистий 36-ФСк було перевірено на біологічну активність і показано його функціональну здатність брати участь в активації плазміногену, тобто зберігати нативну активність Ск.

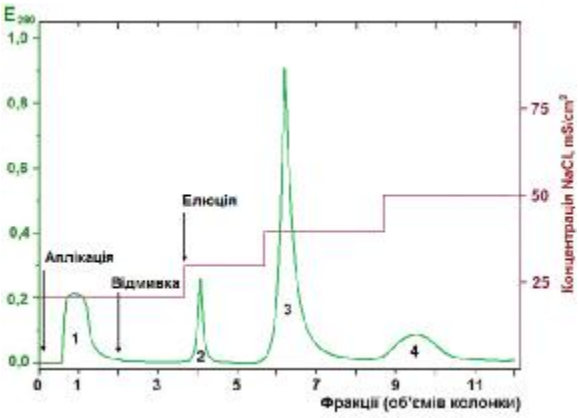


Рис. 3. Іонообмінна хроматограма виділення на колонці з DEAE-sepharose HP (1,0 х 16 см) у лінійному градієнті NaCl від 0,2 до 50 mS/см^2 36-ФСк із фракції 2, одержаної після гель-фільтрації гідролізату на Superose 12 B 10/300:

1 – фракція, що не зв'язалася з DEAE-sepharose HP;
2 – фракція 2;
3 – фракція 3;
4 – фракція 4.

ВИСНОВОК. Розроблено метод отримання електрофоретично чистого і функціонально активного фрагмента стрептокінази при використанні хроматографії, що поділяє за розміром, та іонообмінної хроматографії. Ця можливість відкриває принципово нові методичні підходи як до створення тромболітичних агентів нового покоління, так і до дослідження білок-білкових взаємодій в системі гемостазу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Корольчук В.І. Локалізація ділянок зв'язування плазміногену на стрептокіназі: Дис. … канд. біол. наук: 03.00.04. – К., 1999. – 137 с.

2. Сидоренко Б.А., Преображенский Д.В. Клиническое применение антитромботических препаратов. – М.: Медицина, 1998. – 176 с.

3. Brockway W.J., Castellino F.J. A characterization of native streptokinase and altered streptokinase isolated from a human plasminogen activator complex // Biochemistry. – 1974. – **13**. – P. 2063.

4. Castellino F.J., Urano T., de Ceprano V. et al. Control of human plasminogen activation // Haemostasis. – 1988. – **18**. – P. 15-23.

5. Cederholm-Williams S.A., De Cock F., Lijnen H.R., Collen D. Kinetics of the reactions between streptokinase, plasmin and α_2-antiplasmin // Eur. J. Bioochem. – 1979. – **100**. – P. 125-132.

6. Korolchuk V., Makogonenko E., Cederholm-Williams S. Localization of the human antistreptokinase IgG epitopes on streptokinase // Fibrinolysis and proteolysis. – 1998. – **12**, Suppl. 1. – P. 44.

7. Shi G., Chang B., Wu D., Wu H. Interaction of immobilized human plasminogen and plasmin with streptokinase // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1993. –**195**. – P. 192-200.

8. Summaria L., Wohl R.C., Boreisha I.G., Robbins H.C. A virgin enzyme derived from human plasminogen. Specific cleaveg of the Arg560-Valile peptide bond in the diisopropoxyphinyl virgin enzyme by plasminogen activators // Biochemistry. – 1982. – **21**. – P. 2056-2059.

9. Weber K., Osborn M. The reliability of molekular weight determinations by dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis // J. Biol.Chem. – 1969. – **244**, № 16. – P. 4406-4412.

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ 36 КДА ФРАГМЕНТА СТРЕПТОКИНАЗЫ

С.П. Гаврилюк[1], А.Н. Савчук[2], Л.И. Остапченко[1]
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО[1]
ШИЖИР ИНТЕРНЭШНЛ ХХК., МОНГОЛИЯ, УЛААНБААТАР[2]

Резюме

В последние годы установлено, что при ферментативном гидролизе некоторые пептиды сохраняют активность нативных белков. Нами была показана принципиальная возможность получения высокочистого, по данным электрофореза, и функционально активного 36 кДа фрагмента стрептокиназы, что открывает новые подходы как к созданию тромболитических агентов нового поколения, так и к исследованию белок-белковых взаимодействий в системе гемостаза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **стрептокиназа, 36 кДа фрагмент стрептокиназы, α-химотриптический гидролиз, электрофорез, хроматография.**

METHOD OF OBTAINING AND PURIFICATION OF 36 KDA FRAGMENT OF STREPTOKINASE

S.P. Havrylyuk[1], O.M. Savchuk[2], L.I. Ostapchenko[1]
KYIV NATIONAL UNIVERSITY BY TARAS SHEVCHENKO[1]
SHIJIR INTERNATIONAL CO. LTD[2]., MONGOLIA, ULAANBAATAR

Summary

During the recent years was found out that some peptides are able to hold the activity of native protein at enzyme hydrolysis. We showed the principle possibility of obtainin highly purified (by electrophoresis data) and functionally active 36 kDa fragment of streptokinase. This opens new possibilities both for creation of novel generation of thrombolytic agents and for research of protein-protein interactions in the haemostasis system.

KEY WORDS: **streptokinase, 36 kDa fragment of streptokinase, α-chymotripsine hydrolysis, electrophoresis, chromatography.**

Отримано 20.08.2008 р.

Адреса для листування: *С.П. Гаврилюк, просп. Героїв Сталінграду, 16-Д, кв.183, Київ, 04210, Україна.*

УДК 547.814.5:616.61:612.015.33

ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ПАРЕНТЕРАЛЬНОЇ ФОРМИ КВЕРЦЕТИНУ НА ПЕРЕБІГ ГОСТРОЇ НИРКОВОЇ НЕДОСТАТНОСТІ У ЩУРІВ

І.А. Зупанець, С.К. Шебеко, Д.С. Харченко
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Ниркова недостатність є актуальною проблемою сучасного суспільства, тому що призводить до втрати працездатності, ранньої інвалідизації та високої летальності хворих. Термінальна стадія ниркової недостатності для підтримки життя хворих потребує використання методів замісної терапії, що характеризуються дуже високою вартістю.

У зв'язку з цим, було проведено дослідження впливу парентеральної форми кверцетину на перебіг гострої ниркової недостатності у щурів. Вивчено вплив препарату на деякі показники функціонального стану нирок тварин та показники азотистого обміну. Встановлено, що під впливом парентеральної форми кверцетину відбувалось збільшення діурезу і показників швидкості клубочкової фільтрації та канальцевої реабсорбції. Крім того, проведені дослідження свідчать про позитивний вплив парентеральної форми кверцетину на азотистий обмін у щурів. Так, під її впливом у тварин зменшувався рівень креатиніну та сечовини крові й зростав кліренс сечовини.

Результати експерименту демонструють, що за умов розвитку в щурів гострої ниркової недостатності кверцетин при парентеральному введенні покращує показники функціонального стану нирок та азотистого обміну лабораторних тварин, а також чинить загальний позитивний вплив на перебіг захворювання, при цьому не поступаючись референт-препарату "Леспенефрил".

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **кверцетин, гостра ниркова недостатність, азотистий обмін, функціональний стан нирок.**

ВСТУП. Ниркова недостатність є актуальною проблемою сучасного суспільства, тому що призводить до втрати працездатності, ранньої інвалідизації та високої летальності хворих. Термінальна стадія ниркової недостатності для підтримки життя хворих потребує використання методів замісної терапії, що характеризуються дуже високою вартістю.

Незважаючи на сучасні досягнення в лікуванні ниркової недостатності, поширеність даного захворювання, як і раніше, залишається високою. У різних країнах зареєстровано у середньому від 100 до 2000 хворих на 1 мільйон дорослого населення, які страждають від ниркової недостатності різних стадій [4, 16].

Летальність серед хворих, які страждають від хронічної ниркової недостатності, протягом 10-15 років становить 18-25 % [10, 20], серед пацієнтів, які потребують проведення діалізу, виживання протягом 5 років складає 35 % [7, 19].

Таким чином, хоча в клінічній практиці існує багато методів та лікарських препаратів для лікування ниркової недостатності, проблема розробки та використання нових лікарських засобів займає дуже важливе місце в експериментальній та клінічній фармакології.

© І.А. Зупанець, С.К. Шебеко, Д.С. Харченко, 2009.

Беручи до уваги те, що прогресування ниркової недостатності із залученням нових патологічних механізмів і ослабленням адаптаційних резервів організму вимагає ще більшого фармакологічного втручання, стає зрозумілою тенденція сучасної медицини щодо використання препаратів найбільш фізіологічних та комплексно діючих, що водночас викликають мінімальну кількість побічних реакцій [14, 15].

Серед препаратів, що відповідають даним вимогам, важливе місце займають біофлавоноїди – група речовин природного походження, які відносять до фенольних сполук. Біофлавоноїди є практично нетоксичними для організму людини та при цьому проявляють широкий спектр фармакодинамічних властивостей, важливих при лікуванні захворювань серцево-судинної, опорно-рухової, дихальної, травної та інших систем [11, 17, 18].

З огляду на вищесказане, метою цієї роботи було дослідження впливу парентеральної форми кверцетину на перебіг гострої ниркової недостатності у щурів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження впливу парентеральної форми кверцетину на перебіг гострої ниркової недостатності виконано на 64 білих щурах-самцях, у яких було

відтворено патологію шляхом введення у стегновий м'яз 80 % розчину гліцерину ("Fluka", Швейцарія), виготовленого на фізіологічному розчині, в дозі 9 мл/кг [2]. Як референт-препарат використовували рослинний діуретик гіпоазотемічної дії "Леспенефрил" ("UCB Healthcare", Франція). Всіх щурів поділили на 4 групи по 16 тварин у кожній: інтактний контроль; контрольна патологія; тварини з патологією, які отримували внутрішньочеревно кверцетин у дозі 33,8 мг/кг ($ЕД_{50}$ при нирковій недостатності, яка була одержана на попередньому етапі досліджень); тварини з патологією, які отримували внутрішньошлунково леспенефрил у дозі 1,2 мл/кг, що відповідає середній терапевтичній дозі (СТД) для людини, перерахованій за допомогою коефіцієнтів видової чутливості [3]. Всі препарати вводили 1 раз на добу, починаючи з першого дня експерименту, в необхідній кількості фізіологічного розчину; тварини інтактної та контрольної груп внутрішньочеревно отримували фізіологічний розчин у еквівалентній кількості.

Для оцінки функціонального стану нирок на 4 та 7 доби експерименту у тварин визначали добовий та відносний діурез, після чого їх негайно виводили з досліду. Далі визначали вміст сечовини і креатиніну в крові та сечі, розраховували швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ), канальцеву реабсорбцію та кліренс сечовини.

Спонтанний та відносний діурез визначали за допомогою індивідуальних метаболітних клітин [1]. Визначення вмісту креатиніну в крові та сечі проводили за допомогою біохімічних наборів "Lachema" (Чехія) шляхом реакції з пікриновою кислотою [9].

Кліренс ендогенного креатиніну, кліренс сечовини та канальцеву реабсорбцію розраховували за такими формулами [5, 6, 9]:

$$C_{cr} = U_{cr} \times V / P_{cr}, \quad (1)$$

де C_{cr} – кліренс креатиніну;

U_{cr} – концентрація креатиніну в сечі;

P_{cr} – концентрація креатиніну в плазмі крові;

V – добова кількість сечі;

$$C_{ur} = U_{ur} \times V / P_{ur}, \quad (2)$$

де C_{ur} – кліренс сечовини;

U_{ur} – концентрація сечовини в сечі.

P_{ur} – концентрація сечовини в плазмі крові;

V – добова кількість сечі.

$$R = (1 - P_{cr} / U_{cr}) \times 100\ \%, \quad (3)$$

де R – канальцева реабсорбція;

U_{cr} – концентрація креатиніну в сечі;

P_{cr} – концентрація креатиніну в плазмі крові.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою комп'ютерних програм методами варіаційної статистики з використанням критеріїв Фішера-Стьюдента та непараметричних методів аналізу [8, 12, 13].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для дослідження впливу парентеральної форми кверцетину на перебіг гострої ниркової недостатності (ГНН) було запропоновано використати модель гострого гліцеринового нефрозу у лабораторних щурів, що за механізмами розвитку займає проміжне місце між токсичною та ішемічною ниркою. Перші ознаки ГНН виникали вже на 2 добу досліду, коли стали з'являтись перші летальні випадки серед щурів. Тварини були млявими, малорухливими, з вираженими набряками на мордочках та проявами асциту, не з'їдали денну норму їжі. На 7 добу досліду загальна летальність у контрольній групі склала 75 %, а в групах, де використовували кверцетин та леспенефрил, – по 50 % (рис. 1).

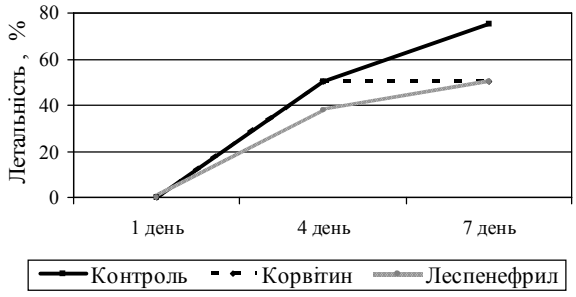


Рис. 1. Летальність щурів з ГНН в експерименті.

В таблиці 1 наведено дані щодо динаміки деяких показників функціонального стану нирок щурів під впливом експериментальної терапії. Так, у групі тварин з контрольною патологією відмічено стійку олігурію, порівняно з інтактними щурами, протягом всього експерименту. Під впливом кверцетину спостерігалось помірне збільшення діурезу, яке на 7 добу мало вірогідний характер порівняно з контрольною патологією. Разом із тим, у 4-й дослідній групі показник діурезу був вірогідно більшим, ніж у контрольних тварин, протягом всього експерименту. Це вказує на те, що референт-препарат "Леспенефрил" має виражену діуретичну активність.

Звертаючи увагу на показник відносного діурезу, можна зазначити, що у тварин контрольної групи протягом всього досліду відмічали вірогідне зменшення відносного діурезу порівняно з інтактними тваринами. При

Таблиця 1– **Динаміка деяких показників функціонального стану нирок щурів з гострою нирковою недостатністю під впливом експериментальної терапії (n=64)**

Умови досліду	Термін досліду, доба	Діурез, мл/доба	Відносний діурез, %	ШКФ, мл/доба	Канальцева реабсорбція, %
1-ша група (інтактний контроль)	4	6,58±0,26	50,58±0,40	393,4±21,7	98,31±0,09
	7	6,80±0,34	50,94±0,35	384,5±21,4	98,20±0,11
2-га група (контрольна патологія)	4	2,70±0,36*	35,01±2,18*	60,3±8,1*	95,46±0,51*
	7	2,90±0,40*	33,58±1,53*	64, 6±7,5*	95,52±0,10*
3-тя група (кверцетин)	4	3,50±0,36	43,77±1,14**	117,0±11,3**	96,86±0,58
	7	5,30±0,49**	47,20±0,60**	144,6±12,6**	96,34±0,11**
4-та група (Леспенефрил)	4	4,32±0,41**	41,59±2,35	137,5±14,4**	96,80±0,30
	7	6,63±0,47**	48,83±1,45**	158,4±13,4**	95,73±0,48

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – p≤0,05 відносно інтактної групи; ** – p≤0,05 відносно групи контрольної патології.

використанні кверцетину для лікування щурів показники відносного діурезу були вірогідно більшими за показники тварин з контрольною патологією, але не перевищували показники тварин, які отримували леспенефрил.

У контрольній групі показник ШКФ протягом всього досліду був вірогідно меншим, ніж в інтактних тварин, причому на 7 добу він знижувався в 6 разів. В інших дослідних групах, де застосовували кверцетин та леспенефрил, показник ШКФ був вірогідно вищим (приблизно у 2 рази), ніж у щурів з контрольною патологією, причому вірогідних відмінностей за впливом на гломерулярну фільтрацію між даними препаратами не спостерігалось.

В умовах розвитку експериментальної ниркової недостатності дуже часто змінюється реабсорбційна функція нирок, яка характеризується таким показником, як канальцева реабсорбція, тому в цьому ракурсі він набуває великого значення. При розвитку ГНН у контрольних щурів спостерігалось вірогідне зниження показника канальцевої реабсорбції порівняно з інтактними тваринами. Саме таке зниження відмічено і в 4-й дослідній групі. В 3-й групі, де застосовували кверцетин, цей показник був вірогідно вищим за рівень у щурів з контрольною патологією та трохи більшим, ніж у тварин, які отримували референт-препарат "Леспенефрил", що може бути пов'язано з його високою діуретичною активністю.

В таблиці 2 наведено дані щодо динаміки деяких показників азотистого обміну у тварин з ГНН під впливом експериментального лікування. При розвитку ниркової недостатності у щурів на 4 добу досліду спостерігалось значне підвищення рівня креатиніну крові (приблизно в 5 разів) порівняно з інтактними тваринами. В інших дослідних групах рівень креатиніну крові був вірогідно меншим, ніж у контрольних щурів, але він все ж таки перевищував у 3 рази рівень креатиніну крові інтактних тварин.

Таблиця 2 – **Динаміка деяких показників азотистого обміну щурів з гострою нирковою недостатністю під впливом експериментальної терапії (n=64)**

Умови досліду	Термін досліду, доба	Креатинін крові, мкмоль/л	Сечовина крові, ммоль/л	Кліренс сечовини, мл/доба
1-ша група (інтактний контроль)	4	57,5±3,6	4,32±0,26	158,2±5,9
	7	59,5±4,2	4,93±0,37	161,3±10,7
2-га група (контрольна патологія)	4	299,0±27,4*	27,48±2,58*	30,2±4,4*
	7	267,1±26,3*	25,45±2,85*	32,2±3,2*
3-тя група (кверцетин)	4	192,2±15,8**	24,03±1,66	51,7±7,6**
	7	157,3±15,2**	20,73±2,43	74,1±11,7**
4-та група (леспенефрил)	4	184,2±15,9**	22,70±2,04	65,9±7,5**
	7	149,6±17,4**	19,75±1,43	95,5±13,2**

Подібна картина спостерігалась і при аналізі рівня сечовини крові. На 4 добу досліду в контрольній групі зареєстровано його зростання приблизно в 6 разів порівняно з

інтактними тваринами, далі цей показник трохи зменшувався. На відміну від цього в 3-й та 4-й групах рівень сечовини крові був меншим, ніж у щурів з контрольною патологією, причому в 3-й групі протягом всього експерименту даний показник не мав вірогідних відмінностей від рівня сечовини у тварин, яких лікували референт-препаратом "Леспенефрил", що також характеризує з позитивної сторони вплив парентеральної форми кверцетину на перебіг ниркової недостатності.

Інтенсивність виведення основного продукту азотистого обміну – сечовини відображає такий показник, як кліренс сечовини, тому при вивченні ниркової недостатності йому необхідно приділяти також велику увагу. Так, у щурів з контрольною патологією цей показник був меншим рівня інтактних тварин приблизно у 5 разів протягом всього експерименту. При використанні кверцетину кліренс сечовини був вірогідно більшим, ніж у щурів з контрольною нирковою недостатністю, але він не перевищував даний показник у групі тварин, де терапію проводили леспенефрилом.

Таким чином, розглянуті експериментальні дані демонструють, що за умов розвитку в щурів гострої ниркової недостатності кверцетин при парентеральному введенні покращує показники функціонального стану нирок та азотистого обміну лабораторних тварин, а також чинить загальний позитивний вплив на перебіг захворювання, при цьому не поступаючись референт-препарату "Леспенефрил".

ВИСНОВКИ. 1. В умовах розвитку в щурів гострої ниркової недостатності кверцетин значно покращує показники функціонального стану нирок та азотистого обміну, що зумовлює його загальний позитивний вплив на перебіг вищезазначеної патології.

2. За впливом на показники функціонального стану нирок кверцетин не поступається, а за деякими показниками навіть перевищує, референс-препарат "Леспенефрил".

ЛІТЕРАТУРА

1. Баринов Э.Ф., Кот А.Г., Якубенко Е.Д., Буряк Л.А. Оптимизация условий исследования функций почек в хроническом эксперименте // Физиол. журн. – 1987. – **33**, № 6. – С. 80-82.

2. Гуляев В.Г. Гипоазотемические свойства и механизм действия биофлавоноидов и антигипоксантов при лечении острой и хронической почечной недостаточности: Автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – К., 1989. – 44 с.

3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.

4. Дудар І., Величко М. Ренопротекція: реальні можливості сьогодення // Ліки України. – 2004. – № 7-8. – С. 26-32.

6. Зупанець І.А., Москаленко В.Ф., Місюрьова С.В. та ін. Клінічні лабораторні методи дослідження: Навчальний посібник / За ред. І.А. Зупанця, В.Ф. Москаленка. – Х.: Вид-во НФАУ; Золоті сторінки, 2001. – 178 с.

5. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: Справочник: В 2 т. – Т. 1. – 2-е изд. – Мн.: Интерпрессервис, 2003. – 495 с.

7. Кучма І.Л. Хронічна хвороба нирок: що нам необхідно робити сьогодні? // Therapia. – 2006. – № 6. – С. 25-29.

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

9. Маршалл В.Дж. Клиническая биохимия: Пер. с англ. – С.Пб.: БИНОМ, 2000. – 368 с.

10. Мухин И.В., Николенко В.Ю. Морфологические изменения почек при подагрическом гломерулонефрите // Нефрология. – 2004. – **8**, № 2. – С. 73-77.

11. Оспанова Т.С., Семидоцька Ж.Д., Халанський О.А. Флавоноїдні препарати у патогенетичній терапії хронічного гломерулонефриту // Ліки. – 1996. – № 5-6. – С. 19-26.

12. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – 3-е изд. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.

13. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – 304 с.

14. Смирнов А.В., Каюков И.Г., Есаян А.М. и др. Превентивный подход в современной нефрологии // Нефрология. – 2004. – **8**, № 3. – С. 7-14.

15. Смирнов А.В., Каюков И.Г., Есаян А.М. и др. Современные подходы к замедлению прогрессирования хронической болезни почек // Нефрология. – 2004. – **8**, № 3. – С. 89-99.

16. Caimi G., Carollo C., Lo Presti R. et al. Chronic renal failure: oxidative stress, endothelial dysfunction and wine // Clinical Nephrology. – 2004. – **62** (5). – P. 331-335.

17. Garcia-Saura M.F., Galisteo M., Villar I.C. et al. Effects of chronic quercetin treatment in experimental renovascular hypertension // Molecular And Cellular Biochemistry. – 2005. – **270** (1-2). – P. 147-155.

18. Inal M., Altinisik M., Bilgin M.D. et al. The effect of quercetin on renal ischemia and reperfusion injury in the rat // Cell Biochemistry and Function. – 2002. – **20** (4). – P. 291-296.

19. National Kidney Foundation. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification. Executive Summary. – N.Y., 2002. – 94 p.

20. Schieppfti A., Perico N., Remuzzi G. Preventing end-stage renal disease: the potential impact of screening and intervention in developing countries // Nephrol. Dial. Transplant. – 2003. – **18**, № 5. – P. 858-859.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОЙ ФОРМЫ КВЕРЦЕТИНА НА ТЕЧЕНИЕ ОСТРОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У КРЫС

И.А. Зупанец, С.К. Шебеко, Д.С. Харченко
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Почечная недостаточность является актуальной проблемой современного общества, поскольку приводит к утере работоспособности, ранней инвалидизации и высокой летальности больных. Терминальная стадия почечной недостаточности для поддержания жизни больных требует использования методов заместительной терапии, которые характеризуются очень высокой стоимостью.

В связи с этим, было проведено исследование влияния парентеральной формы кверцетина на течение острой почечной недостаточности у крыс. Изучено влияние препарата на некоторые показатели функционального состояния почек животных и показатели азотистого обмена. Установлено, что под влиянием парентеральной формы кверцетина отмечалось повышение диуреза и показателей скорости клубочковой фильтрации и канальцевой реабсорбции. Кроме того, проведенные исследования свидетельствуют о положительном влиянии парентеральной формы кверцетина на азотистый обмен у крыс. Так, под её влиянием у животных уменьшался уровень креатинина и мочевины крови и увеличивался клиренс мочевины.

Результаты эксперимента демонстрируют, что в условиях развития у крыс острой почечной недостаточности кверцетин при парентеральном введении улучшает показатели функционального состояния почек и азотистого обмена лабораторных животных, а также оказывает общее позитивное влияние на течение заболевания, при этом не уступая референт-препарату "Леспенефрил".

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **кверцетин, острая почечная недостаточность, азотистый обмен, функциональное состояние почек.**

STUDY OF THE INFLUENCE OF QUERCETIN PARENTERAL FORM ON CLINICAL COURSE OF ACUTE KIDNEY FAILURE IN RATS

I.A. Zupanets, S.K. Shebeko, D.S. Kharchenko
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

Kidney failure is the actual problem of modern society, because it results in the loss of working capacity, early invalidisation and high lethality of patients. The terminal stage of kidney failure for support of patients, life requires the use of methods of replacement therapy, which is characterized by a very high cost.

Thereupon, the study of the influence of quercetin parenteral form on clinical course of the acute kidney failure in rats was conducted. Influence of the preparation on some indexes of the functional state of rat kidneys and on the indexes of nitrous exchange was studied. Under the influence of quercetin the increase of diuresis and indexes of speed of glomerular filtration and tubular reabsorbtion was marked. In addition, the conducted researches prove the positive influence of quercetin on nitrous exchange in rats. So, under the influence of quercetin in rats the serum blood levels of kreatinin and carbamide diminished and clearance of carbamide was multiplied.

The results of experiment show that under conditions of the development of kidney failure in rats quercetin parenteral form improves the indexes of the functional state of kidneys and nitrous exchange of laboratory animals, and also has common positive influence on clinical course of disease, the same as referent- preparation "Lespenefril".

KEY WORDS: **quercetin, acute kidney failure, nitrous exchange, functional state of kidneys.**

Отримано 11.12.2008 р.

Адреса для листування: *Д.С. Харченко, просп. Леніна, 68а, кв. 74, Харків, 61128, Україна.*

УДК 615.9-06:616-008.9-085.31:577.112.3

ВИКОРИСТАННЯ ГІСТИДИНАТУ МІДІ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ МЕТАБОЛІЧНИХ ПОРУШЕНЬ ЗА УМОВ ГОСТРОГО ТОКСИЧНОГО УРАЖЕННЯ ОРГАНІЗМУ

Я.І. Гонський, О.І. Острівка, С.Р. Підручна
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

У результаті досліджень встановлено, що застосування гістидинату міді призвело до нормалізації показників вільнорадикального окиснення білків (ОМБ), стану плазматичних та лізосомальних мембран (АлАТ, АсАТ) і антиоксидантної системи (каталаза, церулоплазмін) у сироватці крові й гомогенаті печінки тварин, отруєних хлоридом кадмію та нітритом натрію на тлі рентгенівського опромінення. Це дозволяє використовувати даний металокомплекс за хімічно-променевих отруєнь на ранніх етапах розвитку інтоксикації.

КЛЮЧОВІ СЛОВА**: гістидинат міді, нітрит натрію, хлорид кадмію, рентгенівське опромінення, амінотрансферази, антиоксидантна система, окиснена модифікація білків.**

ВСТУП. Результати проведених досліджень засвідчили, що комбінація хлориду кадмію, нітриту натрію та тлі рентгенівського опромінення проявляє виражений токсичний вплив на організм білих щурів. Це супроводжується змінами антиоксидантної системи сироватки крові й печінки тварин, функціональних властивостей плазматичних та лізосомальних мембран гепатоцитів, активації вільнорадикального окиснення Тому на сьогодні важливого значення набуває пошук нових середників з антиоксидантними та мембраностабілізувальними властивостями, які б запобігали даним порушенням в організмі тварин.

Останнім часом широко використовують окремі амінокислоти та їх солі як високоефективні й малотоксичні засоби профілактики та лікування різних захворювань. Мала токсичність, висока фармакологічна і терапевтична активність та широкий спектр дії амінокислот як лікарських засобів зумовлені тим, що вони перебувають у клітинах у вільному стані і є обов'язковими структурними елементами тканинних білків, багатьох гормонів, вітамінів, низькомолекулярних біологічно активних сполук [2, 6]. Велике значення має те, що багато амінокислот відіграють важливу роль регуляторів біохімічних і фізіологічних процесів, зокрема медіаторів, які беруть участь у знешкодженні токсичних проміжних продуктів обміну, покращують тканинне дихання, впливають на трофіку клітин і складають їх метаболічний фонд [8].

Важлива роль в метаболічних процесах, зокрема в регуляції антиоксидантно-прооксидантної рівноваги, належить амінокислоті гістидину, яка є пасткою для $OH^{\cdot}$-радикалів. Металокомплекси гістидину беруть участь у руйнуванні вільних радикалів. За даними літератури, мідь, яка не ввійшла до складу церулоплазміну [4], у крові утворює комплекси з білками та амінокислотами, в тому числі з гістидином.

Гістидинат міді має антиоксидантні, мембраностабілізувальні, антигіпоксичні та анаболічні властивості. За своїми властивостями та дією гістидинат міді подібний до церулоплазміну, власне до складу активного центру останнього входить металокомплекс гістидину та міді [3, 4]. Гістидинат міді може бути донором іонів міді для організму, має виражені антиоксидантні, кровотворні властивості, він одночасно оксидує токсичні біогенні аміни, переводить двовалентне залізо в тривалентне, що особливо важливо для біосинтезу трансферину та його участі в кровотворенні [6].

Зважаючи на те, що у механізмах пошкоджувальної дії хлориду кадмію та нітриту натрію на тлі низьких доз опромінення головною є активація вільнорадикальних реакцій окиснення, то застосування названого препарату з антиоксидантними та анаболічними властивостями можна вважати патогенетично обґрунтованим методом корекції.

Гістидинат міді було вперше одержано на кафедрі медичної хімії Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на білих безпородних лабораторних щурах-самцях масою 120-160 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Токсичне ураження викликали солями кадмію та нітри-

© Я.І. Гонський, О.І. Острівка, С.Р. Підручна, 2009.

ту натрію після опромінення низькими дозами радіаційного ураження.

Хлорид кадмію вводили внутрішньошлунково в дозі 6 мг/кг маси тіла (1/15 LD_{50}), нітрит натрію – в дозі 70 мг/кг (1/3 LD_{50}). Одноразове опромінювання здійснювали за допомогою рентгенівського апарата РУМ-17 у дозі 0,5 Гр (напруга – 40 кВ, сила струму – 80 мА, фільтри – 0,5 мм Cu та Zn, шкірно-фокусна відстань – 40 см, потужність дози – 1 Р/с). З метою корекції метаболічних порушень тварини щодоби, починаючи з першого дня введення токсикантів, отримували гістидинат міді в дозі 0,94 мг/кг (біотична доза міді в крові).

Піддослідних тварин поділили на 3 групи: 1-ша – інтактні (контроль); 2-га – комбіноване ураження хлоридом кадмію та нітритом натрію після опромінення низькими дозами радіації; 3-тя – уражені тварини, яким проводили корекцію гістидинатом міді. Для дослідження використовували сироватку крові та гомогенат печінки. Декапітацію проводили на 1, 3 та 5-ту доби від моменту інтоксикації під легким ефірним наркозом. Стан антиоксидантної системи оцінювали за активністю церулоплазміну і каталази в сироватці крові та печінці [9, 10], функціональний стан плазматичних мембран – за активністю АсАТ та АлАТ [9] у сироватці крові й гомогенаті печінки, про стан окисної модифікації білків судили за динамікою вмісту ОМБ (альдегідо- та кетонопохідних нейтрального ($ОМБ_{370}$) і основного ($ОМБ_{430}$) характеру) в сироватці крові [11].

Роботу із щурами проводили відповідно до правил Європейської конвенції про гуманне ставлення до лабораторних тварин [13].

Отримані результати піддавали статистичній обробці з використанням критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Введення в організм щурів гістидинату міді призводило до зниження активності цитозольних ферментів (АлАТ та АсАТ) в уражених тварин. Як видно з досліджень, вже з першого дня після введення коригувального середника активність АлАТ у сироватці крові була знижена порівняно з нелікованими тваринами. Чітке, статистично достовірне зниження активності АлАТ мало місце на 3-й і 5-й дні експерименту, що, відповідно, було менше на 90 і 58 % від рівня уражених. Аналогічні зміни в сторону зниження активності АлАТ спостерігали і в гомогенаті печінки, що становили на 3-тю добу 96 %, на 5-ту – 82 % відносно уражених тварин. Такої ж спрямованості зазнала активність АсАТ під впливом даного металокомплексу. В цьому випадку найбільше зниження активності ферменту мало місце на 5-ту добу експерименту в сироватці крові й становило 81 % відносно рівня уражених тварин (рис. 1).

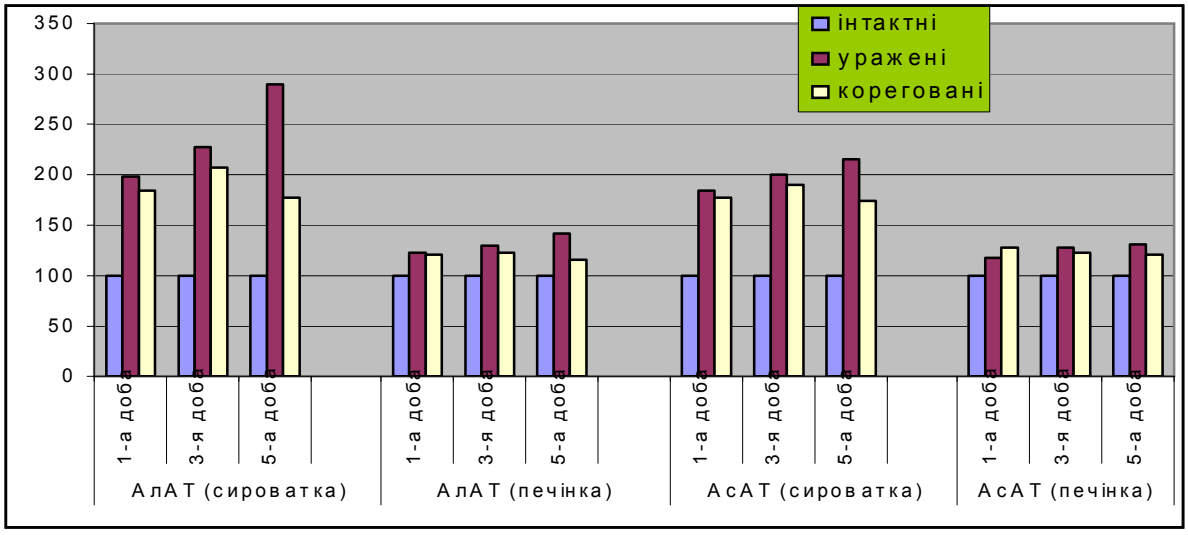


Рис. 1. Динаміка змін активності АлАТ та АсАТ в сироватці крові й гомогенаті печінки уражених тварин, %.

У гомогенаті печінки активність АсАТ теж зазнавала змін у сторону зниження (рис. 1). Наведені результати демонструють, що гістидинат міді викликає нормалізацію метаболічних процесів у тканинах уражених тварин, і це проявляється зміною активності мембранозалежних ферментів АлАТ та АсАТ.

Результати досліджень дають підставу вважати, що печінка у лікованих тварин на 5-ту добу від початку введення гістидинату міді ще не повністю повернулася до рівня норми. Отже, зміни активності амінотрансфераз в сироватці крові та гомогенаті печінки щурів, уражених токсикантами за умов корекції порушень гісти-

динатом міді, спрямовані у сторону норми, але рівня інтактних тварин при цьому не досягли.

Дія нітриту натрію та хлориду кадмію на тлі рентгенівського опромінення на організм тварин супроводжувалася інтенсифікацією окисненої модифікації білків сироватки крові та печінки (ОМБ), яка є одним із ранніх індикаторів ураження тканин при ВР патології, за якої утворюються карбонільні похідні амінокислотних залишків [7]. Активні форми кисню, що утворюються в процесі метаболізму ксенобіотиків, зумовлюють не лише пероксидацію ліпідів, але й окиснювальну модифікацію білків (ОМБ) [12]. Ініціація останніх є найбільш небезпечною ланкою токсичного пошкодження клітин через інактивацію цитоплазматичних ферментів та мембранних іонних насосів із наступним запуском різноманітних механізмів руйнування клітин. Крім того, деструкція білків – більш надійний маркер окиснювальних пошкоджень тканин, ніж ПОЛ, оскільки продукти окиснювальної модифікації білків стабільніші порівняно з продуктами пероксидного окиснення ліпідів. Зважаючи на це, становило інтерес дослідити дані процеси в уражених ксенобіотиками тварин та з'ясувати їх внесок в ендогенну інтоксикацію організму. В щурів з гострим нітритним та кадмієвим отруєнням показники ОМБ зазнали більш виражених змін. Найвищий вміст альдегідо- і кетонопохідних нейтрального та основного характеру відмічено на 5-ту добу з моменту введення токсинів, що складало, відповідно, 156 та 165 для $ОМБ_{370}$ і $ОМБ_{430}$ в сироватці крові й аналогічно 150 і 160 % в гомогенаті печінки. Таким чином, в уражених тварин протягом усього експерименту вміст показників ОМБ переважав над таким у контрольних щурів.

Введення ураженим тваринам для корекції гістидинату міді в сироватці крові зумовило статистично достовірне зниження вмісту альдегідо- та кетонопохідних білків нейтрального ($ОМБ_{370}$) характеру і на 5-ту добу експерименту становило 77 % відносно уражених щурів. Аналогічні зміни мали місце і при дослідженні вмісту альдегідо- та кетонопохідних білків основного характеру ($ОМБ_{430}$) і становили 68 % від рівня уражених тварин ($p_1<0,05$). За дії металокомплексу спостерігалася тенденція до зниження в гомогенатах печінки як для $ОМБ_{370}$, так і для $ОМБ_{430}$ протягом всього експерименту. На 5-ту добу дослідження зниження становило 74 та 76 % відповідно. Отже, гістидинат міді має здатність інгібувати активовані процеси вільнорадикального окиснення білків, про що у наших дослідженнях свідчило зниження в сироватці крові та гомогенаті печінки лікованих тварин рівня окисненомодифікованих білків порівняно з нелікованими (табл. 1).

При вивченні вмісту церулоплазміну та активності каталази після введення гістидинату міді ураженим тваринам, отруєним комплексом ксенобіотиків, спостерігалася нормаліза-

Таблиця 1 – **Вміст альдегідо- та кетонопохідних нейтрального ($ОМБ_{370}$ нм) і основного ($ОБМ_{430}$ нм) характеру в сироватці крові та гомогенаті печінки щурів з експериментальним токсичним ураженням, викликаним солями хлориду кадмію та нітриту натрію на тлі рентгенівського опромінення і за корекції гістидинатом міді (M±m; n=7)**

Показники	Біологічна рідина	Група тварин						
		інтактні, n=7	уражені хлоридом кадмію та нітритом натрію на тлі рентгенівського опромінення, n=21			уражені тварини, кориговані гістидинатом міді, n=21		
			1-ша доба	3-тя доба	5-та доба	1-ша доба	3-тя доба	5-та доба
$ОМБ_{370}$, ммоль/л	Сироватка крові	0,95± 0,01	1,34± 0,05 p<0,05	1,40± 0,06 p<0,01	1,48± 0,06 p<0,01	1,30± 0,05 $p_1>0,05$	1, 20± 0,04 $p_1<0,05$	1,15± 0,05 $p_1<0,01$
$ОМБ_{430}$, ммоль/л	Сироватка крові	0,68± 0,04	0,97± 0,05 p<0,05	1,09± 0,06 p<0,01	1,12± 0,05 p<0,01	1,12± 0,03 $p_1>0,05$	0,94± 0,04 $p_1<0,05$	0,77± 0,05 $p_1<0,05$
$ОМБ_{370}$, ммоль/г	Гомогенат печінки	1,40± 0,02	1,80± 0,05 p<0,05	1,94± 0,06 p<0,01	2,08± 0,07 p<0,01	1,92± 0,06 $p_1>0,05$	1,68± 0,05 $p_1<0,05$	1,53± 0,06 $p_1<0,01$
$ОМБ_{430}$, ммоль/г	Гомогенат печінки	0,98± 0,03	1,43± 0,05 p<0,05	1,49± 0,03 p<0,01	1,56± 0,05 p 0,01	1,40± 0,03 $p_1>0,05$	1,25± 0,06 $p_1<0,05$	1,18± 0,05 $p_1<0,01$

Примітка. Тут і в наступній таблиці: p – різниця достовірна відносно інтактних тварин ($p<0,05$), p_1 – різниця достовірна відносно уражених тварин ($p_1<0,05$).

ція цих показників у сироватці крові та гомогенаті печінки (табл. 2).

Так, вміст церулоплазміну за умов опромінення та отруєння ксенобіотиками різко зростав, однак металокомплекс знижував його на 140 % відносно уражених тварин ($p<0,05$) та до кінця експерименту наближав до рівня норми.

Отже, проведені нами дослідження, в ході яких вивчали вплив гістидинату міді на детоксикуючі процеси і стан антиоксидантної системи організму тварин за умов хімічного ураження та опромінення, показали, що даний препарат може інгібувати активовані процеси ОМБ, ефективно нормалізувати показники ферментативної антиоксидантної системи. В основі такого впливу може бути його здатність підсилювати дію ендогенних антиоксидантів у реакціях з вільними радикалами.

Іншим важливим ферментом антиоксидантної системи є каталаза, яка знешкоджує пероксид водню, що утворюється в супероксиддисмутазній реакції та інших пероксидазних реакціях. Про позитивний вплив застосованого середника на стан антиоксидантної системи свідчить зниження активності каталази у сироватці крові та гомогенаті печінки уражених тварин в напрямку норми. Пригнічення вільнорадикальних реакцій екзогенним антиоксидантом запобігає виснаженню ендогенної антиоксидантної системи. Це може бути однією з причин поліпшення стану системи антиоксидантного захисту у тварин, яким вводили гістидинат міді, порівняно з ураженими [1].

При комбінованому отруєнні тварин активність каталази різко зросла в сироватці крові та гомогенаті печінки. Ефективно вплинув на її активність в сироватці крові та печінці гістидинат міді на 5-ту добу експерименту. В першому випадку її активність знизилася на 55 % порівняно з отруєними тваринами, у другому – на 66 %.

Таблиця 2 – **Активність церулоплазміну і каталази в сироватці крові та печінці щурів з експериментальним токсичним ураженням, викликаним солями хлориду кадмію та нітриту натрію на тлі рентгенівського опромінення і за корекції гістидинатом міді (M±m; n=7)**

Показник	Біологічна рідина	Група тварин						
		інтактні, n=7	уражені хлоридом кадмію та нітритом натрію на тлі рентгенівського опромінення, n=21			уражені тварини, кориговані гістидинатом міді, n=21		
			1-ша доба	3-тя доба	5-та доба	1-ша доба	3-тя доба	5-та доба
Каталаза, мкат/л білка	Сироватка крові	0,02± 0,002	0,07± 0,002 $p<0,001$	0,09± 0,003 $p<0,001$	0,09± 0,002 $p<0,001$	0,08± 0,002 $p_1>0,05$	0,07± 0,003 $p_1<0,05$	0,05± 0,002 $p_1<0,01$
Каталаза, мкат/кг білка	Гомогенат печінки	0,11± 0,006	0,16± 0,004 $p<0,01$	0,18± 0,004 $p<0,01$	0,21± 0,005 $p<0,001$	0,17± 0,004 $p_1>0,05$	0,16± 0,003 $p_1<0,05$	0,14± 0,005 $p_1<0,01$
Церулоплазмін, г/л	Сироватка крові	0,14± 0,004	0,27± 0,003 $p<0,01$	0,32± 0,004 $p<0,01$	0,41± 0,002 $p<0,001$	0,37± 0,003 $p_1<0,05$	0,28± 0,002 $p_1<0,01$	0,19± 0,004 $p_1<0,01$

Таким чином, при дослідженні антиоксидантної системи уражених тварин та впливу на неї гістидинату міді ми встановили, що застосованому коригувальному чиннику притаманні антиоксидантні властивості. Це проявилося позитивним його впливом на вміст церулоплазміну в сироватці крові, активність каталази в сироватці крові та гомогенаті печінки. Можна стверджувати, що цей середник виконує функцію ендогенного антиоксиданта, чим оберігає їх від перевитрачання під час дії ксенобіотиків та призводить до їх нормалізації в ураженому організмі.

ВИСНОВКИ. Узагальнюючи вищенаведені експериментальні дані, можна вважати, що введення тваринам з гострим хімічним отруєнням на тлі рентгенівського опромінення гістидинату міді позитивно вплинуло на всі досліджувані показники. Гістидинат міді зумовив зменшення показників ОМБ сироватки крові та гомогенату печінки, збільшення синтезу білків у печінці, сприяв відновленню функції і структури плазматичних мембран та мембран органел. Крім того, застосування гістидинату міді мало інгібуючий вплив на інтенсивність пероксидного окиснення білків та запобігало виснаженню антиоксидантної системи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Барабой В.А., Олійник С.А., Хмелевський Ю.В. Стан антиоксидної системи за дії іонізуючої радіації у низьких дозах та низької інтенсивності //Укр. біохім. журн. – 1994. – **66**, № 4. – С. 3-29.

2. Гайдамака О.В., Литвинов О.В. Гепатопротекторні препарати: сучасний стан і перспектива їх створення // Фармац. журн. – 1998. – № 6. – С. 42-46.

3. Головко Л.Л. Стан захисних систем організму за умови комбінованої дії солей свинцю, кадмію та нітритів і корекція їх порушень за допомогою металокомплексу та ентеросорбенту "Фібросил": Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.03.04. – Тернопіль, 2005. – 20 с.

4. Гонський Я.І., Кубант Р.М. Корекція порушень вільнорадикальних процесів у щурів з токсичним ураженням печінки за допомогою металокомплексів // Наук. вісник Ужгород. ун-ту. – 2001. – Вип. 15. – С. 6-10.

5. Гонський Я.І., Острівка О.І. Коригуючий вплив гістидинату міді на деякі показники білкового обміну у щурів за нітритного отруєння // Матер. IX Українського біохімічного з'їзду. – 2006. – **2**. – С. 38-39.

6. Дегтярева И.И., Скрыпник И.Н., Невойт А.В. и др. Гепатопротекторы-антиоксиданты в терапии больных с хроническими диффузными заболеваниями печени // Новые медицинские технологии. – 2002. – № 6. – С. 18-24.

7. Дубініна О.Ю. Окиснювальний стрес і окиснювальна модифікація білків // Мед. хімія. – 2001. – **3**, № 2. – С. 5-12.

8. Западнюк В.И., Купраш Л.П., Заика М.И., Безверхая И.С. Аминокислоты в медицине. – К.: Здоров'я, 1982. – 198 с.

9. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. - Мн.: Беларусь, 2000. – **1**. 495 с.

10. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.

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

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

13. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasburg. – 1986. – № 123. – 52 p.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИСТИДИНАТА МЕДИ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ОРГАНИЗМА

Я.И. Гонский, О.И. Острівка, С.Г. Пидручна

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

В результате исследований установлено, что применение гистидината меди привело к нормализации показателей свободнорадикального окисления белков (ОМБ), состояния плазматических и лизосомальных мембран (АлАТ, АсАТ), антиоксидантной системы (каталаза, церулоплазмин) в сыворотке крови и гомогенате печени животных, отравленных хлоридом кадмия, нитритом натрия на фоне рентгеновского облучения. Это разрешает использовать данный металокомплекс при химически-лучевых отравлениях на ранних этапах развития интоксикации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **гистидинат меди, нитрит натрия, хлорид кадмия, рентгеновское облучение, аминотрансферазы, антиоксидантная система, окислительная модификация белков.**

USING OF COPPER HISTIDINE FOR CORRECTION OF METABOLIC DESORDERS UNDER CONDITIONS OF ACUTE TOXIC INJURY OF ORGANISM

Y.I. Honsky, O.I. Ostrivka, S.R. Pydruchna

TERNOPI L STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

Using of copper histidine caused the normalization of free radical oxidation of proteins (OMP), state of plasmatic and lysosomal membrane (AlAT, AsAT), antioxidant system in blood serum and liver, poisoned by cadmium chloride, sodium nitrite against the background of low doses of X-ray irradiation. This fact points on the possibility of using the mentioned metal complex at chemical-radioactive intoxication at the early stages.

KEY WORDS: **copper histidine, sodium nitrite, cadmium chloride, X-ray irradiation, aminotransferases, antioxidant system, oxydative modification of proteins.**

Отримано 17.02.2009 р.

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

УДК 615.322:615.23:616.2

НАУКОВО-ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СКЛАДУ ПРЕПАРАТУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ КАШЛЮ ТА ЗАСТУДНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

Л.І. Вишневська, О.Г. Чистяков, Н.Б. Бурд, В.А. Георгіянц, О.В. Колесніков
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

З метою розробки складу фітотерапевтичного засобу для лікування кашлю та застудних захворювань проведено логіко-структурний аналіз лікарської рослинної сировини і зроблено комп'ютерний прогноз фармакологічної активності відібраних біологічно активних речовин. За результатами виконаних досліджень запропоновано склад для потенційного лікарського засобу з антибактеріальною, противірусною, протизапальною, відхаркувальною, протикашльовою, бронходилатуючою, спазмолітичною, мембраностабілізувальною та мембранопротекторною активністю.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **настойка, захворювання органів дихання, лікарська рослинна сировина.**

ВСТУП. Захворюваність на гострі респіраторні інфекції (ГРІ) має яскраво виражений сезонний характер і зростає переважно в зимовий період. Кашель є одним з основних клінічних симптомів і захисною реакцією організму, спрямованою на відновлення прохідності дихальних шляхів. Він виконує дві головні функції: забезпечує евакуацію секрету з повітроносних шляхів і захищає їх від аспірації чужорідних тіл.

Актуальність розробки нових лікарських засобів для лікування кашлю та застудних захворювань зумовлена не тільки частотою їх прояву, але й необхідністю впливу на багато різноманітних чинників одразу. Перевагами фітотерапевтичного лікування застудних захворювань є можливість одночасного впливу комбінованих фітозасобів на етіологічні чинники та патологічні симптоми застудних захворювань, менша кількість побічних ефектів (пов'язана з більш м'яким впливом на організм і тривалістю лікування) та менша токсичність, що зменшує навантаження на організм, який зазнав впливу бактеріальних токсинів, а також перевірена часом та науково підтверджена ефективність рослинних засобів.

Етіотропна фітотерапія застудних захворювань зазвичай спрямована на такі процеси [1-3, 6, 7]: відновлення захисних бар'єрів верхніх дихальних шляхів за допомогою протизапальних, антигіпоксичних фітозасобів, що стимулюють регенерацію і місцевий імунітет (*алтея лікарська, аніс звичайний, багно болотне, будра плющоподібна, бузина чорна, оман високий, дягель лікарський, гісоп лікарський, китятки сибірські, конюшина лугова, копитняк європейський, льон звичайний, малина звичайна, солодка гола, сосна звичайна, термопсис ланцетний*); боротьба з інфекцією завдяки застосуванню лікарських рослин з антимікробною, противірусною активністю (*цибуля городня, часник городній, алоє деревоподібне, аїр звичайний, нагідки лікарські, м'ята перцева, евкаліпт прутоподібний, сосна звичайна, чебрець звичайний, кріп запашний, сухоцвіт багновий, чистотіл великий, шавлія лікарська, гірчиця сарептська, тополя чорна, цитрусові*); зміцнення організму вітамінними препаратами (*нагідки лікарські, обліпиха крушиноподібна, горобина звичайна, кропива дводомна, смородина чорна, суниці лісові, первоцвіт весняний)*.

Для ***патогенетичної фітотерапії*** використовують [1-3, 6, 7]: фітозасоби для відновлення дренажної функції бронхів (муколітики – *алтея лікарська, аніс звичайний, будра плющоподібна, бузина чорна, оман високий, дягель лікарський, гісоп лікарський, конюшина лугова, копитняк європейський, льон звичайний, малина звичайна, солодка гола*); мукорегулятори – інгаляції ефірних олій та фітонцидів (*сосна звичайна, види евкаліпту, шавлія лікарська, м'ята перцева, лаванда вузьколиста, меліса лікарська, ромашка лікарська, чебрець плазкий*); відхаркувальні засоби рефлекторної дії (*багно звичайне, іпекакуана, китятки сибірські, термопсис ланцетоподібний*); лікарські рослини з протизапальною активністю (*береза бородавчаста, оман високий, звіробій звичайний, нагідки лікарські, підбіл звичайний, ромашка аптечна, шавлія лікарська* тощо); препарати для усунення гіпоксії (*астрагал шерстистоквітковий, липа серцелиста, перстач прямостоячий, лопух великий, манжетка звичайна, меліса лікарська, синюха*

© Л.І. Вишневська, О.Г. Чистяков, Н.Б. Бурд, В.А. Георгіянц, О.В. Колесніков, 2009.

блакитна, смородина чорна, ісландський мох (цетрарія ісландська), шавлія лікарська).

Симптоматична фітотерапія спрямована на [3, 6, 7]: нормалізацію температури тіла (*липа серцелиста, ромашка аптечна, волошка синя*); підтримку серцево-судинної системи (*види глоду, горицвіт весняний*); нормалізацію сну (фітозасоби із седативно-снодійною дією – *валеріана лікарська*, *буркун лікарський, м'ята перцева, фіалка триколірна, лаванда вузьколиста, череда трироздільна, півонія незвичайна, хміль звичайний*).

Виходячи з частоти згадувань в літературі лікарської рослинної сировини (ЛРС), нами було відібрано найбільш застосовувані рослини з актуальними видами дії. Для подальших досліджень та створення лікарського засобу використовували: *кореневища аїру, корені алтеї і солодки, кореневища з коренями оману, квітки липи, бузини чорної, ромашки, нагідок, листя кропиви, м'яти перцевої, шавлії, трава чебрецю плазкого*.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для обґрунтування складу, крім логічного підходу та даних літератури, вирішили використати комп'ютерний прогноз фармакологічної активності хімічних речовин за програмою PASS (Prediction of Activity of synthetic substances), яка іноді дозволяє оптимізувати, наприклад, цілеспрямований синтез речовин з певними видами фармакологічної активності [4]. Програма основана на передбаченні можливої фармакологічної активності з урахуванням фармакофорних фрагментів, що входять до складу молекули. Особливістю програми PASS є неможливість аналізувати вуглеводні сполуки, тому фармакологічна активність була розрахована тільки для агліконів. Хоча відомо, що полісахариди відіграють важливу роль у лікуванні кашлю [3, 5, 6].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. З даних прогнозу фармакологічної активності нами були відібрані ефекти, що тією чи іншою мірою стосуються етіотропної, патогенетичної та симптоматичної терапії захворювань, які супроводжуються кашлем. При цьому звернули увагу тільки на ті біологічно активні речовини (БАР), індекс активності яких був вищим 50 %. Результати аналізу наведено у таблиці 1.

Таким чином, за результатами комп'ютерного прогнозування біологічної активності діючих речовин, препарату з відібраної рослинної сировини буде притаманна антибактеріальна,

Таблиця 1 – **Фармакологічна активність та ефекти досліджуваної рослинної сировини**

Активність	БАР	Індекс активності	ЛРС, до складу якої входить БАР
1	2	3	4
Антибактеріальна, протигрибкова	камфора	+*	кореневища аїру, листя шавлії
	лімонен	0,550	листя шавлії, трава чебрецю, листя м'яти перцевої
	евгенол	++	кореневища аїру
	бензиловий спирт	+	квітки липи, кореневища аїру, листя шавлії, кореневища з коренями оману
Протизапальна	камфора	+	кореневища аїру, листя шавлії
	±-каламен	0,599	кореневища аїру
	акорон	0,518	кореневища аїру
	азулен	0,571	кореневища аїру, квітки ромашки
	±-терпінен	0,525	кореневища аїру, листя шавлії
	1,8-цінеол (евкаліптол)	0,505	листя шавлії, листя м'яти перцевої
	ментон	0,532	листя м'яти перцевої, кореневища аїру, листя шавлії, трава чебрецю
	бензальдегід	0,614	квітки бузини, листя шавлії, квітки ромашки
	кверцетин	0,506	квітки бузини, квітки липи, листя кропиви
	п-кумарова кислота	0,509	квітки нагідок, квітки бузини, листя кропиви
	кофейна кислота	0,516	квітки нагідок, квітки бузини, листя кропиви
	о-гідроксикорична кислота	0,559	квітки нагідок, квітки бузини, листя кропиви
	хамазулен	+	квітки ромашки
Спазмолітична	камфора	0,612	кореневища аїру, листя шавлії
	±-пінен	0,646	листя м'яти перцевої, листя шавлії, кореневища аїру
	±-терпінен	0,534	кореневища аїру, листя шавлії
	бензиловий спирт	0,595	квітки бузини, листя шавлії, квітки ромашки

1	2	3	4
Противірусна (застуда, запальні респіраторно-вірусні інфекції)	камфен	0,552	кореневища аїру, листя шавлії, листя м'яти перцевої
	камфора	+ 0,603	кореневища аїру, листя шалії, кореневища з коренями оману
	борнеол	0,572	листя шавлії, трава чебрецю, листя м'яти перцевої
	акорон	0,527	кореневища аїру
	±-пінен	0,577	листя м'яти перцевої, листя шавлії, кореневища аїру
	бензиловий спирт	0,562	квітки бузини, листя шавлії, квітки ромашки
Відхаркувальна	лімонен	+	листя шавлії, трава чебрецю, листя м'яти перцевої
Протикашльова	ментон	0,737	листя м'яти перцевої, кореневища аїру, листя шавлії, трава чебрецю
Бронходилатуюча, протиастматична	азарон	0,866	кореневища аїру, листя шавлії, трава чебрецю
	бензальдегід	0,607	квітки бузини, листя шавлії, квітки ромашки
Мембрано-стабілізувальна	камфора	0,564	кореневища аїру, листя шавлії
	борнеол	0,526	листя шавлії, трава чебрецю, листя м'яти перцевої
	±-каламен	0,769	кореневища аїру
	азулен	0,578	кореневища аїру, квітки ромашки
	±-терпінен	0,599	кореневища аїру, листя шавлії
	ментон	0,573	листя м'яти перцевої, кореневища аїру, листя шавлії, трава чебрецю
	азарон	0,697	кореневища аїру, листя шавлії, трава чебрецю
	евгенол	0,823	кореневища аїру
	бензальдегід	0,942	квітки бузини, листя шавлії, квітки ромашки
	бензиловий спирт	0,555	квітки бузини, листя шавлії, квітки ромашки
	кверцетин	0,959	квітки бузини, квітки липи, листя кропиви
	кемпферол	0,969	квітки бузини, квітки липи, листя кропиви
	п-кумарова кислота	0,948	квітки нагідок, квітки бузини, листя кропиви
	кофейна кислота	0,946	квітки нагідок, квітки бузини, листя кропиви
	урсолова кислота	0,901	квітки бузини, квітки нагідок, листя м'яти перцевої, листя шавлії, трава чебрецю
	хамазулен	0,691	квітки ромашки
Мембранопротекторна (слизові)	камфен	0,735	кореневища аїру, листя шавлії, листя м'яти перцевої
	камфора	0,508	кореневища аїру, листя шавлії
	борнеол	0,539	листя шавлії, трава чебрецю, листя м'яти перцевої
	акорон	0,629	кореневища аїру
	±-терпінен	0,735	кореневища аїру, листя шавлії
	ментон	0,692	листя м'яти перцевої, кореневища аїру, листя шавлії, трава чебрецю
	азарон	0,630	кореневища аїру, листя шавлії, трава чебрецю
	евгенол	0,806	кореневища аїру
	бензальдегід	0,869	квітки бузини, листя шавлії, квітки ромашки
	кверцетин	0,857	квітки бузини, квітки липи, листя кропиви
	кемпферол	0,857	квітки бузини, квітки липи, листя кропиви
	п-кумарова кислота	0,781	квітки нагідок, квітки бузини, листя кропиви
	кофейна кислота	0,816	квітки нагідок, квітки бузини, листя кропиви
	о-гідроксикорична кислота	0,781	квітки нагідок, квітки бузини, листя кропиви
	урсолова кислота	0,962	квітки бузини, квітки нагідок, листя м'яти перцевої, листя шавлії, трава чебрецю
	хамазулен	0,793	квітки ромашки

Примітка. +* – дія є відомою для даної речовини.

противірусна, протизапальна, відхаркувальна, протикашльова, бронходилатуюча, спазмолітична, а також мембраностабілізувальна та мембранопротекторна активність.

ВИСНОВКИ. 1. З метою розробки складу фітотерапевтичного засобу для лікування кашлю та застудних захворювань проведено логіко-структурний аналіз біологічно активних речовин ЛРС.

2. За результатами проведених досліджень визначено склад для потенційного лікарського засобу з комплексним впливом на етіологічні та патогенетичні фактори при застудних захворюваннях, а також з комплексом БАР, що має протикашльові та відхаркувальні властивості: кореневища аїру, корені алтеї і солодки, кореневища з коренями оману, квітки липи, бузини чорної, ромашки, нагідок, листя кропиви, м'яти перцевої, шавлії, трава чебрецю плазкого.

3. Прогноз фармакологічної активності основних діючих БАР з відібраних лікарських рослин підтвердив доцільність застосування запропонованого складу комплексного фітотерапевтичного засобу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд-е, 1990. – 333 с.

2. Компендиум 2007 – лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. – К.: Морион, 2007. – 2270 с.

3. Соколов С.Я. Фитотерапия и фитофармакология: Руководство для врачей . – М.: Медицинское информационное агентство, 2000. – 976 с.

4. Филимонов Д.А., Поройков В.В. Прогноз спектра биологической активности органических соединений // Рос. хим. журн. – 2006. – **50**, № 2. – С. 66-75.

5. Franova S., Kardosova A., Kostalova D. Herbal polysaccharides in the treatment of coughs // Bratisl. Lek. Listy. – 1998. – **99**, № 2. – P. 108-110.

6. Widdicombe J.G., Ernst E. Clinical cough V: complementary and alternative medicine: therapy of cough // Handb. Exp. Pharmacol. – 2009. – **187**. – P. 321-342.

7. Ziment I. Herbal antitussives // Pulm. Pharmacol. Ther. – 2002. – **15**, № 3. – P. 327-333.

НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОСТАВА ПРЕПАРАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КАШЛЯ И ПРОСТУДНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Л.И. Вишневская, А.Г. Чистяков, Н.Б. Бурд, В.А. Георгиянц, А.В. Колесников

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

С целью разработки состава фитотерапевтического средства для лечения кашля и простудных заболеваний проведен логико-структурный анализ лекарственно-растительного сырья и осуществлен компьютерный прогноз фармакологической активности отобранных биологически активных веществ. По результатам исполненных исследований предложен состав для потенциального лекарственного средства с антибактериальной, противовирусной, противовоспалительной, отхаркивающей, противокашлевой, бронходилатирующей, спазмолитической, мембраностабилизирующей и мембранопротекторной активностью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **настойка, заболевания органов дыхания, лекарственное растительное сырьё.**

SCIENTIFIC AND TEORETICAL SUBSTATIATION OF COUGH AND COLD REMEDIUM COMPOSITION

L.I. Vyshnevska, O.H. Chystyakov, N.B. Burd, V.A. Georgiyants, O.V. Kolesnikov

NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

The logical structural analysis of medicinal plants and computational prognosis of pharmacological activity of chosen biologically active substances was carried out with the purpose of development of pharmaceutical preparation for cough and cold treatment. The composition for the potential preparation with antibacterial, antiviral, anti-inflammatory, coughing up, antitussive, broncholytic, spasmolytic, membrane-stabilizing and membrane-protective action was proposed asa result of investigations.

KEY WORDS: **tincture, pulmonary diseases, herbal medicinal raw material.**

Отримано 16.02.2009 р.

Адреса для листування: *Л.І. Вишневська, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53 Харків, 61002, Україна.*

УДК 615.212: 615.276:547.857.4

ДОСЛІДЖЕННЯ АНАЛЬГЕТИЧНОЇ І ПРОТИЗАПАЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ АМОНІЙНИХ СОЛЕЙ 1,7-ДИЗАМІЩЕНИХ КСАНТИНІЛ-8-ТІООЦТОВОЇ КИСЛОТИ

В.І. Корнієнко, Б.А. Самура
ХАРКІВСЬКА ДЕРЖАВНА ЗООВЕТЕРИНАРНА АКАДЕМІЯ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Проведено скринінг амонійних солей 1,7-дизаміщених ксантиніл-8-тіооцтової кислоти і вивчено їх вплив на запальний процес і чутливість вісцеральних ноцицепторів. У результаті дослідження анальгетичної активності виявлено сполуку 6, яка має знеболювальну дію, порівнянну з активністю диклофенаку. При дослідженні протизапальної активності виражену антиексудативну дію справляла та сама сполука, яка не поступалася за дією диклофенаку.

Амонійні солі 1,7-дизаміщених ксантиніл-8-тіооцтової кислоти є перспективними для проведення подальшого синтезу і фармакологічного скринінгу з метою створення на їх основі фармакологічних речовин, які проявляють анальгетичну і протизапальну дії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **амонійні солі 1,7-дизаміщених ксантиніл-8-тіооцтової кислоти, анальгетична активність, протизапальна активність.**

ВСТУП. Регуляція запального процесу, який є провідною патогенетичною ланкою у розвитку ряду захворювань різного генезу, продовжує привертати увагу як дослідників, так і клініцистів. Ураження суглобів і біль у спині є частими станами, які призводять до інвалідизації пацієнтів [3, 4, 14]. Нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) – основна група лікарських засобів, які застосовують при лікуванні ревматичних захворювань. Анальгетичний і протизапальний ефекти даної групи препаратів пов'язані з пригніченням активності циклооксигенази-2 (ЦОГ-2) у вогнищі запалення – ключового ферменту синтезу простагландинів прозапальної активності, а пригнічення ізоформи ЦОГ-1 призводить до порушення фізіологічних реакцій, зокрема до порушення синтезу простагландинів класу Е у слизовій оболонці шлунка і розвитку ерозивно-виразкового ураження [5, 10, 12].

Імовірність розвитку ерозивно-виразкового ураження шлунка і дванадцятипалої кишки при терапії НПЗП залежить від стану слизової, інтенсивності й тривалості самої терапії. При вже наявному ерозивно-виразковому процесі у гастродуоденальній зоні продовження терапії НПЗП сприяє прогресуванню виразкового процесу з розвитком кровотечі та перфорації [6-9]. Частота прояву побічних ефектів при застосуванні диклофенаку досягає 20 %, що підтверджено численними дослідженнями [13].

Результати комп'ютерного прогнозу можливих видів фармакологічної активності амонійних солей 1,7-дизаміщених ксантиніл-8-тіооцтової кислоти, вивчених за допомогою програми ОРАКУЛ і PASS, свідчать про високу ймовірність наявності анальгетичних і протизапальних властивостей, що послугувало підставою для проведення даних досліджень.

Метою роботи було дослідження протизапальної та анальгетичної активності амонійних солей 1,7-дизаміщених ксантиніл-8-тіооцтової кислоти.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Анальгетичну активність амонійних солей 1,7-дизаміщених ксантиніл-8-тіооцтової кислоти (спол. 1-12) визначали на моделі оцтових корчів у дослідах на білих щурах лінії Вістар масою 140-180 г. Корчі викликали внутрішньочеревним введенням 0,75 % водного розчину оцтової кислоти у дозі 1 мл на 100 г маси тіла тварини. Підрахунок числа корчів проводили через 20 хв після внутрішньочеревного введення оцтової кислоти впродовж 30 хв. Досліджувані речовини вводили внутрішньошлунково у дозі 0,05 $ЛД_{50}$ за допомогою спеціального зонда за 30 хв до введення 0,75 % водного розчину оцтової кислоти. Зменшення кількості корчів у тварин, порівняно з контрольною групою, слугувало

© В.І. Корнієнко, Б.А. Самура, 2009.

показником анальгетичної активності речовин. Анальгетичну активність виражали у відсотках зниження числа оцтових корчів у дослідних тварин порівняно з контрольними групами [1].

Антиексудативний ефект амонійних солей 1,7-дизаміщених ксантиніл-8-тіооцтової кислоти (спол. 1-12) вивчали на моделі гострого запального набряку, викликаного субплантарним введенням флогогену – карагеніну. Досліди були проведені на білих щурах лінії Вістар обох статей масою 140-180 г. Досліджувані речовини вводили у дозі 0,05 $ЛД_{50}$ внутрішньошлунково за 30 хв до введення флогогенного агента. Контрольним групам вводили дистильовану воду. Через 30 хв під апоневроз задньої лапки щура вводили по 0,1 мл 1 % водної суспензії карагеніну. За допомогою онкометра вимірювали об'єм лапки у тварин до початку досліду і щогодини впродовж 4 год. Антиексудативну активність визначали за ступенем зменшення експериментального набряку в дослідних щурів порівняно з контрольними групами і виражали у відсотках до контролю. Як препарат порівняння використовували диклофенак ($ЕД_{50}$=8 мг/кг). Ступінь пригнічення набряку обчислювали за формулою:

$$\% \text{ пригнічення} = \frac{Yk - Yo}{Yk} \cdot 100,$$

де Yk і Yo – обсяг лапки в контролі та у досліді [1, 2].

Результати оброблені методами варіаційної статистики за t-критерієм Стьюдента з використанням програмного забезпечення "Windows-2000", електронних таблиць Excel і пакета математичної обробки Mathcad-5,0.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналіз експериментальних даних (табл. 1) показує, що серед амонійних солей 7-фторбензилксантиніл-8-тіооцтової кислоти (спол. 1-4) виражену анальгетичну активність проявила піперидинова сіль 7-фторбензилксантиніл-заміщених 8-тіооцтової кислоти (спол. 1), яка у дозі 25,5 мг/кг викликала в щурів зменшення кількості оцтових корчів на 34,2 % ($p<0,05$). Заміна піперидинової солі у молекулі 7-фторбензилксантиніл-8-тіооцтової кислоти (спол. 1) на морфолінову (спол. 2), бензиламінову (спол. 3) і моноетанолову (спол. 4) солі призводила до зниження анальгетичної активності.

Помірну анальгетичну активність мала більшість амонійних солей 7-ацетилметилксантиніл-8-тіооцтової кислоти (спол. 5-11). Ці речовини зменшували кількість корчів у щурів на 14,8-42,6 %. Виражену антиноцицептивну дію справляла гексаметиленамінова сіль 7-ацетилметилксантиніл-8-тіооцтової кислоти (спол. 6), яка у дозі 28,1 мг/кг зменшувала кількість оцтових корчів на 42,6 % ($p<0,05$). Заміна гексаметиленамінової солі молекули 7-ацетилметилксантиніл-8-тіооцтової кислоти (спол. 6) на піролідинову (спол. 7), діетиламінову (спол. 8), етаноламінову (спол. 9), піперидинову (спол. 10) і морфолінову (спол. 11) солі призводила до зниження анальгетичної активності досліджуваних речовин.

Результати дослідження антиексудативної активності амонійних солей 1,7-дизаміщених ксантиніл-8-тіооцтової кислоти (спол. 1-12) наведені у таблиці 1. Встановлено, що серед амонійних солей 7-фторбензилксантиніл-8-тіооцтової кислоти (спол. 1-4) виражену протизапальну активність проявила піперидинова сіль 7-фторбензилксантиніл-8-тіооцтової кислоти (спол. 1), яка у дозі 25,5 мг/кг викликала зменшення розвитку експериментального набряку лапки у щурів на 31,7 % ($p<0,05$).

Більш виражену антифлогістичну активність мала більшість амонійних солей 7-ацетилметилксантиніл-8-тіооцтової кислоти (спол. 5-11). Вони зменшували прояв ексудативної реакції на дію флогогенного агента на 15,6-44,1 %. Серед даних речовин виявлено високоефективну протизапальну сполуку 6, яка у дозі 17,2 мг/кг викликала у щурів пригнічення розвитку флогогенного набряку лапки на 44,1 % ($p<0,05$). Заміна гексаметиленамінової солі молекули 7-ацетилметилксантиніл-8-тіооцтової кислоти (спол. 6) на моноетаноламінову (спол. 5), піперидинову (спол. 10), діетиламінову (спол. 8), піролідинову (спол. 7), етаноламінову (спол. 9) і морфолінову (спол. 11) солі призводила до зменшення протизапальних властивостей.

Можна припустити, що протизапальний ефект амонійних солей 7-фторбензилксантиніл-8-тіооцтової кислоти реалізується за рахунок інгібування експресії генів, відповідальних за синтез прозапальних цитокінів [11].

ВИСНОВОК. Виражений анальгетичний і протизапальний ефекти проявила гексаметиленамінова сіль 7-ацетилметилксантиніл-8-тіооцтової кислоти (спол. 6), яку за дією можна порівняти з дією диклофенаку.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. Амонійні солі 1,7-дизаміщених ксантиніл-8-тіооцтової кислоти є групою органічних речовин,

Таблиця 1 – **Анальгетична і протизапальна активність амонійних солей 1,7-дизаміщених ксантиніл-8-тіооцтової кислоти (n=7)**

Сполука	Доза, мг/кг	Анальгетична активність			Протизапальна активність		
		Кількість корчів	% до контролю	активність, %	об'єм лапки через 4 год, мл	% до контролю	% пригнічення
1	25,5	33,1±1,55*	65,8	34,2	1,53±0,04*	68,3	31,7
2	16,0	34,4±1,04*	68,4	31,6	1,62±0,10*	72,3	27,7
3	17,6	37,7±1,27*	75,0	25,0	1,75±0,05*	78,1	21,9
4	17,0	36,1±1,26*	71,8	28,2	1,66±0,05*	74,1	24,9
Контроль	–	50,3±1,44	100	–	2,24±0,05	100	–
5	50,0	30,6±1,23*	62,2	37,8	1,49±0,04*	65,6	34,4
6	28,1	28,7±1,11*	57,4	42,6	1,27±0,03*	55,9	44,1
7	26,9	40,1±1,55	80,2	19,8	1,78±0,04*	78,4	21,6
8	50,0	37,7±1,15*	75,4	24,6	1,72±0,05*	75,8	24,2
9	37,5	43,7±0,92	87,4	12,6	1,89±0,04*	83,3	16,7
10	26,8	36,3±1,76	82,6	27,4	1,65±0,07*	72,7	27,3
11	50,0	42,6±1,11	85,2	14,8	1,91±0,05*	84,1	15,9
12	0,7	48,7±1,51	93,8	6,2	1,98±0,04	87,2	12,8
Диклоенак	8,0	27,3±1,9*	54,6	45,4	1,23±0,05	54,2	45,8
Контроль	–	50,0±1,02	100	–	2,27±0,05	100	–

Примітка. * – при $p<0,05$ порівняно з контролем.

перспективною для подальшого цілеспрямованого синтезу і проведення фармакологічного скринінгу з метою створення на їх основі нових нестероїдних протизапальних засобів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів / Під ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – С. 433-443.

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

3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – 15-е изд., перераб., испр. и доп. – М.: ООО Изд-во Новая волна, 2005. – 1200 с.

4. Насонов Е.Л. Нестероидные противовоспалительные препараты при ревматических заболеваниях // Рос. мед. журн. – 2001. – № 9. – С. 7-8.

5. Насонов Е.Л. Применение нестероидных противовоспалительных препаратов // Рос. мед. журн. – 2002. – **10**, № 4. – С. 206-212.

6. Сороцкая В.Н., Каратеев А.Е. Желудочно-кишечные осложнения как одна из причин смерти больных ревматическими заболеваниями // Научно-практическая ревматология. – 2005. – № 4. – С. 34-37.

7. Crofford L.J., Oates J.C., Mc Cune W.J. et al. Thrombosis in patients with connective tissue diseases treated with specific cyclooxygenase 2 inhibitors: a report of four // Arthritis Rheum. – 2000. – **43**. – P. 1891-1896.

8. Garcia-Rodriguez L.A. Risk of hospitalization for upper gastrointestinal tract bleeding associated with Ketorolac, other NSAIDs, calcium antagonists and other antihypertensive drugs // Arch. Intern. Med. – 1998. – **158**. – P. 33-39.

9. Gislason G., Jacobsen S., Rasmussen J. et al. Risk of death or reinfarction associated with the use of selective cyclooxygenase-2 inhibitors and nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs after acute myocardial infarction // Circulation. – 2006. – **113**, № 25. – P. 2906-2913.

10. Goldstein J.L., Silverstein F.E., Agrawal N.M. et al. Reduced risk of upper gastrointestinal ulcer complications with celecoxib, a novel COX-2 inhibitor // Am. J.Gastroenterol. – 2000. – **95**. – P. 1681-1690.

11. Katzung B.G. Basic and Clinical Pharmacology. – 9-th ed. – San-Francisco: The McGraw-Hill Companies, 2004. – 1227 p.

12. Minoru T., Shiro U., Hiroyuki K. et al. Inflammatory response to acute myocardial infarction augments neointimal hyperplasia after vascular injury in a remote artery // Arteriosclerosis, Thrombosis and Vasc. Biol. – 2006. – № 9. – P. 360-365.

13. Singh G., Fort J., Goldstein J. et al. Celecoxib versus naproxen and diclofenac in osteoarthritis patients: SUCCESS-1 study // Am. J. Med. – 2006. – **119**. – P. 255-266.

14. Warrington K.J., Kent P.D., Frye R.L. et al. Rheumatoid arthritis is an independent risk factor for multi-vessel coronary artery disease: a case control study // Arthritis Res. Ther. – 2005. – **7**, № 5. – P. 984-991.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ АММОНИЙНЫХ СОЛЕЙ 1,7-ДИЗАМЕЩЁННЫХ КСАНТИНИЛ-8-ТИОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

В.И. Корниенко, Б.А. Самура
ХАРЬКОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ЗООВЕТЕРИНАРНАЯ АКАДЕМИЯ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Проведён скрининг аммонийных солей 1,7-дизамещённых ксантинил-8-тиоуксусной кислоты и изучено их влияние на воспалительный процесс и чувствительность висцеральных ноцицепторов. В результате исследования анальгетической активности обнаружено соединение 6, которое имеет обезболивающее действие, сравнимое с активностью диклофенака. При исследовании противовоспалительной активности выраженное антиэксудативное действие проявляло то самое соединение, которое не уступало по действию диклофенаку.

Аммонийные соли 1,7-дизамещённых ксантинил-8-тиоуксусной кислоты являются перспективными для проведения дальнейшего синтеза и фармакологического скрининга с целью создания на их основе фармакологических веществ, которые проявляют анальгетическое и противовоспалительное действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **аммонийные соли 1,7-дизамещённых ксантинил-8-тиоуксусной кислоты, анальгетическая активность, противовоспалительная активность.**

INVESTIGATION OF ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF AMMONIA SALTS OF 1,7-DISUBSTITUTED OF XANTHINYL-8-THIOACETIC ACID

V.I. Korniyenko, B.A. Samura
KHARKIV STATE ZOOVETERINARY ACADEMY
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

Screening of ammonia salts of 1,7-disubstituted of xanthinyl-8-thioacetic acid has been conducted and their influence on inflammatory process and sensitiveness of visceral nociceptors has been studied. As a result of research of analgesic activity the compound 6 has been exposed, possessing analgesic action comparatively with activity of diclofenac. At the research of anti-inflammatory activity the expressed anti-exudative action was shown by the same compound which is not less than action of diclofenac. Ammonia salts of 1,7-disubstituted of xanthinyl-8-thioacetic acid are perspective for conducting the further synthesis and pharmacoogical screening with the purpose of creation of pharmacological substances with analgesic and anti-inflammatory action on their basis.

KEY WORDS: **ammonia salts of 1,7-disubstituted of xanthinyl-8-thioacetic acid, analgesic activity, anti-inflammatory activity.**

Отримано 6.02.2009 р.

Адреса для листування: *В.І. Корнієнко, вул. Студентська, 6/18, кв. 1, Харків, 61024, Україна.*

УДК 615.451:612.015.3

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИЙ АНАЛІЗ ФЛАВОНОЇДІВ ЦИТРУСОВИХ

А.П. Левицький, О.А. Макаренко, І.І. Крисюн
ДУ "ІНСТИТУТ СТОМАТОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ", ОДЕСА

У роботі проведено спектрофотометричний аналіз комплексів хлориду алюмінію із флавоноїдами екстрактів шкірки апельсина, грейпфрута й мандарина. Показано, що головним флавоноїдом шкірки апельсина й мандарина є глікозид гесперидин. У грейпфрутовому екстракті зареєстровано наявність глікозиду нарингіну. Найбільш багатим джерелом флавоноїдів є екстракт шкірки мандарина.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **апельсин, грейпфрут, мандарин, флавоноїди, методи визначення.**

ВСТУП. Інтерес до дослідження біофлавоноїдів (БФ), великої групи рослинних біологічно активних сполук, викликаний різноманіттям їх функцій як у рослинному, так і тваринному організмі. БФ здатні регулювати й модулювати ключові функціональні системи ферментів, клітин, органів і тканин, завдяки чому ці речовини можуть ефективно запобігати розвитку патологічних порушень, а також справляти лікувальну дію при широкому спектрі захворювань [4, 9-11].

Одним з багатих джерел БФ є плоди цитрусових [2, 8]. За своєю будовою основні флавоноїди цитрусових представлені похідними флаванону або флавонолу. До похідних флаванону відносять глікозиди гесперитину (гесперидин), нарингеніну (нарингін), а також еридиктіолу. Похідними флавонолу є глікозиди кверцетину (рутин), кемпферолу (кемпферитин) і мірицетину. Всі інші флавоноїди у плодах цитрусових утримуються в кількості менш ніж 10 % від загальної суми цих сполук. БФ представлені, головним чином, у глікозидній формі, утвореній за рахунок β-глікозидного зв'язку однієї з гідроксильних груп аглікону із цукрами [7].

У зв'язку з цим, а також враховуючи актуальність пошуку нових натуральних лікувально-профілактичних засобів, нами розроблені схеми отримання екстрактів зі шкірки цитрусових (апельсина, грейпфрута й мандарина) з метою створення нових препаратів. Важливим етапом стандартизації препаратів є кількісне визначення вмісту діючих речовин. Нами був обраний метод спектрометричного аналізу комплексів флавоноїдів із хлоридом алюмінію у зв'язку з його високою точністю, чутливістю й експресністю [3, 5, 6].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Екстракція: подрібнену наважку сировини (10 г) у патроні з фільтрувального паперу поміщали в апарат Сокслета і заливали 70 % етиловим спиртом в об'ємі 250 мл. Вичерпну екстракцію проводили до зникнення забарвлення (приблизно 7-8 год).

В отриманих екстрактах визначали вміст сухих речовин [1] та фенольних сполук [12]. Сумарний вміст флавоноїдів визначали спектрофотометричним методом за реакцією комплексоутворення флавоноїдів із хлоридом алюмінію [3, 5]. Визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів у екстрактах проводили за такою методикою: в пробірку до 0,5 мл екстракту, розведеного в 10 разів, додавали 0,5 мл 5 % розчину хлориду алюмінію в 96 % етанолі, 3 мл 96 % етанолу і перемішували. Через 40 хв вимірювали оптичну густину утвореного комплексу в інтервалі довжин хвиль від 200 до 500 нм. Вимірювання проводили на спектрофотометрі UVmini-1240 ("Shimadzu") у кварцових кюветах з товщиною шару 1 см.

Примітки: 1. Приготування розчину стандартних зразків гесперидину і нарингіну:

а) 2 мг (точна наважка) стандартного зразка гесперидину кількісно переносять у мірну пробірку зі шліфом місткістю 25 мл, додають 10 мл 96 % етанолу і нагрівають на водяній бані до повного розчинення кристалів, після охолодження доводять об'єм розчину 96 % етанолом до 20 мл і перемішують;

© А.П. Левицький, О.А. Макаренко, І.І. Крисюн, 2009.

б) 10 мг (точна наважка) стандартного зразка нарингіну кількісно переносять у мірну пробірку зі шліфом місткістю 25 мл, додають 10 мл 96 % етанолу і нагрівають на водяній бані до повного розчинення кристалів, після охолодження доводять об'єм розчину 96 % етанолом до 20 мл і перемішують.

2. Приготування 5 % розчину хлориду алюмінію: 5 г хлориду алюмінію розчиняють у 96 % етанолі в мірній колбі місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину 96 % етанолом до мітки і перемішують. Розчин придатний протягом 1 місяця при зберіганні у добре закупореній тарі.

Кількісний вміст суми флавоноїдів у екстрактах обчислювали в перерахунку на гесперидин (для апельсинового і мандаринового) та нарингін (для грейпфрутового) за формулою:

$$X = \frac{A_x \times C_c}{A_c} \times W,$$

де X – кількісний вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гесперидин або нарингін, %;

A_x – оптична густина розчину досліджуваного екстракту;

C_c – концентрація розчину порівняння, %;

A_c – оптична густина розчину порівняння;

W – розведення досліджуваного екстракту.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Представлені в таблиці 1 дані свідчать про те, що обраний метод екстракції дозволяє отримати приблизно однакову кількість сухих речовин зі шкірки апельсина, грейпфрута й мандарина. При цьому сумарний вміст фенольних сполук (флавоноїдів та інших поліфенолів) в отриманих екстрактах істотно відрізнявся. Так, максимальну кількість цих речовин зареєстровано в грейпфрутовому екстракті (119,9 мг%), у мандариновому – в 1,7 раза менше, а в апельсиновому – в 2,6 раза менше, ніж в екстракті шкірки грейпфрута. Закономірність розподілу флавоноїдів у досліджуваних екстрактах була іншою і знижувалася в ряді мандариновий (61,3 мг%) > грейпфрутовий (31,9 мг%) > апельсиновий (21,9 мг%). Отримані дані свідчать про те, що практично всі фенольні сполуки мандаринового екстракту – флавоноїди. В екстракті апельсинової шкірки флавоноїди становлять приблизно половину фенольних речовин, а в екстракті грейпфрутової шкірки приблизно чверть фенольних речовин можна віднести до флавоноїдів.

На рисунку 1 представлені спектри поглинання комплексів БФ із хлоридом алюмінію апельсинового екстракту й стандартного зразка гесперидину. Як видно, спектр поглинання комплексу флавоноїду гесперидину із хлоридом алюмінію відповідав спектру апельсинового екстракту з максимумом при довжині хвилі 305,5 нм (табл. 1). Такий же характер мав спектр поглинання комплексу БФ із хлоридом алюмінію мандаринового екстракту з максимумом при довжині хвилі 306,5 нм (табл. 1 і рис. 2). Важливо підкреслити, що спектральний аналіз апельсинового й мандаринового екстрактів не виявив у них характерних піків комплексу рутину із хлоридом алюмінію.

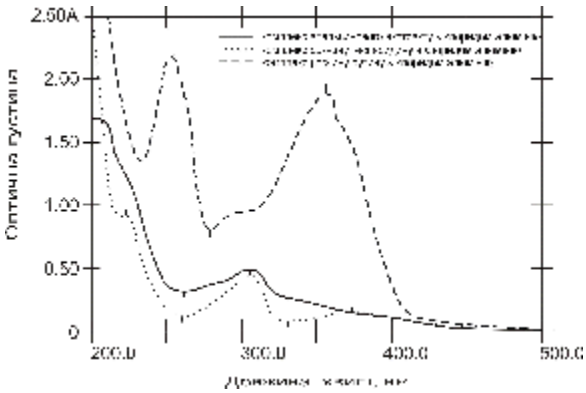


Рис. 1. Спектри поглинання комплексів досліджуваного апельсинового екстракту і стандартних зразків гесперидину та рутину з 5 % розчином хлориду алюмінію у 96 % етиловому спирті.

Спектр поглинання комплексів хлориду алюмінію з БФ грейпфрутового екстракту відповідав спектру комплексу з нарингіном (рис. 3) із трьома максимумами при довжинах хвиль 374,5-377,5, 306,5-307,5 і 220-221 нм (табл. 1). У грейпфрутовому екстракті також не виявлено спектра, характерного для комплексу рутину із хлоридом алюмінію.

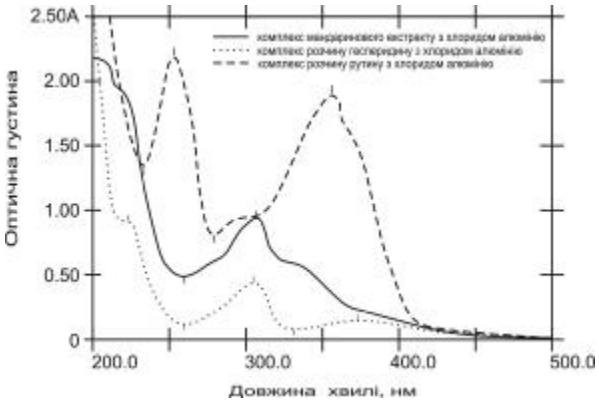


Рис. 2. Спектри поглинання комплексів досліджуваного мандаринового екстракту і стандартних зразків гесперидину та рутину з 5 % розчином хлориду алюмінію у 96 % етиловому спирті.

Таким чином, проведений нами спектрофотометричний аналіз підтверджував дані В.А. Тутельяна зі співавторами [7] про те, що

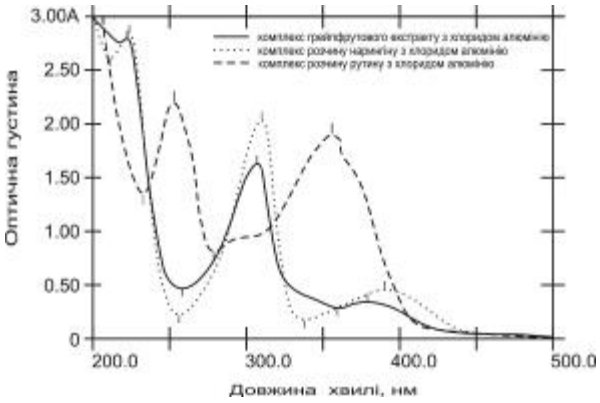


Рис. 3. Спектри поглинання комплексів досліджуваного грейпфрутового екстракту і стандартних зразків нарингіну та рутину з 5 % розчином хлориду алюмінію у 96 % етиловому спирті.

основними БФ шкірки апельсина є гесперитин і його глікозидна форма гесперидин. Наявність цих же БФ зареєстровано й у мандариновому екстракті. Але при цьому їх кількість була у 3 рази вищою, ніж в апельсиновому екстракті. Основними флавоноїдами грейпфрута є нарингенін і його глікозид нарингін. Проведені нами дослідження не встановили наявності в екстрактах апельсина, грейпфрута й мандарина рутину, що, можливо, пов'язано з дуже низькою концентрацією цього БФ у досліджуваних екстрактах. Відомо, що його вміст у десятки, а в окремих випадках навіть сотні, разів нижчий вмісту основних флавоноїдів цитрусових [7, 8].

Таблиця 1 – **Вміст сухих речовин, фенольних речовин, флавоноїдів і максимуми поглинання комплексів хлориду алюмінію із флавоноїдами екстрактів цитрусових**

Показники	Екстракти		
	апельсиновий	грейпфрутовий	мандариновий
Сухі речовини, %	1,61±0,12	1,92±0,23	1,40±0,09
Фенольні речовини, мг%	46,4±5,2	119,9±10,5	69,9±8,3
Флавоноїди, мг%	21,9±1,8	31,9±4,8	61,3±5,7
λ_{max} комплексу, нм	305,5	377,5 306,5 220,0	306,5

ВИСНОВКИ 1. Спектрофотометричний аналіз комплексів флавоноїдів із хлоридом алюмінію встановив, що основним флавоноїдом екстрактів шкірки апельсина й мандарина є гесперидин, а шкірки грейпфрута – нарингін.

2. Найбільшу кількість флавоноїдів зареєстровано в шкірці мандарина. Рівень флавоноїдів у екстракті грейпфрута у 2 рази, а в апельсиновому – в 3 рази нижчий, ніж в екстракті шкірки мандарина.

3. Спектрофотометричний аналіз комплексів флавоноїдів із хлоридом алюмінію є доступним, легко відтворюваним і експресним для ідентифікації препаратів рослинних екстрактів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд. доп. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.

2. Дудченко Л.Г., Кривенко В.В. Пищевые растения – целители. – К.: Наукова думка, 1988. – 272 с.

3. Ковальчук Т.В., Гудзенко А.В., Цуркан О.О. Кульбаба Лікарська (Taraxacum officinale): розробка методик аналізу флавоноїдів // Фітотерапія. Часопис. – 2006. – № 3. – С. 41-45.

4. Левицкий А.П. Биофлавоноиды как модуляторы эстрогенной и остеогенной активности // Вісник фармакології та фармації. – 2004. – № 2. – С. 2-4.

5. Лобанова А.А., Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия растительного сырья. – 2004. – № 1. – С. 47-52.

6. Рехлецька О.В., Калинюк Т.Г., Гудзь Н.І., Федущак Н.К. Кількісне визначення флавоноїдів у лосьйонах для лікування інфекційних захворювань шкіри // Мед. хімія. – 2007. – **9**, № 2. – С. 87-90.

7. Тутельян В.А., Батурин А.К., Мартинчик Э.А. Флавоноиды, содержание в пищевых продуктах, уровень потребления, биодоступность // Вопр. питания. – 2004. – **73**, № 6. – С. 43-48.

8. Формазюк В.И. Энциклопедия пищевых лекарственных растений. – К.: Изд-во А.С.К., 2003. – С. 178-185.

9. Чекман І.С., Завалько І.В. Флавоноїди: фармакотерапевтичний аспект // Фітотерапія. Часопис. – 2008. – № 1. – С. 3-11.

10. Andersen O.M., Markham K.R. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Application. – CRC Press, 2005. – 1256 p.

11. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. The effect of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer // Pharmacological Review. – 2000. – **52,** № 4. – P. 673-701.

12. Nadaromlu H., Demir Y., Demir N. Antioxidant and radical scavenging properties of Iris Germanica // Химико-фарм. журн. – 2007. – **41**, № 8. – С. 13-18.

ПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФЛАВОНОИДОВ ЦИТРУСОВЫХ

А.П. Левицкий, О.А. Макаренко, И.И. Крисюн
ГУ "ИНСТИТУТ СТОМАТОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ", ОДЕССА

Резюме

В работе проведен спектрофотометрический анализ комплексов хлорида алюминия с флавоноидами экстрактов кожуры апельсина, грейпфрута и мандарина. Показано, что основным флавоноидом кожуры апельсина и мандарина является гликозид гесперидин. В грейпфрутовом экстракте зарегистрировано наличие гликозида нарингина. Наиболее богатым источником флавоноидов является экстракт кожуры мандарина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **апельсин, грейпфрут, мандарин, флавоноиды, методы определения.**

SPECTROPHOTOMETRIC ANALYSIS OF CITRUS FLAVONOIDS

A.P. Levytsky, O.A. Makarenko, I.I. Krysyun
SE "INSTITUTE OF DENTISTRY OF AMS OF UKRAINE", ODESSA

Summary

Spectrophotometric analysis of flavonoid complexes with aluminium chloride in peel extracts of orange, grapefruit and mandarin has been carried out in this work. It has been shown that the basic flavonoid in orange and mandarin peel is glycoside hesperidinum. In grapefruit extract is registered the presence of glycoside naringine. The richest source of flavonoids is the extract of mandarin peel.

KEY WORDS: **orange, grapefruit, mandarin, flavonoids, methods of determination.**

Отримано 20.08.2008 р.

Адреса для листування: *О.А. Макаренко, ДУ "Інститут стоматології АМН України", вул. Рішельєвська, 11, Одеса, 65026, Україна.*

УДК 616-002:614.876

ВИЗНАЧЕННЯ ЕФЕКТИВНОЇ ДОЗИ І ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ХІНОЛІНФЛАГІНУ

М.Є. Березнякова, О.В. Погребняк
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

У роботі наведено визначення ефективної дози і гострої токсичності нового похідного хінолон-карбонових кислот, умовно названого хінолінфлагін. Ефективна доза хінолінфлагіну складає 17,6 мг/кг маси тіла. Середньолетальна його доза в експерименті на білих мишах при внутрішньочеревному введенні становить (2250±187,7) мг/кг. За класифікацією К.К. Сидорова, хінолінфлагін належить до відносно нешкідливих і практично нетоксичних речовин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **гостра токсичність, ефективна доза, хінолінфлагін, запалення.**

ВСТУП. Застосування протизапальних препаратів обмежується великою кількістю побічних ефектів (ураження ШКТ, печінки, нирок), тому важливою проблемою сучасної фармакології залишається створення нових, більш ефективних та нетоксичних лікарських засобів протизапальної дії [2, 4]. Проведений скринінг в ряді похідних хінолін-карбонових кислот дозволив відібрати для доклінічного дослідження субстанцію, яка проявила виражений протизапальний ефект [1].

Мета дослідження – визначення гострої токсичності та ефективної дози хінолінфлагіну, що проявляє протизапальну дію.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Середньосмертельну дозу хінолінфлагіну визначали на нелінійних білих мишах масою 20 г при внутрішньочеревному способі введення. Сполуку вводили в дозах 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 мг/кг. Середньосмертельну дозу хінолінфлагіну розраховували за методом Cr. Karber 3 [5]: $LD_{50} = LD_{100} - \Sigma(Zd) / n$, де LD_{100} – доза, яка викликала загибель усіх дослідних тварин; Z – середня величина між кількістю загиблих тварин, які проявили виразний антигіпоксичний ефект "сусідніх" груп; d – інтервал між дозами; n – кількість груп тварин у досліді.

Стандартну похибку середньої величини LD_{50} розраховували за формулою Геддама:

$$S_{LD_{50}} = \sqrt{\frac{K \cdot S \cdot d}{n}},$$

де K – константа, яка при розрахунках за методом Кербера дорівнює 0,564; S – стандарт розподілу, який визначають за графіком; n – кількість груп тварин у досліді.

Верхню та нижню довірчі межі LD_{50} хінолінфлагіну визначали за формулою: $x - t \cdot S_x$ та $x + t \cdot S_x$, де t – величина, що залежить від n і яку знаходять за таблицею (при f = n – 1, n = 6 і p = 0,05 t = 2,45).

Результати опрацьовували методами непараметричної статистики з використанням t-критерію Стьюдента [6].

Ефективну дозу визначали в досліді за методикою карагенінового набряку, запалення викликали субплантарним введенням в задню лапу 1 мл 1 % розчину хінолінфлагіну. Досліджувану сполуку в дозах 5, 7, 10, 15, 20 мг/кг вводили у вигляді водно-масляної суспензії (розчинник твін-80 та дистильована вода) за 1 год до ін'єкції карагеніну внутрішньочеревно. Протизапальну активність хінолінфлагіну визначали в групах (згідно з дозами) через 2 год. Процент пригніченості набряку вираховували за формулою:

$$\%інгібіції = \frac{M_0 \cdot 100\,\%}{Мк} - 100\,\%,$$

де M_0 – різниця маси інтактної лапи і лапи, в яку введено карагенін, у тварин, котрим вводили досліджувану сполуку; Мк – різниця маси інтактної лапи і лапи, в котру введено карагенін, у тварин контрольної групи.

При розрахунку ефективної дози використовували формулу: У = ах + в. Значення а і в знаходили з нормальної системи Гауса:

© М.Є. Березнякова, О.В. Погребняк, 2009.

$$a = \frac{Y_2 - Y_1}{x_2 - x_1};$$

$$в = \frac{\sum Y - a\sum x}{n}$$

Утримування мишей і всі маніпуляції над ними проводили згідно із загальними принципами Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для дослідних та інших наукових цілей, що схвалена на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2001), і вимогами Закону України № 3447IV від 21.02.2006 р. "Про захист тварин від жорстокого поводження".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При визначенні середньолетальної дози хінолінфлагіну за умов внутрішньочеревного введення нами встановлено, що максимальна толерантна доза досліджуваної субстанції дорівнює 2250 мг/кг (табл.1):

$$LD_{50} = LD_{100} - \frac{\sum(Zd)}{n} = 3500 - \frac{7500}{6} = 3500 - 1200 = 2250 мг/кг$$

Довірчі межі:

$$S_{LD_{50}} = \sqrt{\frac{0{,}564 \cdot 500 \cdot 750}{6}} = \pm 187{,}7 мг/кг$$

$$LD_{50} = 2250 \pm 187{,}7 мг/кг$$

2437,7 ÷ 2062,3

Ефективна доза хінолінфлагіну при внутрішньочеревному введенні мишам в досліді на моделі корагенінового набряку дорівнює [3]:

$$ED_{50} = \frac{50 - 3{,}1}{2{,}67} = \frac{46{,}9}{2{,}67} = 17{,}6 мг/кг$$ (табл. 2)

Таблиця 1 – **Визначення LD_{50} хінолінфлагіну за умов внутрішньочеревного введення**

	Досліджувані дози, мг/кг						
	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500
Вижило	6	6	5	4	2	1	0
Загинуло	0	0	1	2	4	5	6
Z	0	0,5	1,5	3	4,5	5,5	
d	500	500	500	500	500	500	
Zd	0	250	750	1500	2250	2750	
Σ(Zd)	7500						

Таблиця 2 – **Визначення ефективної дози хінолінфлагіну**

Доза, мг/кг	% протизапальної активності	$A \pm S_A$	p
5	1	53,0±1,57	p>0,05
7	20	42,7±1,79	p<0,05
10	32	36,7±3,90	p<0,05
15	16	45,8±2,25	p>0,05
20	0	54,3±3,44	p>0,05
Контроль	–	50,2±2,33	–

Примітка. n=6, p – відносно контролю.

Середня похибка (m) середньоефективної дози за Міляром-Тейнтером дорівнює:

$$m = \frac{2\sigma}{\sqrt{2N}},$$

де *N* – загальне число тварин у групах.

2σ =30,3– 4,8 = 25,5 мг/к

n = 5 • 6 = 30

$$m = \frac{25{,}5}{\sqrt{2 \cdot 30}} = \frac{25{,}5}{\sqrt{60}} = \frac{25{,}5}{7{,}7} \cdot = \pm 3{,}3$$

Довірчі межі ED_{50} знаходять при p = 0,05 для числа ступенів свободи: f = N – 1.

Для f = 30 – 1 = 29 при p = 0,05 табличне значення 2,045. Звідси випливає, що mt = 3,3·2,045 = 6,7.

Нижня довірча межа – 10,9 мг/кг, верхня – 24,3 мг/кг.

Визначений з графіка стандарт розподілення дорівнює:

$$S = \frac{LD_{84} - LD_{16}}{2} = \frac{3000 - 1500}{2} = \frac{1500}{2} = 750$$

(рис. 1).

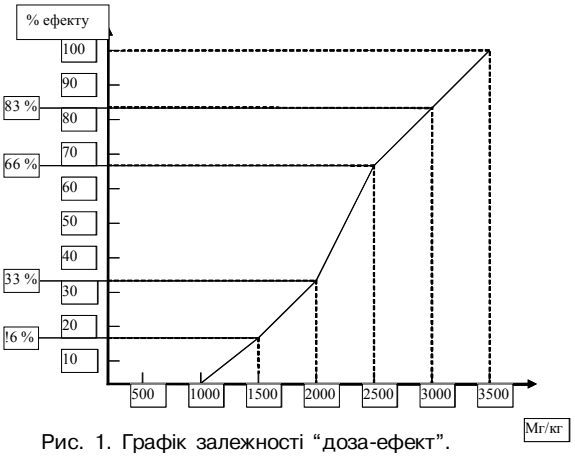


Рис. 1. Графік залежності "доза-ефект".

Аналізуючи отримані дані, треба відмітити, що досліджувана сполука хінолінфлагін в дослідах на білих мишах проявила себе як речовина VI класу токсичності за класифікацією К.К. Сидорова (практично не токсичний засіб) [7].

ВИСНОВКИ. 1. Ефективна доза хінолінфлагіну складає 17,6 мг/кг маси тіла.

2. Середньолетальна доза хінолінфлагіну в експерименті на білих мишах при внутрішньочеревному введенні становить 2250 мг/кг маси тіла.

ЛІТЕРАТУРА

1. Березовская И.В. Методология доклинического изучения безопасности дженериков // Человек и лекарство: Тез. докл. IX Рос. нац. конгр. – М., 2002. – С. 737.

2. Боренбойм Г.М., Маленков А.Г. Биологически активные вещества. Новые принципы поиска . – М.: Наука, 1986. – 363 с.

3. Гланц С.Н. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

4. Коваленко В.М., Стефанов О.В., Максимов Ю.М., Трахтенберг І.М. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів // Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – С. 74-97.

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

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

7. Сидоров К.К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения // Токсикология новых промышленных химических веществ. – М., 1973. – Вып. 13. – С. 47-51.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОЙ ДОЗЫ И ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ХИНОЛИНФЛАГИНА

М.Е. Березнякова, А.В. Погребняк
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

В работе представлено определение эффективной дозы и острой токсичности нового производного хинолон-карбоновых кислот, условно названного хинолинфлагин. Эффективная доза хинолинфлагина составляет 17,6 мг/кг массы тела. Среднесмертельная его доза в эксперименте на белых мышах при внутрибрюшном введении равна (2250±187,7) мг/кг. По классификации К.К. Сидорова, хинолинфлагин относится к относительно безопасным и практически нетоксичным веществам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **острая токсичность, эффективная доза, хинолинфлагин, воспаление.**

DEFINITION OF EFFECTIVE DOSE AND ACUTE TOXICITY OF HYNOLINFLAGIN

M.Ye. Bereznyakova, O.V. Pohrebnyak
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

The work contains the definition of the effective dose and acute toxicity of the new derivative of the quinolone-carboxylic acids, conditionally named hynolinflagin. Effective dose of hynolinflagin is to 17,6 mg/kg of body weight. Middle-mortal dose of hynolinflagin for white mice at intraperitoneal introduction is (2250±187,7) mg/kg. According to K.K. Sidorov's classification hynolinflagin belongs to safe and practically nontoxic substances.

KEY WORDS: **acute toxicity, effective dose, hynolinflagin, inflammation.**

Отримано 29.12.2008 р.

Адреса для листування: *М.Є. Березнякова, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, Харків, 61002, Україна.*

УДК 612.82:612.017.2

РОЛЬ ЦЕНТРАЛЬНИХ АДРЕНОРЕАКТИВНИХ СТРУКТУР В КОНТРОЛІ ЦИРКАДІАННОГО РИТМУ

І.Г. Кушнір, Г.І. Кокощук
ЧЕРНІВЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ЮРІЯ ФЕДЬКОВИЧА

В експериментах на щурах блокада зворотного захоплення катехоламінів пресинаптичною мембраною під впливом саротену (амітриптиліну) приводила до депресії параметрів екскреторної функції нирок як в денні, так і в нічні години. Катехоламіни розглядають як один з факторів регуляції циркадіанних ритмів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **циркадіанний ритм, саротен (амітриптилін).**

ВСТУП. Виняткову роль супрахіазматичних ядер гіпоталамуса та епіфіза в реалізації циркадіанного ритму у ссавців і людини в останнє десятиріччя доведено беззаперечно [5, 12, 17]. Разом із тим, більшість експериментальних досліджень проведено на тваринах, які ведуть активний нічний спосіб життя. Зважаючи на те, що біосинтез мелатоніну епіфізом здійснюється в темнову фазу [13, 14], виникли проблеми з екстраполяцією цих даних на інших тварин і людину [8, 9, 15]. Вихід з даної ситуації було знайдено в результаті виявлення електрофізіологічних і нейрохімічних особливостей нейронального складу супрахіазматичних ядер (СХЯ) [7, 10, 18]. Серед нейронів СХЯ виявлено нейрони, що синтезують дофамін, серотонін, катехоламіни, гамма-аміномасляну кислоту, холецистокінін та інші нейротрансмітери, рівень яких зазнавав суттєвих коливань впродовж доби. Зокрема встановлено, що рівень норадреналіну, дофаміну і серотоніну в структурах мозку досягав акрофази в денні години [4, 6, 11, 16]. У зв'язку з цим дані про те, що екскреторна функція нирок має явний циркадіанний характер (чітке зростання показників діурезу, кислих валентностей в нічні години і достовірне зменшення даних параметрів у денні години), можна було б пояснити змінами рівня норадреналіну, дофаміну та серотоніну в нейронах гіпоталамуса в денні години. Раніше нами показано, що тривале, впродовж 7 днів, утримання щурів за умов постійного освітлення викликало депресію показників екскреторної функції нирок [2].

З метою перевірки запропонованої робочої гіпотези проведено досліди на білих щурах, у яких підвищували рівень ендогенних катехоламінів у мозку в результаті введення саротену, блокатора пресинаптичних рецепторів зворотного захоплення катехоламінів. Досліди виконували як в денні години, коли рівень катехоламінів у нейронах був збільшеним, так і в нічні години, коли вміст даних біоамінів знижувався.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди було проведено на 30 білих щурах лінії Вістар масою 120-150 г, яких утримували у спеціальних обмінних клітках у режимі з вільним доступом до їжі (зерно пшениці) та пиття (1 % розчин натрію хлориду на водопровідній воді для компенсації низьконатрієвого раціону). Перед початком експерименту тварин адаптовували до даних умов існування впродовж 10 днів.

У день експерименту в щурів збирали спонтанний діурез впродовж 3 год в середині дня (з 11^{00} до 14^{00}) і ночі (з 23^{00} до 2^{00}). В сечі піддослідних тварин визначали концентрацію ендогенного креатиніну як міру гломерулярної фільтрації, колометрично з пікриновою кислотою за Фоліним в модифікації З. Віктора [1]. Екскрецію титрованих кислот і амонію визначали шляхом титрування проб сечі 0,01 Н розчином NaOH за присутності розчину 0,1 % фенолфталеїну [3]. Саротен (Амітриптилін) – фірма "Lundbeck Export A/S Denmark" – вводили о 9^{00} і 21^{00} внутрішньоочеревинно в дозі 2 мг/кг.

Піддослідних щурів поділили на чотири групи: 1-ша і 3-тя – інтактні тварини, яким о 9^{00} і 21^{00} внутрішньоочеревинно вводили 0,85 % розчин натрію хлориду в об'ємі 0,5 мл на 100 г маси; тварини 2-ї і 4-ї груп отримували внутрішньоочеревинно о 9^{00} і 21^{00} амітриптилін у такому ж, як у контролі, об'ємі.

Цифровий матеріал проаналізовано з використанням комп'ютерної програми "Statistica

© І.Г. Кушнір, Г.І. Кокощук, 2009.

for Windows", "Version-5.0" з визначенням критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дані про характер циркадіанного ритму екскреторної функції нирок у білих щурів до та після введення саротену наведено в таблиці 1. Видно, що в інтактних тварин в нічні години має місце статистично значуще підвищення діурезу і виведення кислих валентностей у складі кислих фосфатів та амонію. Блокада рецепторів зворотного захоплення катехоламінів у синапсах гіпоталамічних ядер як у денні, так і в нічні години приводить до достовірного зниження показників екскреторної функції нирок. Разом із тим, ефективність нефротонної дії саротену

Таблиця 1 – **Вплив саротену на циркадіанний ритм екскреторної функції нирок білих щурів (M±m)**

Досліджувані показники в розрахунку на 1 год.		Характер експерименту			
		дослідження в денний період (11^{00}-14^{00})		дослідження в нічний період (23^{00}-2^{00})	
		інтактні тварини	введення саротену	інтактні тварини	введення саротену
		1-ша група	2-га група	3-тя група	4-та група
Діурез, мл		0,45±0,04	0,25±0,01 p_2<0,01	0,95±0,08 p_1<0,01	0,53±0,03 p_3<0,05
Екскреція	Ендогенного креатиніну, мкмоль	1,67±0,16	1,17±0,14	1,70±0,07	1,76±0,11
	Титрованих кислот, мкмоль	52,1±5,5	16,5±2,8 p_2<0,01	64,2±3,0 p_1=0,05	33,7±3,4 p_3<0,01
	Амонію, мкмоль	125,7±12,9	49,1±3,8 p_2<0,01	194,1±10,1 p_1<0,05	100,4±6,2 p_3<0,01
Число спостережень (n)		15	15	15	12

Примітка. Тут і в наступній таблиці: p_1 – порівняння між тваринами 1-ї і 2-ї груп; p_2 – між тваринами 1-ї і 3-ї груп; p_3 – між тваринами 2-ї і 4-ї груп.

в нічні години менша, ніж у денні. Це дозволяє зробити висновок, що в денні години відбувається сумація високого ендогенного рівня катехоламінів і стимульованого збільшення його вмісту під впливом амітриптиліну. В нічні години, найімовірніше, спрацьовують не стільки механізми зниження базального рівня катехоламінів, скільки поява додаткових нейрогуморальних факторів регуляції циркадіанного ритму, які стимулюють функціональну активність нефрону. Як відомо, амітриптилін, крім блокади зворотного захоплення катехоламінів пресинаптичною мембраною, може також підвищувати рівень серотоніну, блокувати периферійні М-холінорецептори і приводити до потенціювання периферійних β-адренорецепторів та, як результат, суттєво змінювати нирковий кровотік.

З метою отримання відповіді на питання про роль змін внутрішньониркової гемодинаміки в реалізації циркадіанного ритму функціонального стану нефрону визначали показники екскреторної функції нирок в розрахунку на 1 мкмоль ендогенного креатиніну як міру швидкості клубочкової фільтрації (табл. 2). Виявлено, що як у денні, так і, особливо, в нічні

Таблиця 2 – **Параметри циркадіанного ритму екскреторної функції нирок білих щурів у розрахунку на 1 мкмоль креатиніну під впливом саротену (M±m)**

Досліджувані показники в розрахунку на 1 год.		Характер експерименту			
		дослідження в денний період (11^{00}-14^{00})		дослідження в нічний період (23^{00}-2^{00})	
		інтактні тварини	введення саротену	інтактні тварини	введення саротену
		1-ша група	2-га група	3-тя група	4-та група
Діурез, мл		0,28 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,55 ± 0,04 p_1< 0,01	0,30 ± 0,01 p_3< 0,01
Екскреція	Титрованих кислот, мкмоль	31,0 ± 1,0	13,1 ± 0,9 p_2< 0,01	39,0 ± 3,0 p_1< 0,01	18,7 ± 1,0 p_3<0,01
	Амонію, мкмоль	46,5 ± 3,7	44,9 ± 2,0 p_2< 0,01	115,2 ± 6,1 p_1< 0,01	57,4 ± 1,2 p_3< 0,01
Число спостережень (n)		15	15	15	12

години амітриптилін згладжує циркадіанний ритм екскреторної функції нирок, вказуючи на важливу роль біоамінів у механізмах реалізації циркадіанного ритму.

ВИСНОВКИ. 1. Блокада амітриптиліном пресинаптичних рецепторів зворотного захоплення катехоламінів викликає у щурів як у світлову, так і в темнову фазу добового циклу депресію показників екскреторної функції нирок.

2. Підвищення рівня катехоламінів у структурах мозку не запобігає розвитку характерного, як і в інтактних тварин, циркадіанного ритму функціонального стану нирок.

ЛІТЕРАТУРА

1. Виктор З. Клиническая нефрология. – Варшава: ПГМИ, 1968. – 344 с.

2. Кокощук Г.І., Кушнір І.Г. Вплив постійного освітлення на циркадіанний ритм екскреторної діяльності нирки білих щурів // Доповіді Національної АН України. – 2005. – № 3. – С. 186-188.

3. Рябов С.И., Наточин Ю.В., Бондаренко Б.Б. Диагностика болезней почек. – Л.: Медицина, 1979. – 255 с.

4. Agren H. Circadian covariation of norepinephrine and serotonin in the locus coeruleus and dorsal raphe nucleus in the rat // Brain Res. – 1986. – № 12. – 397 (2). – P. 353-358.

5. Antle M.C., Silver R. Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock // Trends Neurosci. – 2005. – 28 (3). – P. 145-151.

6. Bhaskaran D., Radha E. Circadian variations in the monoamine levels and monoamine oxidase activity in different regions of the rat as a function of age // Exp. Gerontol. – 1984. – 19 (3). – P. 153-170.

7. Buijs R.M., Kalsbeek A. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks // Nature Reviews Neuroscince. – 2001. – **2**. – P. 521-526.

8. Challet E. Minireview: Entrainment of the Suprachiasmatic Clockwork in Diurnal and Nocturnal Mammals // Endocrinology. – 2007. – **148**, № 12. – P. 5648-5655.

9. Glossop N.R., Hardin P.E. Central and peripheral circadian oscillator mechanisms in flies and mammals // Journal of Cell Science. – 2002. – **115**. – P. 3369-3377.

10. Guo H. Differential control of peripheral circadian rhythms by suprachiasmatic-dependent neural signals // PNAS. – 2005. – 102, № 8. – P. 3111-3116.

11. Kafka M.S. Circadian rhythms in neurotransmitter receptors in discrete rat brain regions // J. Chronobiol. Int. – 1986. – 3 (2). – P. 91-100.

12. Kalsbeek A. SCN outputs and the hypothalamic balance of life // J. Biol. Rhythms. – 2006. – 21 (6). – P. 458-469.

13. Klein D.C., Weller J.L., Moore R.Y. Melatonin Metabolism: Neural Regulation of Pineal Serotonin: Acetyl Coenzyme A N-acetyltransferase Activity // PNAS. – 1971. – **68**, № 12. – P. 3107-3110.

14. Moore R.Y. Neural control of the pineal gland // Behav. Brain Res. – 1996. – 73 (1-2). – P. 125-130.

15. Schaap Heterogeneity of rhythmic suprachiasmatic nucleus neurons: Implications for circadian waveform and photoperiodic encoding // PNAS. – 2003. – **100**. – P. 15994-15999.

16. Simon M.L., George R. Diurnal variation in plasma corticosterone and growth hormone as correlated with regional variations in norepinephrine, dopamine and serotonin content of rat brain // Neuroendocrinology. – 1975. – 17 (2). – P. 125-138.

17. Stratmann M. Properties, Entrainment, and Physiological Functions of Mammalian Peripheral Oscillators // Journal of Biological Rhythms. – 2006. – **21**, № 6. – P. 494-506.

18. Weaver D.R. The Suprachiasmatic Nucleus: A 25-Year Retrospective // Journal of Biological Rhythms. – 1998. – **13**, № 2. – P. 100-112.

РОЛЬ ЦЕНТРАЛЬНЫХ АДРЕНОРЕАКТИВНЫХ СТРУКТУР В КОНТРОЛЕ ЦИРКАДИАННОГО РИТМА

И.Г. Кушнир, Г.И. Кокощук

ЧЕРНОВИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ЮРИЯ ФЕДЬКОВИЧА

Резюме

В экспериментах на крысах блокада обратного захвата катехоламинов пресинаптической мембраной под влиянием саротена (амитриптилина) приводила к депрессии параметров экскреторной функции почек как в

дневное, так и в ночное время. Катехоламины рассматривают как один из факторов регуляции циркадианных ритмов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **циркадианный ритм, саротен (амитриптилин).**

ROLE OF ADRENOREACTIVE STRUCTURES IN CONTROL OF CIRCADIAN RHYTHM

I.H. Kushnir, H.I. Kokoshchuk
CHERNIVTSI NATIONAL UNIVERSITY BY YURIY FEDKOVYCH

Summary

In experiments on rats was demonstrated that the blockade of central adrenoreceptors by saroten (amitriptiline) resulted in the depression of excretory function of the kidneys both during the day and at night. Catecholamines are considered as one of the factors of regulation of circadian rhythm.

KEY WORDS: **circadian rhythm, saroten (amitriptiline).**

Отримано 25.11.2008 р.

Адреса для листування: *Г.І. Кокощук, вул. Комарова, 40, кв. 128, Чернівці, 58013, Україна.*

УДК 618.146-007.17-097-616 -006.52-022.7]-08

ВИВЧЕННЯ ПОКАЗНИКІВ ІМУНІТЕТУ В ЖІНОК З ДИСПЛАЗІЄЮ ШИЙКИ МАТКИ НА ТЛІ ПАПІЛОМАВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ ТА ЙОГО КОРЕКЦІЯ ЗА ДОПОМОГОЮ КОМПЛЕКСНОЇ ТЕРАПІЇ

С.В. Хміль, Л.Р. Федорейко
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Проаналізовано зміни показників імунітету в жінок з дисплазією шийки матки при папіломавірусній інфекції. Доведено високу ефективність лікування дисплазії шийки матки на тлі папіломавірусної інфекції за допомогою комплексної терапії, що включає протефлазид, лаферон та радіохірургічне лікування з використанням апарата "Сургітрон".

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **папіломавірусна інфекція, імунна система, протефлазид, лаферон.**

ВСТУП. Папіломавірусна інфекція людини є однією з найпоширеніших серед групи захворювань, що передаються статевим шляхом [7, 14, 17]. Основними її клінічними проявами є аногенітальні бородавки та ураження шийки матки, які спричиняють як фізичний, так і психологічний та сексуальний дискомфорт [2, 15]. Крім того, актуальність даної патології зумовлена тим, що вона входить до групи захворювань СНІД-асоційованого симптомокомплексу [11], що потребує особливої уваги до пацієнта [1], а також відомою онкогенністю вірусів штамів 16 та 18, які є причиною значної частини злоякісних уражень шийки матки [4, 18, 19].

Не викликає сумніву необхідність лікування папіломавірусних уражень, що дозволить підвищити якість життя пацієнта та запобігти розвитку злоякісних новоутворень, проте і сьогодні ця проблема є невирішеною. Жоден із сучасних методів не призводить до повного вилікування та не гарантує відсутності рецидивів [12, 13]. Більшість застосовуваних методів є місцевими, тобто швидше протикондиломними, аніж противірусними [20], і спрямовані на ліквідацію зовнішніх проявів, а не на патогенетичні механізми захворювання. Крім недостатнього ефекту (а частота рецидивів сягає 20-30 %), вони супроводжуються місцевими реакціями, що спричиняють значний дискомфорт – свербіння, печію, біль, ерозії тощо [3, 5].

З іншого боку, системну реакцію організму на вірус папіломи людини, що проявляється перш за все змінами з боку імунної системи, вивчено недостатньо. Окремі повідомлення є суперечливими [8], і практично немає даних про динаміку наявних змін під впливом лікування. Водночас саме неадекватна реакція імунної системи може бути причиною затяжного перебігу та рецидивів багатьох захворювань, а вплив на неї опосередковано сприятиме поліпшенню загального стану пацієнта і зменшенню місцевих проявів [9]. Ось чому наше дослідження присвячене вивченню стану імунної системи при папіломавірусній інфекції та ефективності лікувальної схеми, що поєднує як місцеві, так і загальні засоби впливу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Було обстежено 126 жінок, 30 з яких – здорові (сформували контрольну групу), а решта 96 – з дисплазією шийки матки на тлі папіломавірусної інфекції генітальної локалізації. Усім проводили визначення показників загального імунітету – В- і Т-лімфоцитів та їх фракцій, імуноглобулінів. Лімфоцити виділяли методом Бейюма з фіколверографіновою сумішшю. Для їх визначення використовували реакцію непрямої поверхневої імунофлуоресценції за допомогою моноклональних антитіл МКА ІКО (ІКО-90 проти антигену СД-3 Т-клітин периферійної крові, МКА ІКО-86 проти антигену СД-4, який наявний на субпопуляції Т-клітин із хелперною функцією, МКА ІКО-31 проти антигену СД-8, що присутній на субпопуляції Т-клітин із супресорною функцією, МКА ІКО-12 проти антигену СД-22 на клітинній поверхні В-лімфоцитів), виготовлених НДІ мікробіології і епідеміології (м. Нижній Новгород).

© С.В. Хміль, Л.Р. Федорейко, 2009.

Для діагностики дисплазії та папіломавірусної інфекції використовували кольпоскопічне дослідження, біопсію з гістологічним дослідженням та полімеразну ланцюгову реакцію.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При аналізі отриманих даних у пацієнтів з дисплазією шийки матки на тлі папіломавірусної інфекції було виявлено ознаки пригнічення імунної системи, переважно за рахунок ураження клітинної ланки імунітету (табл. 1).

Як видно з даних таблиці, спостерігалось достовірне зниження загальної кількості лімфоцитів, а при аналізі їх субкласів було виявлено, що причиною цього є зменшення кількості CD4-клітин, тоді як зменшення CD8-клітин було недостовірним. Порушення хелперної функції проявлялось і зниженням імунорегуляторного індексу, яке, проте, було незначним.

Показники гуморального імунітету свідчили про його активацію, оскільки збільшувалась кількість CD72-клітин та імуноглобулінів

Таблиця 1 – **Показники імунної системи у жінок з дисплазією шийки матки на тлі папіломавірусної інфекції**

Показник	Контрольна група (n=30)	Дослідна група (n=96)
CD3, %	52,5±1,34	48,06±0,44*
CD4, %	35,71±0,89	32,41±0,28*
CD8, %	16,79±0,71	15,65±0,22
CD72, %	8,6±0,25	9,42±0,19*
CD4/CD8	2,12±0,32	2,07±0,25
Ig G, г/л	9,18±0,89	12,11±0,18*
Ig A, г/л	1,57±0,16	1,9±0,08
Ig M, г/л	2,89±0,36	3,51±0,13

Примітка. * – різниця між показниками достовірна, p<0,05.

усіх класів. Найсуттєвіше підвищувався рівень Ig G, інші типи імуноглобулінів зросли незначно.

Залежно від проведеного лікування пацієнтів було поділено на 3 групи: хворі 1-ї групи отримували лише місцеве лікування за допомогою радіохірургічного апарата "Сургітрон" (29 осіб); 2-ї – "Сургітрон" і протефлазид (32 особи); 3-ї – "Сургітрон", протефлазид і лаферон (35 осіб).

Препарат "Протефлазид" призначали одночасно зовнішньо та всередину в краплях за відповідною схемою. У 20 мл ізотонічного розчину натрію хлориду розводили 2 мл протефлазиду, після чого на папіломи накладали примочки, а в піхву вводили просочений препаратом тампон 2-3 рази на добу протягом 20 днів. Одночасно із зовнішнім застосуванням препарат "Протефлазид" призначали всередину в краплях, по 10 крапель тричі на добу впродовж 30 днів.

Препарат "Лаферон" використовували місцево, для обколювання шийки матки, 2 рази на тиждень по 3 млн ОД, на курс – 10 процедур. Видаляли папіломи та проводили

Таблиця 2 – **Вплив різних схем лікування на показники у жінок з дисплазією шийки матки на тлі папіломавірусної інфекції**

Показник	Контрольна група (n=30)	До лікування (n=96)	Після лікування		
			1-ша група (n=29)	2-га група (n=32)	3-тя група (n=35)
CD3, %	52,5±1,34	48,06±0,44*	49,12±1,22	50,11±1,18	51,78±1,14**
CD4, %	35,71±0,89	32,41±0,28*	32,89±0,78*	33,54±0,68	34,87±0,62**
CD8, %	16,79±0,71	15,65±0,22	16,23±0,65	16,57±0,61	16,91±79
CD72, %	8,6±0,25	9,42±0,19*	9,11±0,65	8,99±0,59	8,69±0,41
CD4/CD8	2,12±0,82	2,07±0,25	2,03±0,12	2,02±0,11	2,06±0,09
Ig G, г/л	9,18±0,89	12,11±0,18*	11,54±0,56*	10,87±0,49**	9,54±0,47**
Ig A, г/л	1,57±0,16	1,9±0,08	1,81±0,09	1,74±0,08	1,63±0,07**
Ig M, г/л	2,89±0,36	3,51±0,13	3,34±0,28	3,09±0,21	3,04±0,14**

Примітка. * – різниця з контролем достовірна, p<0,05;
** – різниця з показниками до лікування достовірна, p<0,05.

конізацію шийки матки за допомогою радіохірургічного апарата "Сургітрон".

Клінічна ефективність лікування папіломавірусної інфекції становила 68,96 % у 1-й групі (20 осіб), дещо більше у 2-й – 78,12 % (25 осіб), була найвищою у 3-й групі, де сягала 94,29 % (33 особи).

Що стосується параметрів імунної системи, то позитивні зміни були аналогічними (табл. 2). Так, у 1-й групі пацієнтів, які отримували лише місцеве лікування, динаміка показників була незначною, а виявлені зміни – статистично недостовірними, хоча загальна кількість Т-клітин (CD3) наближалась до показників контролю.

Зміни у 2-й групі були більш вираженими, особливо стосовно гуморального імунітету. Так, спостерігалось достовірне зниження рівня Ig G порівняно з показниками до лікування, а решта показників суттєво не відрізнялись від контрольних.

Найкращим був ефект лікування у 3-й групі, де суттєво змінились усі головні параметри імунітету, як клітинного, так і гуморального.

Так, зріс вміст CD3- та CD4-клітин, зменшився – всіх класів імуноглобулінів. Усі параметри не відрізнялись від таких у контрольній групі.

Наші дані показують, що лише застосування противірусних препаратів дозволяє вплинути на патогенетичні механізми захворювання, що водночас забезпечує і вищий клінічний ефект. Місцеве ж лікування не впливає на систему імунітету і зумовлює тільки зменшення місцевих проявів.

ВИСНОВКИ. 1. Дисплазія шийки матки на тлі папіломавірусної інфекції супроводжується змінами з боку імунної системи, що характеризуються пригніченням клітинної ланки та активацією гуморальної.

2. Застосування місцевого лікування за допомогою апарата "Сургітрон" для конізації шийки матки та видалення папілом не впливає на параметри системного імунітету.

3. Для лікування дисплазії шийки матки на тлі папіломавірусної інфекції рекомендовано поєднане застосування радіохірургічного апарата "Сургітрон", протефлазиду (місцево та всередину в краплях, по 10 крапель тричі на добу впродовж 30 днів) і лаферону для обколювання шийки матки, 2 рази на тиждень, по 3 млн ОД, на курс – 10 процедур.

ЛІТЕРАТУРА

1. ван Крог Г., Лейси С.Дж.Н., Гросс Г. и др. Европейский курс по заболеваниям, ассоциированным с ВПЧ: рекомендации для врачей общей практики по диагностике и лечению аногенитальных бородавок // ИППП.– 2001.– № 1.– С. 5-13.

2. Голованова В.А., Новик В.И., Гуркин Ю.А. Частота и факторы риска папилломавирусной инфекции и дисплазии эпителия у сексуально активных девушек-подростков // Вопросы онкологии. – 1999. – **45**, № 6. – С. 623-626.

3. Дубенский В.В. Клинико-эпидемиологические особенности папилломавирусной инфекции и методы лечения // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2001. – № 1. – С. 51-56.

4. Ежева Л.С. Папилломавирусная инфекция гениталий. Морфологические особенности. Заболевания шейки матки, влагалища и вульвы: Клин. лекции / Под ред. В.Н. Прилепской. – М., 1999. – С. 254-258.

5. Запорожан В.М., Рожковская Н.М., Шевчук О.В. Генітальна папіломавірусна інфекція у жінок // ПАГ. – 2000. – № 6. – С. 119-122.

6. Иванова И.М., Лищук В.Д., Исакова Л.И. Комплексная терапия субклинических проявлений папилломавирусной инфекции у женщин с патологией шейки матки // Журн. акушерства и женских болезней: Спец. выпуск. – 1998. – С. 50-60.

7. Козлова В.И., Пухнер А.Ф. Вирусные, хламидийные и микоплазменные заболевания гениталий. – М.: Авиценна,1995. – 315 с.

8. Лакатош В.П., Лазаренко Л.М., Спивак М.Я. та ін. Визначення стану показників клітинного імунітету при папіломавірусній інфекції статевих органів жінок // Лік. справа. – 1999. – № 4. – С. 98-102.

9. Манухин И.Б., Минкина Г.Н., Пинегин Б.В. и др. Иммунотерапия папилломавирусной инфекции шейки матки // Акушерство и гинекология. – 1998. – № 3. – С. 24-26.

10. Поляков С.М., Левин Л.Ф., Шебеко Н.Г. Злокачественные новообразования в Беларуси 1996-2005 / Под ред. А.А. Граковича, И.В. Залуцкого. – Минск, 2006.

11. Arany I., Yen A., Tyring S.K. WAF1, CIP1 and mdm2 expression in skin lesions associated with human papillomavirus and human immunodeficiency virus // Anticancer Research. – 1997. – **17**. – P. 1281-1285.

12. Baker G.E., Tyring S.K. Infectious diseases in dermatology. Therapeutic approaches to papillomavirus infections // Dermatological Clinics. – 1997. – **15**, № 2. – P. 331-339.

13. Bashi S.A. Cryotherapy versus podophyllin in the treatment of genital warts // Int. J. Dermatol. – 1985. – **24**.– P. 535-536.

14. Campion M.J., Greenberg M.J., Kazamel T.I.Z. Human papillomavirus II. Clinical manifestations and natural history of genital human papillomavirus infections // Obstetrics and Gynecology Clinics. – 1996. – **23**, № 4. – P. 783-1098.

15. Conaglen H.M., Hughes R., Conaglen J. V., Morgan J. A prospective study of the psychological impact

on patients of first diagnosis of human papillomavirus // Int. J. STD AIDS. – 2001. – **12**, № 10. – P. 651-658.

16. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. IARC CancerBase N 5, verson 2.0. – IARC Press. 2004.

17. Greenberg M.J., Rutledge L.H. Understanding human papillomaviral infection in women // Semin. Dermatol. – 1992. – № 11. – P. 241-246.

18. Ji H.X., Chang E.Y., Lin K.Y. et al. Antigen-specific immunotherapy for murine lung metastatic tumors expressing human papillomavirus type 16 e7 oncoprotein // International Journal of Cancer. – 1998. – **78**, № 1. – P. 41-45.

19. Ramoz N., Rueda L.A., Bouadjar B. et al. A susceptibility locus for epidermodysplasia verruciformis, an abnormal predisposition to infection with the oncogenic human papillomavirus type 5, maps to chromosome 17qter in a region containing a psoriasis locus // Journal of Investigative Dermatology. – 1999. – **5**. – P. 2931-2940.

20. Zimet G.D., Mays R.M., Winston Y. et al. Acceptability of human papillomavirus immunization // J. Womens Health Gend. Based Med. – 2000. – **9**, № 1. – P. 47-50.

ИЗУЧЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНИТЕТА У ЖЕНЩИН С ДИСПЛАЗИЕЙ ШЕЙКИ МАТКИ НА ФОНЕ ПАПИЛЛОМАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ С ПОМОЩЬЮ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ

С.В. Хмиль, Л.Р. Федорейко

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

Проанализировано изменения показателей иммунитета у женщин с дисплазией шейки матки при папилломавирусной инфекции. Доказана высокая эффективность лечения дисплазии шейки матки на фоне папилломавирусной инфекции с помощью комплексной терапии, включающей протефлазид, лаферон и радиохирургическое лечение с использованием аппарата "Сургитрон".

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **папилломавирусная инфекция, имунная система, протефлазид, лаферон.**

LEARNING OF IMMUNE STATUS IN WOMEN WITH CERVICAL DYSPLASIA AGAINST A BACKGROUND OF PAPILLOMAVIRAL INFECTION AND ITS CORRECTION BY COMPLEX TREATMENT

S.V. Khmil, L.R. Fedoreyko

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

Changes of immune status of the women with cervical dysplasia at papillomaviral infection were analyzed. High efficiency of complex treatment, which includes proteflasid, laferon and radiosurgical therapy by "Surgitron" was proved.

KEY WORDS: **papillomavirus infection, immune system, proteflasid, laferon.**

Отримано 25.02.2009 р.

Адреса для листування: *С.В. Хміль, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, м. Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна.*

УДК 577.15:616.612-002:616-091.8

ВИЗНАЧЕННЯ АКТИВНОСТІ СУКЦИНАТДЕГІДРОГЕНАЗИ І Na^+,K^+-АТФ-АЗИ У ЗВИТИХ КАНАЛЬЦЯХ НЕФРОНУ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ КАРБОРЕНУ

О.І. Набока, А.І. Березнякова
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

У роботі представлено результати вивчення активності Na^+,K^+-АТФ-ази і сукцинатдегідрогенази (СДГ) у звитих канальцях нефрону за умов введення карборену. Доведено, що введення карборену в дозі 10,7 мг/кг призводить до зниження активності Na^+,K^+-АТФ-ази і СДГ в дистальному і проксимальному (менш вираженому) канальцях нефрону, що супроводжувалось зменшенням реабсорбції іонів натрію і води.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **карборен, Na^+,K^+-АТФ-аза, сукцинатдегідрогеназа, канальці нефрону.**

ВСТУП. На сьогодні відома велика кількість фахових видань, які свідчать про провідну роль Na^+,K^+-АТФ-ази при патологічних станах, які супроводжуються набряками [1]. В організмі людини активність її найвища в нервовій тканині та секреторних і екскреторних органах, до яких належать нирки. Na^+,K^+-АТФ-аза локалізована в плазматичних мембранах клітин і служить маркером цих мембран [2]. Важливою функцією натрієвого насоса є захист клітин від осмотичного набухання: викидає з клітини надлишок гідрофільного натрію і затримує гідрофобний калій [4]. Регулюється активність Na^+,K^+-АТФ-ази за допомогою інгібіторів і активаторів. Усі речовини, які впливають на активність Na^+,K^+-АТФ-ази, змінюють натрій-калієвий градієнт на мембрані, її електричний заряд і вторинний активний транспорт [5, 9]. Таким чином, аденозинтрифосфатази відіграють центральну роль в обміні речовин у клітині. Хімічна енергія, яка вивільняється при розщепленні пірофосфатного зв'язку, використовується в різних процесах у клітині. Крім того, в клітинах існують численні ізоферменти Na^+,K^+-АТФ-ази з різними pH-оптимумами. Їх гістохімічне виявлення можливе лише шляхом проведення реакції при різних значеннях pH. Гістохімічне виявлення Na^+,K^+-АТФ-ази базується на принципі Гоморі й Такамасу [6].

Поряд із цим, до найбільш розповсюджених ферментів відносять сукцинатдегідрогеназу (СДГ), яка є одним із центральних ферментів циклу трикарбонових кислот Кребса, і від її активності залежить енергозабезпечення клітин [8, 12]. Про високу інтенсивність окиснювальних процесів у нирках свідчить значна їх здатність поглинати кисень (до 10 % усього кисню, необхідного організмові). В них інтенсивно відбуваються гліколіз, кетоліз, аеробне окиснення і фосфорилювання, що зумовлює найефективніше використання енергії та утворення найбільшої кількості АТФ. При цьому в кірковій речовині нирок домінує аеробний тип обміну, а в мозковій – анаеробний [11].

У зв'язку з наведеним вище, в наступній серії експериментів ми проводили визначення активності ферментів СДГ і Na^+,K^+-АТФ-ази у звитих канальцях нефрону з метою встановлення локалізації діуретичного ефекту карборену.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди виконано на білих нелінійних щурах різної статі масою 280,0-300,0 г. Хлористий амоній тваринам вводили внутрішньоочеревинно у вигляді 6 % розчину з розрахунку 0,7-0,75 мл/100 г маси тіла. Карборен щури отримували всередину за 20 год до викликання набряку в дозі 10,7 мг/кг маси тіла. Експеримент проведено на 3-х групах тварин: 1-ша – інтактний контроль, 2-га – щури, яким вводили карборен у дозі 10,7 мг/кг, 3-тя – щури з експериментальним набряком легень, без лікування (нелікований контроль).

Тваринам усіх груп, які загинули протягом досліду, а також декапітованим під ефірним наркозом після його закінчення, розкривали грудну клітку, брали тканини печінки, нирок і м'язів. У м'язах і печінці визначали вміст електролітів [7]. Локалізацію діуретичного ефекту карборену у звитих канальцях нефрону встановлювали гістохімічним методом. Визначали активність сукцинатдегідрогенази за Нахласом, Валькером та Зелігманом [3] і Na-K-АТФ-ази. У світловій і електронній мікроскопії для виявлення Na-K-АТФ-ази використовували принцип Wachstein, Meisel [6].

© О.І. Набока, А.І. Березнякова, 2009.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Після розтину в дослідній групі тварин з набряком без лікарської речовини печінка була збільшена й ущільнена. В легенях почались застійні явища, переважно у прикореневій зоні. Серце було в'ялим, з ростягнутими порожнинами. Як свідчать дані літературних джерел, накопичена при набряках рідина міститься переважно у позаклітинному секторі, й абсолютні показники об'єму внутрішньоклітинної рідини при цьому не змінюються. Проте наші дослідження з визначення вмісту електролітів у тканинах м'язів і печінки щурів з набряком продемонстрували суттєве збільшення кількості іонів Na^+. На нашу думку, воно не могло бути пов'язане з розширенням саме позаклітинного сектора (табл. 1, рис. 1).

Поряд із цим, ми реєстрували також значне зниження вмісту іонів K^+. Очевидно, така картина свідчить про внутрішньоклітинну затримку натрію при одночасній втраті калію (табл. 1, рис. 2).

Концентрація іонів Na^+ (мкмоль)/1 г вологої тканини

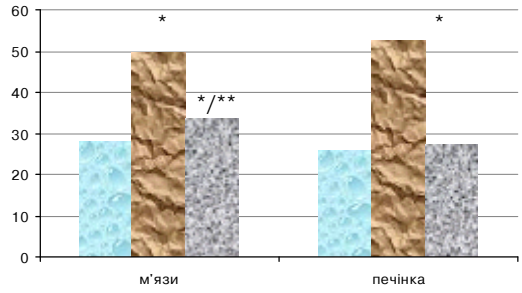


Рис. 1. Вміст іонів Na^+ (мкмоль) на 1 г вологої тканини у щурів з експериментальним набряком легень і під впливом карборену (10,7 мг/кг).

Примітки:

інтакт набряк легень набряк легень + карборен

* – $p<0,05$ зміни вірогідні до інтактних тварин;

** – $p<0,05$ зміни вірогідні до набряку легень, без лікування.

Враховуючи те, що набряки будь-якого походження супроводжуються вираженою тканинною гіпоксією, можна припустити, що в групі щурів з набряком у м'язових і паренхіматозних клітинах розвивається своєрідна "недостатність насосів". З цього виходить, що при гіпоксії тканин знижується активність ферментних систем, пов'язаних з протиградієнтним перенесенням Na^+. В результаті даний іон накопичується в клітинах, а іони K^+ виходять з них.

Таблиця 1 – **Вміст іонів Na^+ і K^+ (мкмоль) на 1 г вологої тканини у щурів з експериментальним набряком легень і під впливом карборену (10,7 мг/кг), n=15**

Серія досліду	Концентрація іонів Na^+	Концентрація іонів K^+
М'язи		
Інтактні тварини	28,0±1,2	101,0±1,1
Набряк легень, без лікування	50,2±1,7*	86,0±1,8*
Набряк легень + карборен (10,7 мг/кг)	33,5±1,3*/**	98,9±1,2*/**
Печінка		
Інтактні тварини	25,8±1,0	102,3±1,2
Набряк легень, без лікування	52,5±2,9*	84,0±3,2
Набряк легень + карборен (10,7 мг/кг)	27,2±1,1*/**	1007,7±1,4*/**

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – $p<0,05$ зміни вірогідні до інтактних тварин; ** – $p<0,05$ зміни вірогідні до набряку легень, без лікування.

Концентрація іонів K^+ (мкмоль)/1 г вологої тканини

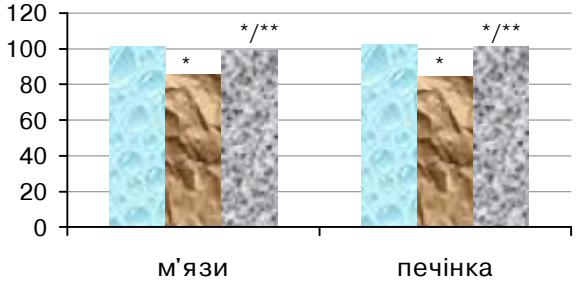


Рис. 2. Вміст іонів K^+ (мкмоль) на 1 г вологої тканини у щурів з експериментальним набряком легень і під впливом карборену (10,7 мг/кг).

Примітки:

інтакт набряк легень набряк легень + карборен

* – $p<0,05$ зміни вірогідні до інтактних тварин;

** – $p<0,05$ зміни вірогідні до набряку легень, без лікування.

Згідно з отриманими даними, концентрація іонів Na^+ у м'язах щурів з експериментальним набряком легень підвищилась в 1,79 раза ($p<0,05$) при зниженні концентрації іонів K^+ в 1,17 раза ($p<0,05$) відносно контролю. У групі тварин, яким попередньо вводили карборен, показники вмісту Na^+ і K^+ наближалися до контрольних значень. У них концентрація іонів Na^+ збільшилась в 1,2 раза ($p<0,05$) при зниженні концентрації іонів K^+ в 1,02 раза ($p<0,05$) відносно контролю. Визначено позитивну кореляцію між вмістом іонів Na^+ і K^+ у тканинах

м'язів і печінки як у тварин з експериментальним набряком легень, так і в щурів, яким попередньо вводили карборен. Нами встановлено, що в групі тварин з експериментальним набряком легень концентрація іонів Na^+ була підвищена в 1,88 раза ($p<0,05$) відносно контролю. При цьому вміст іонів K^+ знижувався в 1,21 раза ($p<0,05$). Відзначимо, що під впливом карборену дані показники, як і в тканинах м'язів, істотно відрізнялись від аналогічних у групі тварин з експериментальною патологією без лікування. Так, карборен попереджує накопичення іонів Na^+ і вихід іонів K^+ у клітинах печінки дослідних щурів. Під впливом субстанції концентрація іонів Na^+ була підвищена в 1,05 раза ($p<0,05$) відносно контролю, а вміст іонів K^+ знижувався, відповідно, в 1,01 раза ($p<0,05$).

Дані багатьох наукових і фахових джерел свідчать про те, що ендогенними сполуками, які здатні пригнічувати активний транспорт натрію, є речовини, аналогічні передсердному натрійуретичному фактору [10, 12]. У ході попередніх досліджень нами було встановлено, що посилення діурезу карбореном – результат активації натрійуретичного гормону. З огляду на те, що натрійуретичний фактор, пригнічуючи транспорт натрію в клітинах печінки і м'язів, неминуче повинен пригнічувати реабсорбцію натрію, зокрема в проксимальному канальці нефрону, ми визначали активність ферментів СДГ і Na^+,K^+-АТФ-ази в клітинах ниркових канальців у щурів з набряком легень і тварин з попереднім введенням карборену (табл. 2). Вказані дослідження становили для нас інтерес щодо визначення місця прикладення карборену у звитих канальцях нефрону.

Як і слід було очікувати, в групі щурів з набряком легень без лікування активність ферментів СДГ і Na^+,K^+-АТФ-ази суттєво збільшувалась. При цьому активність вказаних ферментів у проксимальному відділі нефрону зростала, відповідно, в 1,21 ($p<0,05$) і 1,75 раза ($p<0,05$), тоді як у дистальному відділі звитого канальця активність СДГ і Na^+,K^+-АТФ-ази мала тенденцію до підвищення в 1,13 і 1,21 раза відповідно. З огляду на активність СДГ і Na^+,K^+-АТФ-ази в досліджених ланках нефрону, попереднє введення карборену не призводить до збільшення енергозалежного транспорту натрію.

Таблиця 2 – **Вплив карборену на активність СДГ ($1 \cdot 10^{-6}$ нмоль H_2) і Na^+,K^+-АТФ-ази (ум.од. $\cdot$ 10^{-2}) у нирках на моделі хлорамонійного набряку легень у щурів (n=15)**

Серія досліду	Проксимальний звитий Каналець		Дистальний звитий каналець	
	СДГ	Na^+,K^+-АТФ-аза	СДГ	Na^+,K^+-АТФ-аза
Інтактні тварини	9,8±0,25	6,8±0,65	3,2±0,16	12,2±1,8
Набряк легень, без лікування	11,9±0,36*	11,9±1,08*	3,6±0,21*	14,8±2,2*
Набряк легень + карборен (10,7 мг/кг)	10,1±0,28*/**	7,2±0,69*/**	3,2±0,13	10,4±1,5*/**

Активність Na^+,K^+-АТФ-ази в клітинах дистальних звитих канальців достовірно зменшувалась в 1,42 раза ($p<0,05$), а активність СДГ мала тенденцію до зниження в 1,13 раза ($p<0,05$) відносно групи тварин з експериментальним набряком легень. Одночасно за умов введення карборену в експерименті ми спостерігали достовірне зменшення активності СДГ і Na^+,K^+-АТФ-ази у проксимальному відділі звитих канальців – в 1,18 ($p<0,05$) і 1,65 раза ($p<0,05$) відповідно відносно групи щурів з набряком легень без лікування.

Таким чином, згідно із сучасними уявленнями про патогенез розвитку набряків і провідну роль Na^+,K^+-АТФ-ази, ми можемо зробити висновок, що карборен чинить протинабрякову і діуретичну дії за рахунок пригнічення енергозалежного транспорту натрію в нирках. Очевидне зменшення ступеня розвитку набряку в щурів на тлі введення карборену корелює зі зниженням активності Na^+,K^+-АТФ-ази як в дистальному, так і в проксимальному відділах канальців нефрону.

ВИСНОВКИ. 1. Доведено провідну роль активації натрійуретичного фактора в механізмі дії карборену, що підтверджено в дослідах з вивчення активності Na^+,K^+-АТФ-ази і СДГ в клітинах ниркових канальців щурів з набряком легень.

2. Показано, що введення карборену в дозі 10,7 мг/кг призводить до зниження активності Na^+,K^+-АТФ-ази і СДГ в дистальному і проксимальному (менш вираженому) відділах канальців нефрону, що супроводжувалось зменшенням реабсорбції іонів натрію і води.

ЛІТЕРАТУРА

1. Буревич М.А., Мравян С.Р., Веселова Т.Е. Значение системы предсердных натрийуретических пептидов при сердечной недостаточности и артериальной гипертензии // Кардиология. – 2003. – № 9. – С. 81-86.

2. Гонський Я.І., Максимчук Т.П., Калинський М.І. Біохімія людини / За ред. Я.І. Гонського. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2002. – С. 507-595.

3. Кононский А.И. Гистохимия. Выявление сукцинатдегидрогеназы по Нахласу, Валькеру и Зилегману. – К.: Вища школа 1976. – С. 175-176.

4. Логвиненко Н.С., Иванова Л.Н. Молекулярные механизмы быстрой регуляции активности натриевого насоса в дистальных сегментах нефрона // Нефрология. – 2001. – **3**, № 3. – С. 106.

5. Логвиненко Н.С. Современные представления о молекулярном механизме действия альдостерона в дистальном сегменте нефрона почки // Эндокринная регуляция физиологических функций в норме и патологии: Материалы 2-й науч. конф., 2002 г. – Новосибирск, 2002. – С. 41.

6. Луппа Х. Основы гистохимии. Определение K, Na-АТФазы гистохимически. – М.: Мир, 1980. – С. 183-186.

7. Резніков О.Г., Соловйов А.І., Добреля Н.В., Стефанов О.В. Біотична експертиза до клінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: Методичні рекомендації // Вісник фармакології та фармації. – 2006. – № 7. – С. 47-61.

8. Farrell A.P., Olson K.R. Cardiac natriuretic peptides: a physiological lineage of cardioprotective hormones? // Physiol. Biochem. Zool. – 2000. – **73**, № 1. – P. 1-11.

9. Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro) BNP / C. // Eur. J. Heart Failure. – 2004. – **50**, № 6. – P. 257-260.

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

11. Vander A.J. Renal clearance // Renal Physiology / ed. Vander A.J. – 5 th ed. – New York: McGraw-Hill, 1995. – P. 51-61.

12. Vanderheyden M., Bartunek J., Goethals M. Brain and other natriouretic peptides: molecular aspects // Europ. J. Heart Failure. – 2004. – **50**, № 6. – P. 261-268.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И NA$^+$,K$^+$-АТФ-АЗЫ В ИЗВИТЫХ КАНАЛЬЦАХ НЕФРОНА В УСЛОВИЯХ ВВЕДЕНИЯ КАРБОРЕНА

О.И. Набока, А.И. Березнякова
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

В работе представлены результаты изучения активности Na$^+$,K$^+$-АТФ-азы и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в извитых канальцах нефрона в условиях введения карборена. Установлено, что введение карборена в дозе 10,7 мг/кг приводит к снижению активности Na$^+$,K$^+$-АТФ-азы и СДГ в дистальном и проксимальном (менее выраженном) канальцах нефрона, что сопровождалось уменьшением реабсорбции ионов натрия и воды.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **карборен, Na$^+$,K$^+$-АТФ-аза, сукцинатдегидрогеназа, канальцы нефрона.**

DETERMINATION OF ACTIVITY OF SUCCINATE DEHYDROGENASE AND NA$^+$, K$^+$- ATPHASE IN BRANCHED NEPHRON CANALS UNDER CONDITIONS CARBOREN INTRODUCTION

O.I. Naboka, A.I. Bereznyakova
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

The article adduces results of study of activity of Na$^+$, K$^+$-ATPhase and succinate dehydrogenase (SD) in the branched nephron canals under conditions of carboren introduction. It has been proved that carbogen introduction in a dose 10,7 mg/kg reduces activity of Na$^+$, K$^+$-ATPhase and SD in hystal and proximal (less expressed) nephon canals which was accompanied with reduction of sodium ions reabsorbtion and water.

KEY WORDS: **carboren, Na$^+$, K$^+$-ATPhase, succinate dehydrogenase, nephron canals.**

Отримано 26.02.2009 р.

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

УДК 576.367:611.018.26]:616-056.52-092

ВПЛИВ ЛЕПТИНУ НА ЕКСПРЕСІЮ NO-СИНТАЗИ В ЕНДОТЕЛІАЛЬНИХ КЛІТИНАХ

М.М. Корда, Т.Я. Ярошенко, С.М. Самборська, І.В. Корда
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Є докази, що гормон жирової тканини лептин може впливати на тонус судин. В даній роботі вивчався вплив лептину на експресію eNOS (ендотеліальної NO-синтази) – основного ферменту, що відповідає за тонус гладких м'язів судин. Визначали також концентрацію в клітинах субстрату eNOS – L-аргініну. Показано, що експресія eNOS суттєво підвищувалася (у 2,5 раза) в перші дві години інкубації ендотеліальних клітин з лептином. Разом із тим, концентрація L-аргініну в клітинах мала тенденцію до зниження. Висунуто припущення, що така невідповідність може бути причиною роз'єднання функціонування eNOS і дисфункції ендотелію при ожирінні.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **ожиріння, лептин, ендотеліальна NO-синтаза.**

ВСТУП. Ожиріння є одним з найбільш серйозних факторів ризику захворювань серцево-судинної системи [8]. Важливою причиною васкулярних розладів при ожирінні може бути погіршення продукції NO ендотелієм. Останні дослідження свідчать про те, що гормон лептин, який утворюється жировою тканиною, може впливати на зміни тонусу судин через регуляцію продукції NO [1, 4]. Було показано, що рецептори до лептину (Ob-R) експресуються в ендотеліальних клітинах [2]. Є також дані, що стимуляція ендотеліальних клітин лептином призводить до підвищення продукції вільних радикалів кисню, зокрема супероксиду, що спричиняє дисфункцію ендотелію [3, 9]. Метою даної роботи було вивчити, як тривала експозиція ендотеліальних клітин до лептину впливає на експресію ендотеліальної NO-синтази, а також оцінити вплив лептину на внутрішньоклітинний вміст субстрату NO-синтази – L-аргініну.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Ендотеліальні клітини умбілікальної вени людини (HUVECs) вирощували в середовищі MCDB-131. Коли клітини ставали конфлюентними, середовище MCDB-131 замінювали Мінімальним Необхідним Середовищем Eagle без сироватки крові й клітини інкубували протягом 2 або 12 год з 0,01, 0,1, 1 або 10 μг/мл лептину.

Експресію eNOS визначали за допомогою вестерн-блот аналізу. Гомогенати HUVECs піддавали електрофорезу на поліакриламідному гелі, й зразки переносили на нітроцелюлозну мембрану. eNOS виявляли за допомогою анти-eNOS моноклональних антитіл. Потім мембрани інкубували з вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрону. Білок eNOS візуалізували, використовуючи хемілюмінесцентну детекторну систему [6].

Визначення L-аргініну проводили методом високоефективної рідинної хроматографії за допомогою флуоресцентного детектора. Клітини гомогенізували в сульфосаліциловій кислоті. Після центрифугування до супернатанту додавали внутрішній стандарт (S-карбоксилметил-L-цистеїн) і проводили одно-хвилинну дериватизацію з флуоресцентним реагентом. 10 μл розчину вносили в рідинний хроматограф HP 1090, розділяли амінокислоти в колонці Zorbax Eclipse AAA з двобуферною системою градієнтної елюції. L-аргінін визначали за допомогою флуоресцентного монітора Shimadzu RF 551, розрахунок проводили, використовуючи стандартну калібрувальну криву.

Результати виражали як середнє±SEM з 4-6 експериментів. Зміни $p<0,05$ розглядали як статистично достовірні. Статистичний аналіз

© М.М. Корда, Т.Я. Ярошенко, С.М. Самборська, І.В. Корда, 2009.

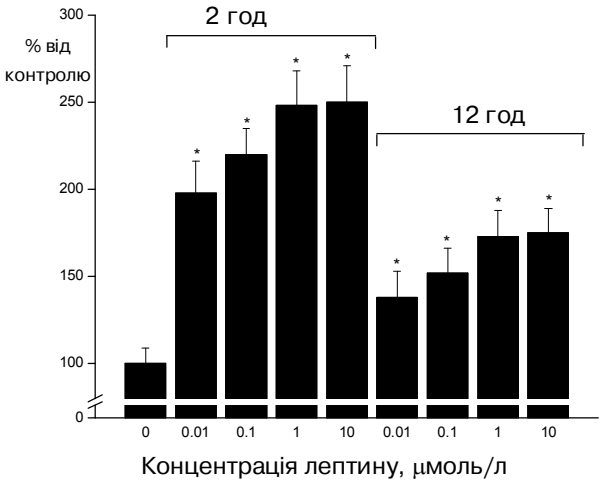


Рис. 1. Експресія eNOS в HUVECs, інкубованих з різними концентраціями лептину протягом 2 і 12 год: * – $p<0,05$ проти контролю (без лептину). Кожне значення є середнім з 4-5 окремих визначень.

виконували, використовуючи ANOVA і t-критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На рисунку 1 показано, що під час інкубації ендотеліальних клітин з лептином значно підсилювалась експресія eNOS. Так, експозиція HUVECs до 1-10 μмоль/л гормону протягом 2 год призводила до збільшення вмісту eNOS в 2,5 раза. Тоді як така сама концентрація гормону, що діяла протягом 12 год, викликала збільшення експресії eNOS тільки приблизно в 1,7 раза.

З рисунка 2 видно, що під час інкубації ендотеліальних клітин і з лептином, і без нього мала місце тенденція до зниження внутрішньоклітинного вмісту L-аргініну. В клітинах, інкубованих з лептином, ця тенденція була більш вираженою, проте через 12 год інкубації

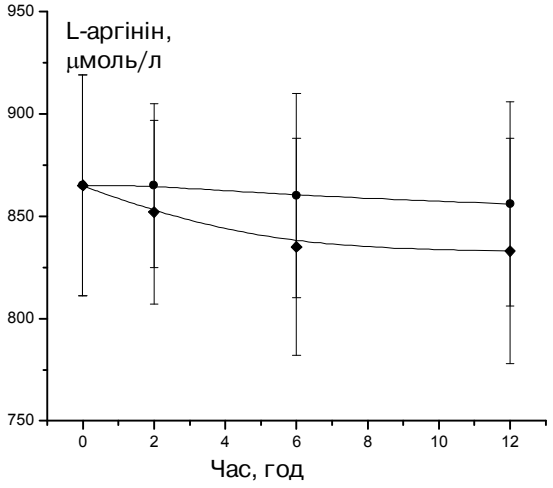


Рис. 2. Вплив лептину (100 нг/мл) на рівень L-аргініну в HUVECs.

Клітини інкубували з (♦) або без (•) лептину протягом 12 год: * – $p<0,05$ проти контролю (без лептину). Кожне значення є середнім з 4-5 окремих визначень.

інтрацелюлярна концентрація L-аргініну все ще не була статистично достовірно нижчою, ніж така перед інкубацією.

Отримані нами результати узгоджуються з даними, отриманими Zanetti й ін., які свідчать про те, що експериментальна гіперлептинемія в щурів асоціюється з посиленою експресією eNOS в ендотелії аорти [10]. Dobrian та ін. недавно показали, що експресія eNOS в аорті Sprague-Dawley щурів з ожирінням підвищується у 8 разів порівняно з контролем [5]. На відміну від Sprague-Dawley щурів, пригнічення експресії eNOS спостерігається в аорті тварин з ожирінням породи Zucker, які характеризуються мутацією рецепторів лептину і тому є резистентними до дії цього гормону [7]. Всі наведені дані свідчать про те, що лептин підвищує кількість білка eNOS в ендотелії. Таке збільшення eNOS повинно потенційно поліпшувати ендотеліальну функцію шляхом полегшення продукції NO. Проте може мати місце парадоксальний ефект, коли тривала експозиція ендотелію до лептину призводить до ендотеліальної дисфункції. Ми спостерігали тенденцію до зниження рівня L-аргініну в HUVECs, інкубованих з лептином. L-аргінін є не тільки субстратом для синтезу NO ендотеліальною NO-синтазою, він також необхідний для стабілізації (спряження) димерної форми eNOS. Тому відносне зниження концентрації L-аргініну в клітинах призводить до роз'єднання eNOS. Роз'єднана eNOS здатна одноелектронно відновлювати кисень з утворенням супероксидного радикала. В цьому випадку NO дуже швидко реагує з $O_2^{\cdot-}$ з утворенням $ONOO^-$. Тобто роз'єднана eNOS може бути ефективним генератором цитотоксичного $ONOO^-$. Швидке витрачання NO у реакції з $O_2^{\cdot-}$ суттєво знижує концентрацію біодоступного NO. В результаті зменшується його дифузія в гладкі м'язи судини і пригнічується ефективність біохімічних процесів, що залежать від NO.

ВИСНОВОК. Індуковане лептином зменшення концентрації L-аргініну в ендотеліальних клітинах може бути достатнім фактором, що роз'єднує eNOS. Таке роз'єднання потенціюється лептинстимульованим підвищенням експресії eNOS, що не супроводжується адекватним збільшенням концентрації субстрату для цього ферменту. Вказані ефекти лептину дестабілізують eNOS, що може призвести до ендотеліальної дисфункції. Отже, можна припустити, що стан хронічної гіперлептинемії, який є типовим для ожиріння, через механізми дестабілізації ендотеліальної eNOS підвищує ризик кардіоваскулярних захворювань.

ЛІТЕРАТУРА

1. Agata J., Masuda A., Takada M. et al. High plasma immunoreactive leptin level in essential hypertension // Am. J. Hypertens. – 1997. – 10 (10 Pt 1). – P. 1171-1174.

2. Bouloumie A., Drexler H.C., Lafontan M., Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis // Circ. Res. – 1998. – **83**. – P. 1059-1066.

3. Bouloumie A., Marumo T., Lafontan M., Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells // FASEB J. – 1999. – 13 (10). – P. 1231-1238.

4. Considine R.V., Sinha M.K., Heiman M.L. et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans // N. Engl. J. Med. – 1996. – 334 (5). – P. 292-295.

5. Dobrian A.D., Davies M.J., Prewitt R.L., Lauterio T.J. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity // Hypertension. – 2000. – 35 (4). – P. 1009-1015.

6. Madajka M., Korda M., White J., Malinski T. Effect of aspirin on constitutive nitric oxide synthase and the biovailability of NO // Thromb. Res. – 2003. – 110 (5-6). – P. 317-321.

7. Nishimatsu H., Suzuki E., Satonaka H. Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by fluvastatin in obese Zucker rats // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2005. – 288 (4). – P. H1770-1776.

8. Williams I.L., Wheatcroft S.B., Shah A.M., Kearney M.T. Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanisms of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans // Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. – 2002. – 26 (6). – P. 754-764.

9. Yamagishi S.I., Edelstein D., Du X.L. et al. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A // J. Biol. Chem. – 2001. – 276 (27). – P. 25096-25100.

10. Zanetti M., Barazzoni R., Vadori M.et al. Lack of direct effect of moderate hyperleptinemia to improve endothelial function in lean rat aorta: role of calorie restriction // Atherosclerosis. – 2004. – 175 (2). – P. 253-259.

ВЛИЯНИЕ ЛЕПТИНА НА ЭКСПРЕССИЮ NO-СИНТАЗЫ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

М.М. Корда, Т.Я. Ярошенко, С.М. Самборская, И.В. Корда
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

Есть доказательства, что гормон жировой ткани лептин может влиять на тонус сосудов. В этой работе изучалось влияние лептина на экспрессию eNOS (эндотелиальной NO-синтазы) – главного фермента, отвечающего за тонус гладких мышц сосудов. Определяли также концентрацию в клетках субстрата eNOS – L-аргинина. Показано, что экспрессия eNOS существенно повышалась (в 2,5 раза) в первые два часа инкубации эндотелиальных клеток с лептином. В то же время, концентрация L-аргинина в клетках имела тенденцию к снижению. Сделано предположение, что такое несоответствие может быть причиной разъединения функционирования eNOS и дисфункции эндотелия при ожирении.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **ожирение, лептин, эндотелиальная NO-синтаза.**

THE EFFECT OF LEPTIN ON NO-SYNTHASE EXPRESSION IN ENDOTHELIAL CELLS

M.M. Korda, T.Ya. Yaroshenko, S.M. Samborska, I.V. Korda
TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

Evidence has accumulated that adipose tissue derived hormone leptin may affect the vascular tone. We hypothesized that chronic hyperleptinemia accompanying obesity can modify the endothelial NO metabolism and cause endothelial dysfunction. eNOS (endothelial nitric oxide synthase) expression and L-arginine concentration in HUVECs were measured. We have shown that there is the significant increase in eNOS expression during the first two hours of HUVECs incubation with leptin (about 2,5 fold). During incubation both leptin-treated and non treated HUVECs tended to decrease L-arginine level. In cells incubated with leptin this tendency was higher expressed. Leptin induced increase in eNOS expression and decrease of the L-arginine content may be responsible for severe uncoupling of eNOS and dysfunction of endothelium observed in obesity.

KEY WORDS: **obesity, leptin, endothelial NO-synthase.**

Отримано 3.01.2009 р.

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

УДК 615.244.616.36-002-099

ВКЛЮЧЕННЯ МІЧЕНОГО ФОСФАТИДИЛХОЛІНУ ІЗ СОЇ ПРЕПАРАТУ "ЛІПОФЕН" В МЕМБРАНИ ЕР ПЕЧІНКИ ЩУРІВ

А.Д. Гордієнко, А.І. Божков, О.В. Кудокоцева
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Мічений фосфатидилхолін ліпофену, введений щурам, включали до складу мікросомальних мембран печінки. Радіоактивну мітку препарату виявляли у фосфоліпідах і неестерифікованих жирних кислотах мембран. Через кілька годин після введення препарат піддавали метаболічним перетворенням.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **фосфатидилхолін мічений, ліпофен, мікросомальні мембрани.**

ВСТУП. В Державному науковому центрі лікарських засобів (ДНЦЛЗ, м. Харків) створений і впроваджений у медичну практику новий комплексний гепатопротектор "Ліпофен" в капсулах на основі рослинних фосфоліпідів, поліфенолів та вітамінів. До складу препарату входять поліненасичений фосфатидилхолін (ФХ) із сої, флавоноїдний антиоксидант – флакумін, α-токоферол, тіамінбромідгідрохлорид і піридоксингідрохлорид [5].

Препарат призначений для лікування хворих з гострими та хронічними гепатитами різної етіології.

Вивчення розподілення ліпофену в органах і тканинах виявило нелінійність фармакокінетики препарату [4]. Найбільша кількість міченого ліпофену накопичується в печінці, селезінці й нирках, мало – в серці, м'язах, мозку. Виділяються продукти метаболізму препарату із сечею та фекаліями [4].

Відомо, що метаболізм ліпідів здійснюється у печінці й ліпідні препарати здатні усувати патологічні зміни в органі [7]. Оскільки однією з основних діючих речовин ліпофену є поліненасичений ФХ, метою даної роботи було вивчення включення міченого ФХ препарату "Ліпофен" в мембрани ЕР та його метаболізму.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проводили на щурах-самцях 3-місячного віку лінії Вістар масою 120-140 г. Тварин утримували у стандартних умовах віварію на повноцінному раціоні.

© А.Д. Гордієнко, А.І. Божков, О.В. Кудокоцева, 2009.

Включення міченого препарату в мембрани ЕР та його метаболізм вивчали методом радіоактивних ізотопів по міченому ФХ як основній діючій речовині препарату, отриманій за оригінальною технологією та захищеній авторським свідоцтвом [1]. Отримання міченого ФХ та приготування препарату "Ліпофен" здійснювали, як описано в роботі [4]. Ліпофен вводили експериментальним щурам однократно в шлунок в дозі 6 мг на 100 г маси тварини. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом через 0,5, 1, 2 і 4 год після введення препарату. З печінки виділяли мікросоми за методом [2]. З мікросом екстрагували ліпіди та аналізували їх методом тонкошарової хроматографії, як описано в роботі [3]. Радіоактивність препарату визначали за методом [8] і виражали в імп/хв на 100 мг ліпідів мікросом.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Фосфоліпідні препарати, як відомо, беруть участь у репарації мембран [6, 9]. Про вбудовування екзогенних ліпідів у мембрани, як правило, судять за зміною структурно-функціональних характеристик мембран, зокрема активності маркерних ферментів. Однак експериментальних даних, що свідчать про безпосереднє вбудовування екзогенних ліпідів у мембрани, немає.

Проведене нами дослідження із включенням міченого препарату в мембрани ЕР печінки щурів показало, що вже через 30 хв після введення препарату в ліпідах мікросом виявляли невеликий рівень радіоактивної мітки 530 імп/хв на 100 мг ліпідів, а через 1 год після

введення мітки (міченого ліпофену) радіоактивність збільшувалася в 3 рази і залишалася на цьому рівні протягом 2 год, а потім знижувалася до 4 год (рис. 1).

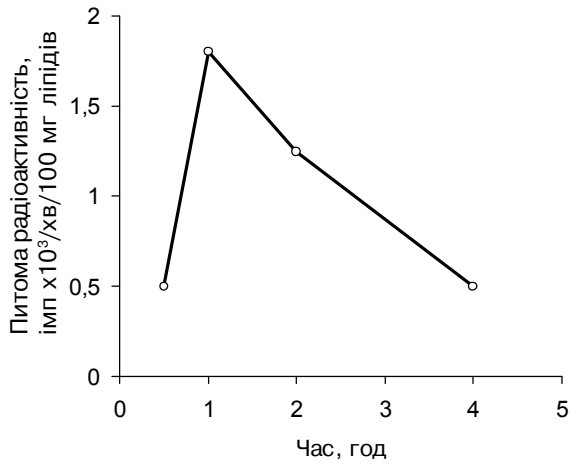


Рис.1. Питома радіоактивність ліпідів у мікросомах при введенні ^{14}С-ліпофену в дозі 6 мг/100 г маси тварини.

Таким чином, радіоактивну мітку ліпофену – ФХ виявляли в складі ліпідних компонентів мікросом.

Відомо, що фосфатидилхоліни і фосфатидилхолінетаноламіни становлять основний вміст фосфоліпідів у тканинах тварин. Обмінні процеси, пов'язані з біосинтезом фосфатидилхолінів і фосфатидилетаноламінів та інших ліпідів, мають багато ланок, що перекриваються [7]. Існують експериментальні докази на користь того, що відновлення молекул ліпідів, у тому числі й фосфоліпідів, відбувається частково шляхом заміни окремих компонентів молекул [10]. З огляду на це, ФХ ліпофену в мікросомах печінки (основне місце синтезу) може піддаватися розщепленню, а окремі компоненти (жирні кислоти, тригліцериди) – використовуватися в синтезі нових ліпідних молекул. Якщо таке відбувається, то передбачається, що радіоактивна мітка ФХ буде виявлятися і в інших фракціях ліпідів. Так, розподіл ліпідів на фракції з мікросом печінки щурів, що одержували мічений ліпофен, дозволив виявити через 4 год після введення препарату радіоактивну мітку у фосфоліпідах і неестерифікованих жирних кислотах (фосфоліпіди мали питому радіоактивність 150 імп/хв на 100 мг ліпідів, а неестерифіковані жирні кислоти – 94 імп/хв на 100 мг ліпідів.

Отже, ФХ, що входить до складу ліпофену, включався в мікросомальні мембрани печінки, де через кілька годин піддавався розщепленню.

ВИСНОВОК. Мічений ліпофен, введений щурам, включався до складу мікросомальних мембран печінки, де через кілька годин піддавався метаболічним перетворенням.

ЛІТЕРАТУРА

1. А.с. 1622980 СССР, МКИ 5 С 07 F 9/10 ДСП. Способ получения соевого лецитина / А.В. Улесов, И.Ф. Макаревич, М.В. Мокроуз, Ю.М. Краснопольский, Я.И. Хаджай, В.П. Георгиевский, А.Д. Гордиенко, В.В. Левченко, А.Ф. Бацура, А.И. Гризодуб, В.П. Мильков. – Опубл. 22.09.90. – Бюл. № 12. – 2 с.

2. Бергельсон Л.Д., Дятловицкая Э.В., Молотовский Ю.Г. и др. Препаративная биохимия липидов. – М.: Наука, 1981. – 260 с.

3. Божков А.И., Длубовская В.Л. Липидный обмен и структурно-функциональные особенности эндоплазматического ретикулума // Биохимия. – 1992. – **57**, № 1. – С. 8-15.

4. Гордиенко А.Д., Божков А.И. Фармакокинетика липофена – нового комбинированного фосфолипидного гепатопротектора природного происхождения // Эксперим. и клин. фармакология. – 2001. – № 1. – С. 66-67.

5. Гордиенко А.Д. Гепатозащитное действие липофена – нового комбинированного фосфолипидного препарата природного происхождения // Эксперим. и клин. фармакология. – 2001. – №3. – С. 45-47.

6. Ипатова О.М., Прозоровская Н.Н., Торховская И.Н. и др. Биологическая активность соевых фосфолипидов // Биомедицинская химия. – 2004. – **50**, № 5. – С. 436-450.

7. Кучеренко Н.Е., Васильев А.Н. Липиды. – К.: Вища школа, 1985. – 246 с.

8. Озрина Р.Д., Ульянов А.М., Сарвачев К.Ф. Метод приготовления гомогенных образцов тканей и крови для жидкостного сцинтилляционного счета // Биологические науки. – 1979. – № 4. – С. 100-102.

9. Подымова С.Д. Механизмы алкогольных повреждений печени и их коррекция эссенциальными фосфолипидами // Фарматека. – 2005. – № 4. – С. 25-31.

10. Четвериков Д.Л., Шмелев А.А., Праздникова Е.И. Интенсивность обмена углеродного скелета фосфолипидов мозга крыс в норме и при гипоксии // Липиды. Структура, биосинтез, превращения и функции.– М.: Наука, 1977. – С. 170-181.

ВКЛЮЧЕНИЕ МЕЧЕННОГО ФОСФАТИДИЛХОЛИНА ИЗ СОИ ПРЕПАРАТА "ЛИПОФЕН" В МЕМБРАНЫ ЭР ПЕЧЕНИ КРЫС

А.Д. Гордиенко, А.И. Божков, Е.В. Кудокоцева
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Меченный фосфатидилхолин липофена, введенный крысам, включали в состав микросомальных мембран печени. Радиоактивную метку препарата обнаруживали в фосфолипидах и неэстерифицированных жирных кислотах мембран. Через несколько часов после введения препарат подвергали метаболическим превращениям.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **фосфатидилхолин меченный, липофен, микросомальные мембраны.**

INCLUSION OF LABELED SOY-DERIVED PHOSPHATIDYLCHOLINE OF LYPOPHENE PREPARATION INTO ER MEMBRANES OF RAT LIVER

A.D. Hordiyenko, A.I. Bozhkov, O.V. Kudokotseva
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARIV

Summary

Labeled lypophene phosphatidylcholine, introduced to rats, was included to content of microsomal membranes of liver. Radioactive label of preparation was revealed in phospholipids and free fatty acids of membranes. In a few hours after administration of preparation was subjected to metabolic changes.

KEY WORDS: **labeled phosphatidylcholine, lypophene, microsomal membranes.**

Отримано 20.08.2008 р.

Адреса для листування: *А.Д. Гордієнко, просп. Перемоги, 78, кв. 65, Харків, 61204, Україна.*

УДК 615.596-002.828-02:577.16

ПОЛІВІТАМІННА НЕДОСТАТНІСТЬ У ХВОРИХ НА ДЕСТРУКТИВНИЙ ОНІХОМІКОЗ

А.Р. Вергун, В.В. Котик[1], О.М. Вергун
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО
ЛЬВІВСЬКА КОМУНАЛЬНА 4 МІСЬКА КЛІНІЧНА ЛІКАРНЯ[1]

Парціальна вибірка становила 80 хворих на поліонігомікоз та гнійну оніходеструкцію більше двох нігтьових пластин. Визначення вмісту вітамінів та їх дериватів у крові й добовій сечі проводили до початку системної антимікотичної пульс-терапії, під час лікування без полівітамінних препаратів (через тиждень після первинного забору біоматеріалу) та через 2 тижні після їх призначення. Забезпеченість вітамінами B_1, B_2, PP, B_6 і C перебувала в прямій залежності від тяжкості оніхомікозу. Нами визначені оптимальні добові дози для корекції вітамінної недостатності.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **поліоніхомікоз, вітамінна недостатність.**

ВСТУП. Операції на дистальній фаланзі становлять значний відсоток (3-10 %) усіх оперативних втручань, які виконують амбулаторно, а їх результати внаслідок високої частоти недіагностованих супутніх та поєднаних уражень нерідко бувають незадовільними (рецидиви патології трапляються, за даними окремих джерел, у 5-30 % спостережень) [6, 9, 10]. Незадовільні результати комплексного лікування оніхопатології детермінуються неврахованими пато- і морфогенетичними факторами мікотичної оніходеструкції [2, 7], технічними погрішностями виконання хірургічних втручань [6, 9], неефективним проведенням антимікотичної терапії [1, 5, 10] та профілактичних дій інтраопераційних заходів щодо "блокування" поширення інфекції на глибокі анатомічні структури [1, 6, 8, 9]. У літературі наявні дані про те, що дистрофічні прояви на нігтьових пластинках (лінії Бо, койлоніхія, оніхомадезис, оніхорексис, оніхошизис) можуть виникати у хворих при тривалому авітамінозі [2, 5]. Ці та інші прояви детермінують утворення тріщин на нігтьових пластинах, їх стоншення та відшарування [3, 4] – можуть бути "вхідними воротами" контамінації патогенними грибками [5, 8, 9] і супроводжувати мікотичну оніходеструкцію [2, 4, 5, 9].

Метою роботи було дослідження вмісту вітамінів B_1, B_2, PP, B_6 і C у крові та екскреції їх у вигляді дериватів із сечею до і в процесі лікування хворих на деструктивний оніхомікоз для обґрунтування доцільності вітамінної корекції у комплексній терапії.

© А.Р. Вергун, В.В. Котик, О.М. Вергун, 2009.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Проспективно проаналізовано за чотирирічний період (2003-2007 рр.) 427 випадків деструктивного оніхомікозу у хворих, прооперованих у хірургічних відділеннях комунальної 4 міської лікарні, клінічних поліклінік № 2 і № 5 м. Львова. Усі хірургічні втручання виконано адекватно відповідно до домінуючих нозологічних форм і клінічних варіантів ураження. Парціальна вибірка становила 80 хворих на поліоніхомікоз, яких вибирали довільним шляхом для проведення лабораторних досліджень із загальної вибірки спостережень гнійної оніходеструкції понад двох нігтьових пластин.

Забезпеченість хворих вітаміном С визначали за вмістом аскорбінової кислоти в крові (C.J. Farmer, A.F. Abt, 1936) за методом В.С. Асатіані та її добовою екскрецією із сечею (Тільманс, 1928). Вміст рибофлавіну в крові досліджували за методом Lowry, в сечі – за методикою Е.М. Масленікової та Л.І. Гвоздової; забезпеченість організму хворих вітаміном B_6 визначали за екскрецією 4-піридоксинової кислоти в сечі (J. Huff, Perlzweig, 1947). Визначення вмісту вітамінів та їх дериватів у крові й добовій сечі було триразовим: до початку системної антимікотичної пульс-терапії, під час лікування без полівітамінних препаратів (через тиждень після первинного забору біоматеріалу) та через 2 тижні після їх призначення.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Нами вивчено забезпеченість вітамінами B_1, B_2, PP, B_6 і C у 80 хворих на поліоніхомікоз: 50 чоловіків і 30 жінок віком від 52 до 85 років. З метою по-

рівняння вмісту досліджуваних речовин створено контрольну групу із 30 здорових добровольців віком 20-60 років. У 75 хворих на поліоніхомікоз із наявністю двох і більше вогнищ оніходеструкції, незалежно від пори року, констатовано вітамінну недостатність (табл. 1) різного ступеня вираження: від безсимптомної, яку виявляли лише лабораторними методами, до клінічно вираженої, яка містила типовий симптомокомплекс оніхомікозу та проявлялась хейлозом, ангулярним стоматитом, гіпертрофією сосочків язика, кровоточивістю ясен, себорейним дерматитом, фолікулярним гіперкератозом, локальними міалгіями, парестезіями.

Таблиця 1– **Вміст вітамінів у крові й сечі обстежуваних**

Клінічна група	Вітамін (вміст в 1 л крові та добовій кількості сечі)									
	С, мкмоль/л		B_1, нмоль/л		B_2, нмоль/л		PP, мкмоль/л		B_6, нмоль/л	
	кров	сеча	кров	сеча	кров	сеча	кров	сеча	кров	сеча
Практично здорові	54,39 ±3,7	81,95± 16, 2	194,32 ±35,31	632,15 ±34,52	298,12 ±19,14	701,5 ±75,5	54,68 ±7,53	55,34± 12,62	280,25 ±20,15	18,53 ±1,42
Хворі на деструктивний оніхомікоз (до проведення комплексного лікування)	44,80 ±1,5	55,28± 2,93	53,87 ±5,41	392,24 ±12,45	174,35 ±7,15	350,83 ±20,44	34,82 ±0,85	33,11 ±1,26	154,78 ±2,91	5,72± 0,23

Виражена клініка полігіповітамінозу, підтверджена лабораторними даними, мала місце у 40 пацієнтів (50 % парціальної вибірки). Забезпеченість вітамінами B_1, B_2, PP, B_6 і С перебувала у прямій залежності від важкості перебігу основного захворювання. Чим важче перебігав оніхомікоз, тим частішими і вираженішими були прояви недостатності вітамінного обміну.

У 32 хворих на поліоніхомікоз із вираженими симптомами фонового полігіповітамінозу було констатовано гнійні ускладнення мікотичної оніходеструкції – піднігтьовий панариций та мікотичноасоційовану пароніхію з гнійним оніхолізисом понад 3 нігтьових пластин, що становило 80 % парціальної вибірки випадків полівітамінної недостатності. Для порівняння, в іншій половині парціальної вибірки – 40 осіб, прооперованих з приводу мікотичної оніходеструкції, гнійні ускладнення виявлено лише у 15 хворих (37,5 % групи), що дозволяє зробити припущення про наявність достовірного взаємозв'язку між проявами полівітамінної недостатності та вираженням некротичних ускладнень. Аналіз харчових раціонів обстежуваних нами пацієнтів показав, що вміст вітамінів відповідав добовій потребі здорової людини. Це дає підстави вважати, що при деструктивному поліоніхомікозі самого надходження вітамінів з їжею для забезпечення потреби в них організму є недостатньо. У лікування було включено полівітамінні комплекси з урахуванням визначених нами мінімальних добових доз для вітамінотерапії: при ураженні до 5 нігтів без наявності вторинних гнійно-некротичних ускладнень – B_1 – 6-8 мг, B_2 – 6-8 мг, PP – 75-100 мг, B_6 – 9-12 мг, С – 225-300 мг; при ураженні більше 5 нігтів та (або) наявності вторинних гнійно-некротичних ускладнень – B_1 – 12 мг, B_2 – 12 мг, PP – 150 мг, B_6 – 12-18 мг, С – 450 мг. Побічних реакцій на введення вітамінних препаратів не виявлено. У 29 пацієнтів на 7 день після початку корекції полігіповітамінозу одномоментно з комплексним лікуванням мікотичної оніходеструкції спостерігали повну ліквідацію клінічних ознак вітамінної недостатності з вираженим поліпшенням загального самопочуття. В інших 11 пацієнтів повністю клінічні явища полігіповітамінозу зникали на 10-12 дні після призначення полівітамінних препаратів.

ВИСНОВКИ. 1. У більшості хворих на поліоніхомікоз наявна фонова полівітамінна недостатність, яка без проведення адекватних заходів має тенденцію до поглиблення.

2. В комплексне лікування хворих із множинним грибковим ураженням нігтів та гнійними ускладненнями, на нашу думку, доцільно включати вітаміни B_1, B_2, PP, B_6 і С в розроблених нами добових дозах та полівітамінні комплекси паралельно з антимікотичними курсами і хірургічними втручаннями, що сприяє ліквідації клінічних ознак вітамінної недостатності, детермінує підвищення ефективності терапії мікотичної оніходеструкції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Котик В.В., Поліщук Н.В., Вергун А.Р. Обгрунтування та методики проведення системної антимікотичної терапії при поліоніхеальних та поєднаних мікотичних ураженнях (огляд літератури) // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2006. – **6**, № 1. – С. 11-16.

2. Марван Якин Нажи Мараках. Особенности изменения гемостаза у больных острыми и хроническими формами микоза стоп // Дерматовенерология. Косметология. Сексопатология. – 2005. – № 1-2 (8). – С. 47-52.

3. Сергеев А.Ю. Хронический кандидоз кожи и слизистых оболочек: иммунный статус, гиперчувствительность и современные подходы к терапии // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2002. – № 3. – С. 40-45.

4. Сергеев Ю.В., Сергеев А.Ю. Грибковые заболевания. – С.Пб., 2004. – 472 с.

5. Тоскин И.А., Галустян С.М. Факторы, влияющие на эпидемический процесс микозов стоп // Вестн. дерматол. – 2001. – № 6. – С. 15-19.

6. Elewski B.E. Office-based confirmation of onychomyosis: a U.S. prospective survey // Arch. Intern. Med. – 2002. – **162**. – P. 2133-2138.

7. Gupta A.K. Onychomycosis in the elderly // Drugs Aging. – 2000. – № 16. – P. 397407.

8. Pierard G. Onychomycosis and other superficial fungal infections of the foot in the elderly: a pan-European survey // Dermatology. – 2001. – № 202. – P. 220-224.

9. Sigurgeirsson B. The L.I.O.N. Icelandic extension study and prognostic factors for the long-term cure of onychomycosis // JEADV. – 2002. – **16**. – P. 98.

10. Sigurgeirsson B., Olaffson J.H., Sfeinsson J. Long–term effectiveness of treatment with terbinafine vs. itraconasole in onychomycosis // Arch. Dermatol. – 2002. –**138**. – P. 353-357.

ПОЛИВИТАМИННАЯ НЕДОСТАТОЧНОСТЬ В БОЛЬНЫХ ДЕСТРУКТИВНЫМ ОНИХОМИКОЗОМ

А.Р. Вергун, В.В. Котик[1], О.М. Вергун

ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО
ЛЬВОВСКАЯ КОММУНАЛЬНАЯ 4 ГОРОДСКАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА[1]

Резюме

Парциальная выборка составляла 80 больных полионихомикозом и гнойной ониходеструкцией более двух ногтевых пластин. Определение содержания витаминов и их дериватов в крови и суточной моче проводили до начала системной антимикотической пульс-терапии, во время лечения без поливитаминных препаратов (через неделю после первичного забора биоматериала) и через 2 недели после их назначения. Обеспеченность витаминами B_1, B_2, PP, B_6 и C находилась в прямой зависимости от тяжести онихомикоза. Нами определены оптимальные суточные дозы для коррекции витаминной недостаточности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **полионихомикоз, витаминная недостаточность.**

POLYVITAMIN INSUFFICIENCY IN THE PATIENTS WITH DESTRUCTIVE ONYCHOMYCOSIS

A.R. Verhun, V.V. Kotyk[1], O.M. Verhun

LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY DANYLO HALYTSKY
LVIV COMMUNAL 4 MENICIPAL CLINICAL HOSPITAL[1]

Summary

Partial selection contains 80 patiens with polyonychomycosis and purulent nail destruction more than two nail slices. The definition of a level of vitamins and their derivatives in blood and daily urine was carried out prior to the beginning of system antimycotical pulse-therapy, during treatment without polyvitamin preparations (in one week after a primary selection of biomaterial) and in 2 weeks after their prescribing. Supply with vitamins B_1, B_2, PP, B_6 and C was in direct relation to onychomycosis severity. We defined optimum daily dozes for correction of vitamin insufficiency.

KEY WORDS: **polyonychomycosis, vitamin insufficiency.**

Отримано 15.01.2009 р.

Адреса для листування: *А.Р. Вергун, вул. Гжегоржа, 20/1, 79058, Львів, Україна.*