

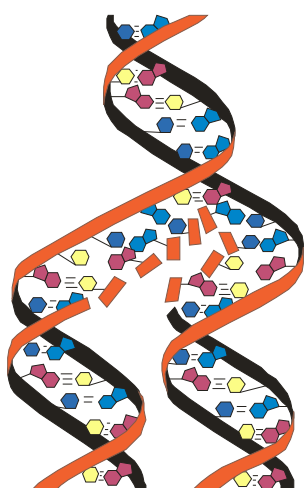
Академія медичних наук України

Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

# МЕДИЧНА ХІМІЯ

**НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ**



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

# MEDICAL CHEMISTRY

**SCIENTIFIC JOURNAL**

**2** TOM 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*

## МЕДИЧН ХІМІЯ

Науковий журнал

## MEDICAL CHEMISTRY

Scientific Journal

ISSN 1681-2557

Виходить з 1999 року  
Published since 1999

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

Передплатний індекс: 22869  
Subscription index: 22869

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

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

Рекомендовано до видання вченою радою Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського (протокол № 13 від 26 травня 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 ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

- Максимович Я.С., Дробінська О.В., Остапченко Л.І. (Київ) РОЛЬ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ В ДИНАМІЦІ РОЗВИТКУ І ЗАГОЄННЯ СТРЕСІНДУКОВАНИХ УРАЖЕНЬ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ 5
- Майор Х.Я., Стадник В.В., Кінах М.В., Влізло В.В. (Львів) ВМІСТ ФІЗІОЛОГІЧНОГО ПРИОНА ТА ЙОГО мРНК ЗА ДІЇ ПЕНТОСАН ПОЛІСУЛЬФАТУ 11
- Гоженко А.І., Мисула І.Р., Сусла О.Б., Якубишина І.Г. (Одеса, Тернопіль) МЕТАБОЛІЧНА СКЛАДОВА КАЛЬЦІФИКАЦІЇ КЛАПАННОГО АПАРАТУ СЕРЦЯ У ХВОРИХ НА ПРОГРАМНОМУ ГЕМОДІАЛІЗИ 15
- Ядловський О.Є., Бобкова Л.С. (Київ) АНАЛІЗ УЧАСТІ ХОЛІНЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ В РЕАЛІЗАЦІЇ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ ПІРОДАЗОЛУ 20
- Саатов Б.Т., Умеров О.І. (Ташкент) ДОСЛІДЖЕННЯ ФОСФОЛІПІДІВ ШКІРИ І СИРОВАТКИ КРОВІ У ХВОРИХ НА ВІТИЛІГО 25
- Дідович А.П., Вудмаска І.В., Віщур О.І. (Львів) ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ЛІПІДІВ ПЛАЗМИ КРОВІ ТА ЛЕЙКОЦИТІВ ЩУРІВ ЗА РІЗНОГО ВМІСТУ В РАЦІОНІ ПОЛІНЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ 30
- Георгіянт В.А., Перехода Л.О., Глущенко А.В. (Харків) ЗАЛЕЖНІСТЬ ПРОТИСУДОМНОЇ АКТИВНОСТІ ВІД МОЛЕКУЛЯРНОЇ БУДОВИ 36
- Герич О.Х. (Вінниця) ВПЛИВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ТА ВИСОКОЖИРОВОЇ ДІЄТИ НА ЕЛІМІНАЦІЮ МОДЕЛЬНИХ КСЕНОБІОТИКІВ У ЩУРІВ 41
- Туляков В.О. (Харків) АНАЛЬГЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ КОМБІНАЦІЇ ГЛЮКОЗАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ З ПАРАЦЕТАМОЛОМ 46
- Заїчко Н.В. (Вінниця) ВПЛИВ ТІОЛАКТОНУ ГОМОЦИСТЕЇНУ, ЦИСТЕЇНУ ТА ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗУ КРОЛІВ 51
- Березнякова Н.Л., Українець І.В., Тугайбей І.А., Горохова О.В. (Харків) ВИВЧЕННЯ ПРОТИГЕРПЕСНОЇ АКТИВНОСТІ 2-ДІЕТИЛАМІНОЕТИЛАМІДУ 2-ГІДРОКСИ-9-МЕТИЛ-4-ОКСО-4Н-ПІРИДО-[1,2-А]-ПІРИМІДИН-3-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ В ДОСЛІДАХ IN VIVO 57
- Федевич Ю.М., Бандрівська Н.Н. (Львів) ЗМІНА ПОКАЗНИКІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В РОТОВІЙ РІДИНІ ПРАЦІВНИКІВ ЦЕМЕНТНОГО ВИРОБНИЦТВА, ХВОРИХ НА ГЕНЕРАЛІЗОВАНИЙ ПАРОДОНТИТ 61
- Бекус І.Р. (Тернопіль) ВПЛИВ КАРНІТИНУ ХЛОРИДУ НА ПОКАЗНИКИ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ У ТВАРИН З ГОСТРИМ АЛКОГОЛЬНИМ ОТРУЄННЯМ НА ТЛІ ТРИВАЛОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ КАДМІЮ ХЛОРИДОМ ТА СВИНЦЮ АЦЕТАТОМ 65

## Contents ORIGINAL INVESTIGATIONS

- Maksymovych Ya.S., Drobinska O.V., Ostapchenko L.I. (Kyiv) NITRIC OXIDE SYSTEM ROLE IN DEVELOPMENT AND HEALING OF STRESS-INDUCED INJURIES OF RAT GASTRIC MUCOSA
- Mayor Kh. Ya., Stadnyk V.V., Kinakh M.V., Vlizlo V.V. (Lviv) CONTENT OF PHYSIOLOGICAL PRION AND ITS mRNA UNDER THE INFLUENCE OF PENTOSAN POLYSULFATE
- Hozhenko A.I., Mysula I.R., Susla O.B., Yakubyshyna I.H. (Odessa, Ternopil) METABOLIC CONSTITUENT OF CARDIAC VALVULAR CALCIFICATION IN PATIENTS ON MAINTENANCE HEMODIALYSIS
- Yadlovsky O. Ye., Bobkova L. S. (Kyiv) ANALYSIS OF CHOLINERGIC SYSTEM PARTICIPATION IN REALIZATION OF PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF PYRODAZOL
- Saatov B.T., Umerov O.I. (Tashkent) STUDY OF SKIN AND BLOOD SERUM PHOSPHOLIPIDS IN PATIENTS WITH VITILIGO
- Didovych A.P., Vudmaska I.V., Vishchur O.I. (Lviv) FATTY-ACID PROFILE OF BLOOD PLASMA AND LEUKOCYTES OF RATS FED DIETS CONTAINING DIFFERENT LEVELS OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS
- Georgiyants V.A., Perekhoda L.O., Hlushchenko A.V. (Kharkiv) ANTICONVULSIVE ACTIVITY AND ITS DEPENDENCE ON MOLECULAR STRUCTURE
- Herych O.Kh. (Vinnytsia) INFLUENCE OF DIABETES MELLITUS AND HIGH- FATTY DIET ON ELIMINATION OF MODEL XENOBIOTICS AT RATS
- Tulyakov V.O. (Kharkiv) ANALGESIC ACTION OF GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE WITH PARACETAMOL COMBINATIONS
- Zaichko N.V. (Vinnytsia) INFLUENCE OF HOMOCYSTEINE THIOLACTONE, CYSTEINE, HYDROGEN SULFIDE ON HEMOSTASIS SYSTEM OF RABBITS
- Bereznyakova N.L., Ukrainets I.V., Tugaibey I.A., Gorokhova O.V. (Kharkiv) STUDY OF ANTIHERPES ACTIVITY OF 2-DIETHYLAMINOETHYLAMIDE OF 2-HYDROXY-9-METHYL-4-OXO-4H-PYRIDO-[1,2-A]-PYRIMIDINE-3-CARBOXYLIC ACID IN EXPERIMENTS IN VIVO
- Fedevych Yu.M., Bandrivska N.N. (Lviv) CHANGE OF INDEXES OF LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT DEFENCE IN THE ORAL LIQUID OF WORKERS OF CEMENT PRODUCTION, SUFFERING FROM GENERALIZED PARODONTITIS
- Bekus I.R. (Ternopil) THE INFLUENCE OF CARNITINE CHLORIDE ON THE RESULTS OF LIPID EXCHANGE IN ANIMALS WITH ACUTE ALCOHOLIC POISONING AGAINST A BACKGROUND OF PROLONGED INTOXICATION BY CADMIUM CHLORIDE AND PLUMBUM ACETATE

<i>Щукіна Н.М., Гладченко О.М., Владимірова І.М.</i> (Харків) ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ПРОТИВИРАЗКОВОЇ ДІЇ СКЛАДНОЇ СУБСТАНЦІЇ “ФАМОБРОК”	71	<i>Shchukina N.M., Hladchenko O.M., Vladymyrova I.M.</i> (Kharkiv) THE STUDY OF ANTIULCER ACTION OF THE COMBINED SUBSTANCE “FAMOBROK”
<i>Жадан В.М., Коржов В.І.</i> (Київ) СТАН ГЛУТАТІОНЗАЛЕЖНОЇ ФЕРМЕНТНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ ЗА УМОВ ІНФЕКЦІЙНОЇ ПНЕВМОНІЇ ІЗ СУПУТНИМ ЗАХВОРЮВАННЯМ	75	<i>Zhadan V.M., Korzhov V.I.</i> (Kyiv) STATE OF GLUTATHIONE-DEPENDENT ENZYME SYSTEM OF BLOOD UNDER CONDITIONS OF CONTAGIOUS PNEUMONIA WITH A CONCOMITANT DISEASE
<i>Каплаушенко А.Г., Панасенко О.І., Книш Є.Г., Панасенко Т.В.</i> (Запоріжжя) СПЕКТРАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА 5- <i>R</i> -4- <i>R</i> <sub>1</sub> -1,2,4-ТРИАЗОЛ-3- ТІОНІВ	79	<i>Kaplaushenko A.G., Panasenko O.I., Knysh Ye.H., Panasenko T.V.</i> (Zaporizhzhya) SPECTRAL CHARACTERISTICS OF 5- <i>R</i> -4- <i>R</i> <sub>1</sub> -1,2,4-TRIAZOL-3- THIONS
<i>Євтіфєєва О.А., Здорик О.А., Георгіянц В.А.</i> (Харків) СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПІРИДОКСИНУ ГІДРОХЛОРИДУ В 0,2 % РОЗЧИНІ АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ	86	<i>Yevtifeyeva O.A., Zdoryk O.A., Georgiyants V.A.</i> (Kharkiv) SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF PYRIDOXINE HYDROCHLORIDE IN 0,2 % WATER SOLUTION OF MANUFACTURING EX TEMPORE
<i>Ларіонов В.Б., Борисюк І.Ю., Овчаренко Н.В., Лихота О.Б.</i> (Одеса) ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ФАРМАКОКІНЕТИКИ МЕТАБОЛІЧНОЇ НИЗКИ “ЕТАНОЛ-АЦЕТАЛЬДЕГІД-АЦЕТАТ”	92	<i>Larionov V.B., Borysyuk I.Yu., Ovcharenko N.V., Likhota O.B.</i> (Odessa) COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF METABOLIC LINE “ETHANOL-ACETALDEHYDE- ACETATE” PHARMACOKINETICS
<i>Жуков В.І., Наконечна О.А.</i> (Харків) СТАН СИСТЕМИ МІКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСНЕННЯ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ПРОСТИХ ПОЛІЕФІРІВ	96	<i>Zhukov V.I., Nakonechna O.A.</i> (Kharkiv) INFLUENCE OF SIMPLE POLYETHERS ON MICROSOMAL OXIDATIVE SYSTEM IN RAT ORGANISM
<i>Мазур О.П.</i> (Тернопіль) ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ КОРВИТИНОМ У ХВОРИХ НА АРТЕРІАЛЬНУ ГІПЕРТЕНЗІЮ У ПОЄДНАННІ З ХРОНІЧНИМИ ОБСТРУКТИВНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ЛЕГЕНЬ	100	<i>Mazur O.P.</i> (Ternopil) PECULIARITIES OF LIPID PEROXIDATION DISTURBANCES AND THEIR CORRECTION BY CORVITIN IN PATIENTS WITH BLOOD HYPERTENSION COMBINED WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASES
<i>Макаренко О.А.</i> (Одеса) АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ БІОФЛАВОНІДІВ ЦИТРУСОВИХ	106	<i>Makarenko O.A.</i> (Odessa) ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CITRUS BIOFLAVONOIDS
<i>Тимошик Ю.В., Петренко В.В.</i> (Запоріжжя) ЗАСТОСУВАННЯ АЛЮМІНОНУ ДЛЯ РОЗРОБКИ СПОСОБУ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДИЛТІАЗЕМУ ТА ВАЛІДАЦІЯ АНАЛІТИЧНОЇ МЕТОДИКИ	111	<i>Tymoshyk Yu.V., Petrenko V.V.</i> (Zaporizhzhya) APPLICATION OF ALUMINON FOR DEVELOPMENT OF METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF DILTIAZEM AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD
<i>Койро О.О., Степанова С.І., Штриголь С.Ю.</i> (Харків) ВИВЧЕННЯ МІНЕРАЛЬНОГО СКЛАДУ ЛИСТЯ ТА ЕКСТРАКТУ ЯГЛИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ	116	<i>Koyro O.O., Stepanova S.I., Shtryhol S.Yu.</i> (Kharkiv) INVESTIGATION OF MINERAL COMPOSITION OF LEAVES AND EXTRACT OF AEGOPODIUM PODAGRARIA L.
<i>Сирова Г.О.</i> (Харків) ВИВЧЕННЯ В ЕКСПЕРИМЕНТІ ПРОТИБОЛЬОВОЇ ТА ПРОТИСУДОМНОЇ ДІЇ НОВОЇ КОМБІНАЦІЇ, ЩО МІСТИТЬ КАРБАМАЗЕПІН	119	<i>Syrova H.O.</i> (Kharkiv) INFLUENCE OF ANALGETIC AND ANTICONSULSANT ACTIVITY OF NEW COMBINATION WITH CARBAMAZEPINUM IN EXPERIMENT

УДК 577.152.151+616.33-002.44

**РОЛЬ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ В ДИНАМІЦІ РОЗВИТКУ І ЗАГОЄННЯ СТРЕСІНДУКОВАНИХ УРАЖЕНЬ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ШЛУНКА ЩУРІВ****Я.С. Максимович, О.В. Дробінська, Л.І. Остапченко**  
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

*Досліджено активність синтази оксиду азоту при розвитку та загоєнні стресіндукованих уражень слизової оболонки шлунка. Встановлено, що підвищення активності ферменту супроводжується розвитком деструктивних уражень, що можуть бути спричинені зростанням рівня як самого оксиду азоту, так і його високо-токсичної похідної – пероксинітриду. Блокування активності NO-синтази призводить до зменшення кількості й площі виразок у всі терміни досліджень.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** оксид азоту, синтаза оксиду азоту, пероксинітрид, виразка шлунка.

**ВСТУП.** У шлунково-кишковому тракті оксид азоту (NO) бере участь у регуляції тонуусу гладеньких м'язів, зокрема впливає на перистальтику кишечника, евакуаторну функцію шлунка та антральну моторику. Крім того, NO як вторинний месенджер є модулятором секреції кислоти та слизу, залучений у процеси кровопостачання органів травлення. За фізіологічних умов оксид азоту діє як ендогенний медіатор, який відповідає за підтримання цілісності та відновлення тканин, проявляє гастропротекторні властивості, попереджуючи ураження слизової оболонки шлунка різноманітними пошкоджувальними факторами (етанол, мінеральні та жовчні кислоти тощо) [11, 16]. Однак високі концентрації NO є однією з причин розвитку багатьох хвороб шлунково-кишкового тракту, зокрема пептичної виразки, хронічного гастриту, раку, бактеріальних гастроентеритів, а також гострих та хронічних запалень кишечника [6, 11].

На сьогодні дані літератури щодо участі різних форм синтази оксиду азоту в процесах гартропротекції та цитотоксичності доволі суперечливі. Показано, що надмірне продукування оксиду азоту за рахунок активації індукцибельної ізоформи синтази оксиду азоту (iNOS) призводить до генерації пероксинітриду (ONOO<sup>-</sup>) – сильного окисника, високоактивної та токсичної сполуки, що утворюється при взаємодії NO із супероксидним радикалом [6].

Пероксинітрид бере участь у багатьох хімічних реакціях в біологічних системах, у тому числі в нітруванні залишків тирозину в білках, ініціації перекисного окиснення ліпідів, окисненні біологічних тіолів тощо. Ця сполука може інгібувати аконітазу та транспорт електронів у мітохондріях, порушуючи енергетичний метаболізм клітини, а також викликати розриви ланцюгів ДНК, що призводить до апоптозу і мутацій клітин. Але рядом досліджень було підтверджено, що оксид азоту, утворений iNOS, у певних випадках сприяє відновленню пошкоджених тканин [7].

В літературі є дані, що NO, синтезований конститутивними ізоформами NOS (cNOS), відповідає за попередження розвитку пошкоджень та відновлення цілісності тканин, однак було встановлено, що підвищення активності cNOS спричиняє патологічні зміни клітин [11].

Метою роботи було дослідити вплив інгібіторів NO-синтази на розвиток і загоєння виразки шлунка у щурів за умов експериментальної моделі стресової виразки.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Експерименти проведено на нелінійних білих щурах-самцях масою 250-280 г. Їх утримували на стандартному раціоні віварію. За добу до проведення експерименту тварини мали доступ лише до води. Експериментальну модель стресової виразки відтворювали шляхом занурення знерухомлених щурів у воду за рекомендаціями [13]. Неселективний інгібітор NO-синтази L-NAME (2,5 мг/кг) [15] та специфічні інгібіто-

© Я.С. Максимович, О.В. Дробінська, Л.І. Остапченко, 2009.

ри iNOS і nNOS – аміногуанідин (50 мг/кг) [14] та 7-нітроіндазол (50 мг/кг) [1] вводили внутрішньоочеревинно за 5 хв до впливу уражувачого фактора. Візуально досліджували стан слизової оболонки шлунка, активність NO-синтази [8] та вміст пероксинітриту [9] за умов впливу стресового чинника протягом 0,5, 1, 2 і 3 год та 12 і 24 год після припинення впливу стресу. Вміст білка визначали за методом Бредфорд [3]. Статистичну обробку результатів та побудову графіків проводили методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** При візуальному дослідженні стану слизової оболонки

шлунка щурів встановлено, що деструктивні ураження залежать від тривалості дії стресового чинника. Так, при 30-хвилинному впливі стресового фактора лише в одній тварині з 10 виявлено 2 виразки загальною площею 2 мм<sup>2</sup>, однак слизова оболонка при цьому була гіперемована. Збільшення тривалості дії пошкоджувального чинника призводило до зростання ступеня ураження тканин шлунка, яке досягало максимальних значень на третю годину і становило (10,5±1,7) та (17,68±3,5) мм<sup>2</sup>. При цьому було зафіксовано значні крововиливи у порожнину шлунка. Через 12 та 24 год після припинення дії стресу спостерігалось різке зниження ступеня ураження слизової оболонки шлунка на 76, 83, 89 і 88 % (табл. 1).

Таблиця 1 – Ураження слизової оболонки шлунка при дії стресу та інгібіторів NO-синтази (n=10, M±m)

Групи тварин	0,5 год		1 год		2 год		3 год		12 год		24 год	
	кількість виразок	площа виразок, мм <sup>2</sup>	кількість виразок	площа виразок, мм <sup>2</sup>	кількість виразок	площа виразок, мм <sup>2</sup>	кількість виразок	площа виразок, мм <sup>2</sup>	кількість виразок	площа виразок, мм <sup>2</sup>	кількість виразок	площа виразок, мм <sup>2</sup>
стрес	1 вир. в 1 шл.	2	1,3±0,28	2,16±0,31	5,0±0,98	8,38±1,78	10,5±1,7	17,68±3,5	2,5±0,34*	2,95±0,37*	1,2±0,22*	2,1±0,3*
стрес + L-NAME, 2,5 мг/кг	0	0	0	0	1,0±0,11	0,64±0,12	1 вир. в 1 шл.	1	0	0	0	0
стрес + нітроіндазол, 50 мг/кг	0	0	1±0,11	1,25±0,22	1,0±0,11	1,25±0,22	1,5±0,33*	4,88±0,88*	1 вир. в 1 шл.	1	0	0
стрес + аміногуанідин, 50 мг/кг	1,5±0,33	2,25±0,45	2±0,40	1,64±0,34	7,0±1,2	7,08±1,23	10,25±1,23	17,8±3,3	18,5±3,30*	14,3±2,34*	5,5±0,1*	5,23±0,98*

Примітка. \* – p≤0,05 відносно групи, що піддавалася 3-годинній дії стресу.

При дослідженні активності NO-синтази в динаміці розвитку стресіндукованих виразкових уражень слизової оболонки шлунка щурів нами було встановлено статистично достовірне підвищення активності ферменту на 54, 234 та 485 % (30 хв, 1, 2 год), що досягало максимальних значень при 3-годинному впливі стресового фактора (зростання активності ферменту на 670 %) порівняно з контрольною групою тварин. Через 12 і 24 год після припинення дії стресу активність NO-синтази знижувалась на 72 та 78 %, але не досягала фізіологічних значень (рис. 1).

Результати наших досліджень дозволяють припустити, що залежно від терміну дії стресового чинника зростає активність NO-синтази, що призводить до підвищення рівня азоту. Пошкоджувальна дія оксиду азоту проявляється

через декілька механізмів, оскільки токсичним агентом може бути як сам NO, так і продукти його перетворення. Внутрішньоклітинними мішенями для оксиду азоту є плазматичні мембрани та білки, що відповідають за транспорт речовин та передачу сигналу, мітохондрії, ядра тощо. Так, оксид азоту, володіючи високою спорідненістю із залізо- та сірковмісними речовинами, активно зв'язується з гемами (гемоглобіну, цитохромів тощо) та Fe-S-центрами (аконітаза, рибонуклеотидредуктазний комплекс) різних білків і у великій кількості блокує важливі внутрішньоклітинні процеси, зокрема утворення АТФ (інгібуючи гліцеральдегідфосфатдегідрогеназу та аконітазу), синтез ДНК і поділ клітини (інактивуючи рибонуклеотидредуктазний комплекс, що необхідний для синтезу нуклеотидів). Крім того, NO може

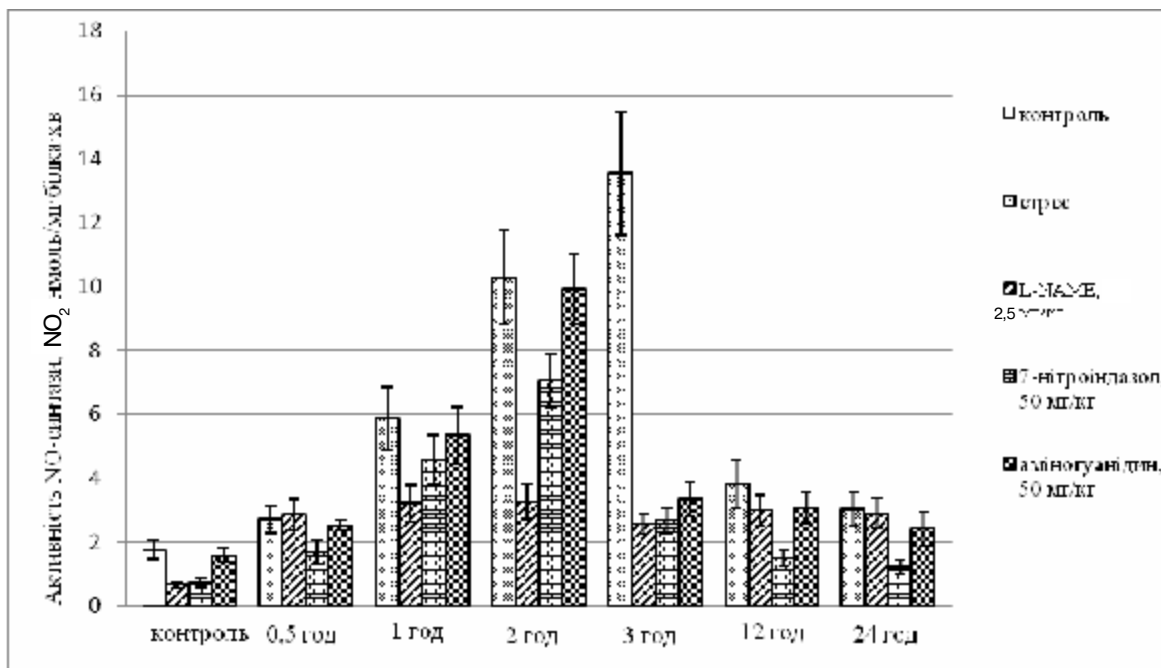


Рис. 1. NO-синтазна активність в гомогенаті клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов стресової моделі виразки і при введенні інгібіторів: \* –  $p \leq 0,05$  відносно контролю; \*\* –  $p \leq 0,05$  відносно групи, що піддавалася 3-годинній дії стресу.

спричиняти розриви спіралей ДНК, утворення міжланцюгових зшивок тощо, що є додатковим фактором загибелі клітини [5].

Оскільки оксид азоту є доволі потужним вазодилатором, то надмірна кількість NO призводить до значного розслаблення судин слизової оболонки шлунка, внаслідок чого порушується її кровопостачання, що може бути однією з причин розвитку деструктивних уражень. Так, було показано, що внутрішньоартеріальне введення екзогенного донора оксиду азоту нітроприсида натрію призводило через 10 хв до видимих макроскопічних пошкоджень слизової оболонки шлунка [10].

Відомо, що при запаленні активуються процеси ліпопероксидації, знижується функціональна активність антиоксидантної системи захисту, що призводить до збільшення вмісту супероксид-аніона ( $O_2^{\cdot-}$ ). Такі процеси сприяють посиленню продукування NO й утворенню пероксинітриду. Пероксинітрид здатний ініціювати вільнорадикальні реакції, що призводить до порушення мікроциркуляції крові, пошкоджує тканини шляхом активації циклооксигенази, ключового ферменту синтезу простагландинів, які є сильними медіаторами запалення. Такі процеси є причиною виразкових дефектів при ульцерогенезі, що було нами підтверджено при візуальному дослідженні слизової оболонки шлунка щурів.

Нами було визначено вміст пероксинітриду за умов розвитку і загоєння стресіндукова-

них уражень слизової оболонки шлунка щурів. Встановлено, що при 1-, 2-, 3-годинній дії стресу вміст пероксинітриду в слизовій оболонці шлунка збільшувався на 20, 33 та 47 % відповідно порівняно з контрольною групою тварин. Через 12 і 24 год після припинення негативного впливу рівень пероксинітриду був у межах контрольних значень (рис. 2). При застосуванні селективних і неселективних інгібіторів NO-синтази нами не було зафіксовано відхилень вмісту пероксинітриду.

Для вивчення ролі різних ізоформ NO-синтази в механізмах розвитку і загоєння виразкових уражень слизової оболонки шлунка щурів за умов впливу стресового чинника ми дослідили вплив неселективного (метилового ефіру  $N^G$ -нітро-L-аргініну, L-NAME) і селективних інгібіторів нейрональної ізоформи NO-синтази – 7-нітроіндазолу та індукційної – аміногуанідину.

При застосуванні неселективного інгібітора L-NAME активність NO-синтази була статистично достовірно вищою відносно контрольних значень на 63, 82, 85, 46,70 та 64 % у всі терміни досліджень. Разом із тим, активність ферменту відносно показників 30-хвилинного, 1-, 2-, 3-годинного впливу стресового фактора і через 12 та 24 год після припинення дії стресу була нижчою, відповідно, на 45, 68, 81, 22 та 5 %.

Зменшення активності ферменту під впливом L-NAME супроводжувалося гастропротек-

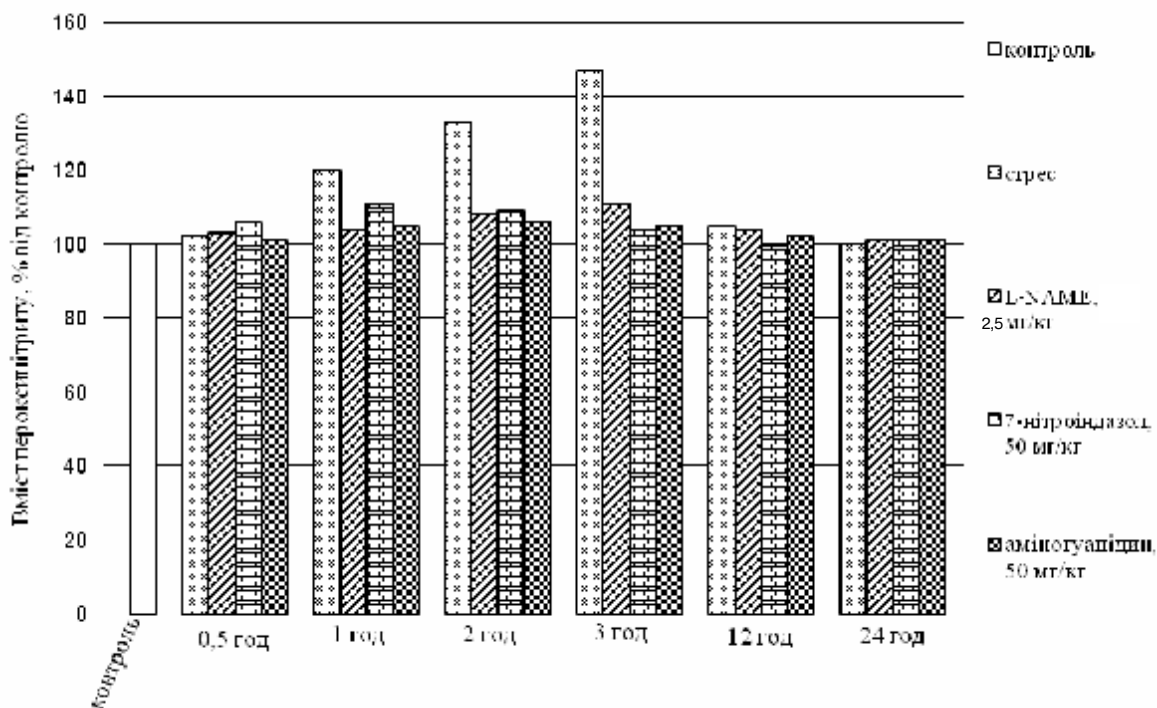


Рис. 2. Вміст пероксинітриту в гомогенаті клітин слизової оболонки шлунка щурів за умов стресової моделі виразки і при введенні інгібіторів: \* –  $p \leq 0,05$  відносно контролю.

торним ефектом, оскільки навіть 3-годинний вплив стресового фактора не спричиняв значних пошкоджень слизової оболонки шлунка: не було зафіксовано виразок, однак було відмічено ерозії та значну гіперемію слизової оболонки шлунка. Отримані нами результати збігаються з даними літератури, де показано, що застосування L-NAME зменшує ступінь ураженості слизової оболонки шлунка, викликаній ібупрофеном [17].

Активність NO-синтази після застосування інгібітора нейрональної ізоформи синтази оксиду (7-нітроіндазолу) за умов впливу стресового чинника була статистично достовірно вищою відносно контрольних значень на 159, 300, 52 % у всі терміни досліджень. Разом із тим, активність ферменту відносно показників 30-хвилинного, 1-, 2-, 3-годинного впливу стресового фактора була нижчою, відповідно, на 39, 22, 31 та 80 %. Через 12 та 24 год після припинення дії пошкоджувального фактора активність NO-синтази була в межах контрольних величин.

При візуальному дослідженні слизової оболонки шлунка щурів нами встановлено, що застосування інгібітора нейрональної ізоформи синтази оксиду (7-нітроіндазолу) призвело до зменшення кількості й площі виразок у всі терміни досліджень на 23, 80, 86, 100, 100 та 42, 85, 72, 100, 100 % порівняно з групою тварин, які підпадали під дію стресового

чинника. Отже, можна стверджувати, що оксид азоту, який продукується внаслідок активації нейрональної ізоформи NO-синтази, проявляє цитотоксичні властивості.

Оскільки нейрональна форма NO-синтази присутня у нитрергічних нейронах, які іннервують судини органів шлунково-кишкового тракту, то надмірна кількість оксиду азоту може призводити до незворотної релаксації гладеньких м'язів, а отже, і до порушення кровопостачання слизової оболонки шлунка, внаслідок чого можливий розвиток ішемії судин, тканинної гіпоксії, ацидозу та некрозу клітин епітелію, утворення тромбів та крововиливів, що є однією з причин розвитку деструктивних уражень слизової оболонки шлунка [17].

Як відомо, оксид азоту залучений в механізми неспецифічного імунітету і частково в комплексний механізм тканинного пошкодження через модуляцію запального процесу та апоптозу. Розвиток асептичного запалення має двофазний характер, при цьому кожна фаза асоційована з певними ізоформами NO-синтази. Рання фаза запальної реакції характеризується підвищенням продукування гістаміну, брадикініну, простагландинів та лейкотриєнів. На даному етапі проходить стимуляція продукування оксиду азоту за рахунок активації нейрональної NOS, локалізованої в чутливих нервах. Паралельно посилюється продукування NO за рахунок активації ендо-



теліальної ізоформи NOS. У клітинах ендотелію кровоносних судин оксид азоту активує розчинну гуанілатциклазу, що призводить до синтезу cGMP і викликає релаксацію гладком'язових клітин судин, в результаті чого збільшується судинна проникність. Конститутивні та індукційна ізоформи NO-синтази продукують оксид азоту в ранній фазі запалення, при цьому виявляється їх прозапальний ефект, що, можливо, є додатковим чинником розвитку уражень слизової оболонки шлунка [2].

Активність NO-синтази після застосування інгібітора індукційної ізоформи синтази аміногуанідину за умов впливу стресового чинника була статистично достовірно вищою відносно контрольних значень на 44, 203, 464, 90, 76 та 37 % у всі терміни досліджень. Разом із тим, активність ферменту щодо показників 30-хвилинного, 1-, 2-, 3-годинного впливу стресового фактора і через 12 та 24 год після припинення його негативної дії була нижчою, відповідно, на 7, 9, 3, 75, 19, 21 %.

При візуальному дослідженні слизової оболонки шлунка щурів нами було встановлено, що застосування інгібітора індукційної ізоформи синтази аміногуанідину за умов впливу стресового чинника не призводило до зменшення кількості й площі деструктивних пошкоджень порівняно з групою тварин, які

підпадали під дію негативного фактора у всі терміни досліджень.

Оксид азоту, який продукується iNOS, залучений у механізми захисту слизової оболонки шлунка щурів, проявляючи гастропротекторну дію шляхом індукції апоптозу клітин і таким чином редукуючи пізню (уповільнену) фазу запалення, яка пов'язана з локальною лейкоцитарною активністю та інфільтрацією. Крім того, NO-синтаза контролює біосинтез інтерлейкінів IL-4, IL-11 та IL-13, які відносять до інгібіторів реакцій запалення [2].

**ВИСНОВКИ.** Однією з причин розвитку деструктивних уражень слизової оболонки шлунка є активація NO-синтази. Залежно від терміну дії стресового чинника відбуваються підвищення рівня оксиду азоту й утворення пероксинітриту. Блокування активності NO-синтази призводить до зменшення кількості і площі виразок у всі терміни досліджень. Отримані нами результати щодо цитотоксичних властивостей оксиду азоту, який продукується нейрональною ізоформою NO-синтази, підтверджуються даними літератури, де показано, що L-NAME дозозалежно пригнічував утворення супероксидного радикала нейрональною NO-синтазою, що може попереджувати формування пероксинітриту та виразкоутворення [12].

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Москвин А.Н., Жилияев С.Ю., Шаратов О.И. Мозговой кровоток модулирует нейротоксическое действие гипербарического кислорода с помощью нейронального и эндотелиального оксида азота // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2002. – **88**, № 7. – С. 873-880.

2. Сомова Л.М., Плехова Н.Г. Оксид азота как медиатор воспаления // Вестник ДВО РАН. – 2006. – № 2. – С. 77-80.

3. Шоно Н.И., Баскаева Е.М. Метод определения белка по Бредфорд: область применения, преимущества, недостатки // Лаб. дело. – 1980. – № 4. – С. 4-7.

4. Abraham P., Indirani K., Desigamani K. Nitro-Arginine Methyl Ester, A Non-Selective Inhibitor Of Nitric Oxide Synthase Reduces Ibuprofen-Induced Gastric Mucosal Injury In The Rat // Digestive Diseases And Sciences. – 2005. – **50**. – P. 1632-1640.

5. Arzumani V., Stankevicius E., Laukevicius A., Klvelaitis E. Mechanisms of nitric oxide synthesis and action in cells // Medicina. – 2003. – **39**, № 6. – P. 535-541.

6. Cho C.H. Current roles of nitric oxide in gastrointestinal disorders // Journal of Physiology. – 2001. – **95**. – P. 253-256.

7. Goldstein S., Merlyni G. The chemistry of peroxy-nitrite: implications for biological activity // Methods Enzymol. – 2008. – **436**. – P. 49-61.

8. Hevel J.M., White K.A., Marletta M.A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. – 1991. – **266**, № 34. – P. 22789-22791.

9. Kooy N.W., Royall J.A., Ischiropoulos H. Oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein by peroxy-nitrite // Free Radic. Res. – 1997. – **27**. – P. 245-254.

10. Lamarque D., Whittle B.J. Involvement of superoxide and xanthine oxidase in neutrophil-independent rat gastric damage induced by NO donors. // Br. J. Pharmacol. – 1995. – **116**. – P. 1843-1848.

11. Martin M.J., Jimenez M.D., Motilva V. New Issues about Nitric Oxide and its Effects on the Gastrointestinal Tract // Current Pharmaceutical Design. – 2001. – **7**. – P. 881-908.

12. Pou S., Pous W.S., Bredt D.S. et al. Generation Of Superoxide By Purified Brain Nitric Oxide Synthase // The Journal Of Biological Chemistry. – 1992. – **267**, № 34. – P. 24173-24176.

13. Takagi K., Okabe S. The effects of drugs on the production and recovery processes of the stress ulcer // Jpn. J. Pharmacol. – 1968. – **18**. – P. 918.

14. Takeuchi K., Hatazawa R., Tanigami M. et al. Role of endogenous nitric oxide (NO) and NO synthases in healing of indomethacin-induced intestinal ulcers in rats // *Life Sciences*. – 2007. – **80**. – P. 329-336.

15. Takeuchi K., Yasuhiro T., Asada Y., Sugawa Y. Role of nitric oxide in pathogenesis of aspirin-induced gastric mucosal damage in rats // *Digestion*. – 1998. – **59**. – P. 298-307.

16. Tatemichi M., Ogura T., Sakurazawa N. et al. Roles of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers // *Int. J. Exp. Path.* – 2003. – **84**. – P. 213-220.

17. Toda N., Herman A.G. Gastrointestinal Function Regulation by Nitroergic Efferent Nerves // *Pharmacol. Rev.* – 2005. – **57**, № 3. – P. 315-338.

## РОЛЬ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ И ЗАЖИВЛЕНИЯ СТРЕССИНДУЦИРОВАННЫХ ПОРАЖЕНИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА КРЫС

**Я.С. Максимович, О.В. Дробинская, Л.И. Остапченко**  
КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

### Резюме

*Исследовано активность синтазы оксида азота во время развития и заживления стрессиндуцированных поражений слизистой оболочки желудка. Установлено, что повышение активности фермента сопровождается развитием деструктивных поражений, что могут быть вызваны возрастанием уровня как оксида азота, так и его высокотоксичной производной – пероксинитрита. Блокирование активности NO-синтазы приводит к уменьшению количества и площади язв во все сроки исследований.*

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **оксид азота, синтаза оксида азота, пероксинитрит, язва желудка.**

## NITRIC OXIDE SYSTEM ROLE IN DEVELOPMENT AND HEALING OF STRESS INDUCED INJURIES OF RAT GASTRIC MUCOSA

**Ya.S. Maksymovych, O.V. Drobinska, L.I. Ostapchenko**  
KYIV NATIONAL UNIVERSITY BY TARAS SHEVCHENKO

### Summary

*Nitric oxide synthase activity during development and healing of stress induced injuries of rat gastric mucosa was investigated. It was established that increasing of the enzyme activity is accompanied with development of destructive damages. These damages can be caused both by increase of nitric oxide level and its high-toxic derivation – peroxynitrite. The reduction of NO-synthase activity results in decreasing the number and areas of ulcers in any terms of research.*

KEY WORDS: **nitric oxide, nitric oxide synthase, peroxynitrite, gastric ulcer.**

Отримано 16.09.2008 р.

Адреса для листування: Я.С. Максимович, вул. Княжий затон, 16а, кв. 80, Київ, 02095, Україна.

## ВМІСТ ФІЗІОЛОГІЧНОГО ПРІОНА ТА ЙОГО мРНК ЗА ДІЇ ПЕНТОСАН ПОЛІСУЛЬФАТУ

Х.Я. Майор<sup>1</sup>, В.В. Стадник<sup>1</sup>, М.В. Кінах<sup>2</sup>, В.В. Влізло<sup>1</sup>  
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН УААН<sup>1</sup>  
ІНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ МОЗ УКРАЇНИ<sup>2</sup>

*Пентосан полісульфат, введений щурам внутрішньом'язово, спричиняє зменшення вмісту фізіологічного пріона у селезінці, тонкому кишечнику та скелетних м'язах. Досліджуваний препарат не впливає на рівень мРНК фізіологічного пріона у даних органах і тканинах тварин. Водночас дози пентосан полісульфату, які призводять до зниження вмісту PrP<sup>C</sup>, не спричиняють побічних ефектів у системі гемостазу організму щурів.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: щури, селезінка, кишечник, м'язи, фізіологічний пріон, мРНК, пентосан полісульфат, гемостаз.

**ВСТУП.** У процесі розвитку пріонних інфекцій або трансмісивних спонгіоформних енцефалопатій (ТСЕ) ключову роль відіграє фізіологічний пріон (PrP<sup>C</sup>) – конститутивний білок ЦНС та інших тканин організму [6]. Особливість усіх ТСЕ полягає в тому, що за даних захворювань збудником є білок – пріон. Пріонні інфекції розвиваються при накопиченні у нейронах атипової, резистентної до дії протеїнази ізоформи PrP<sup>C</sup>, названої PrP<sup>Sc</sup>. Згідно із сучасними уявленнями, єдиним попередником PrP<sup>Sc</sup> є фізіологічний пріон, який за нез'ясованими механізмами трансформується у патологічну нерозчинну конформацію. ТСЕ не піддаються лікуванню, вони є в 100 % випадків летальними та діагностуються лише після смерті.

Препарати глікозаміногліканового ряду, а також їх семісинтетичні аналоги, до яких належить пентосан полісульфат (ППС), можуть бути засобами, перспективними для профілактики пріонних інфекцій [4]. ППС знижує рівень PrP<sup>Sc</sup> в інфікованих клітинах та спричиняє сповільнення патогенезу в мишей і хом'яків [9]. Інтравентрикулярне введення препарату пролонгує інкубаційний період інфікованих мишей [5]. У попередніх дослідженнях нами було показано, що пентосан полісульфат знижує вміст фізіологічного пріона у довгастому мозку та великих півкулях головного мозку [2].

Метою роботи було дослідити вплив ППС на вміст PrP<sup>C</sup> та його мРНК у селезінці, тонкому кишечнику та скелетних м'язах, а також встановити стан системи гемостазу за введення різних доз даного антикоагулянта.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Матеріалом для дослідження були лабораторні щури *Rattus*

*norvegicus* var. *Alba*, лінії Vistar. Досліди проводили на зразках тканин та органів, відібраних після смерті тварин. Для досліджень відбирали статевозрілих щурів-самців масою 250-350 г. Піддослідним тваринам внутрішньом'язово вводили пентосан полісульфат у концентраціях 0,1; 0,5 та 1 мг/кг/день. Щурам контрольної групи вводили еквівалентні дози фізіологічного розчину. Концентрації препарату та тривалість експерименту підбирали згідно з довідковими даними про оптимальні терапевтичні дози. Скомпенсований комбікорм та вода були доступні тваринам *ad libitum* до та після експериментальних процедур.

Ін'єкції здійснювали один раз на 24 год впродовж 7-ми діб. На сьому добу тварин декапітували під легким ефірним наркозом. Для досліджень відбирали селезінку, тонкий кишечник, м'яз стегна та кров. Експерименти зі щурами проводили згідно з правилами Європейської конвенції про гуманне ставлення до лабораторних тварин [7].

Точкова гібридизація вмісту фізіологічного пріона. Після розморожування тканину лізували у десятикратному об'ємі спеціального буфера (10 % N-лаурилсаркозин, 10 мкМ фенілметилсульфонілфторид, 10 мкМ N-етилmaleїмід в 0,01 M Na-фосфатному буфері, 0,001 % коктейль інгібіторів протеїнази – Sigma, Germany, pH 7,4). Далі зразки центрифугували при 5200 g протягом 5 хв при 4 °C. У готових лізатах вимірювали концентрацію білка методом Лоурі (Сімко, Україна). Для вирівнювання об'ємів та концентрацій загального білка зразки розводили буфером (25 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, pH 7,4). Далі розведені проби наносили на нітроцелюлозну мембрану (Millipor). Після нанесення контрольних та дослідних зразків мембрану інкубували з моноклональними анти-PrP антитілами 6H4 та

поліклональними козячими антимишачими антитілами, кон'югованими з лужною фосфатазою. Детекцію імунних комплексів здійснювали з використанням комерційного розчину субстрату для лужної фосфатази – CDP-Star (Tropix, GB). Візуалізацію проводили за допомогою рентгенівської плівки ECL HyperFilm (Amersham, USA).

Визначення матричної РНК (мРНК) за допомогою ЗТ-ПЛР (RT-PCR). Загальну РНК виділяли стандартним методом із застосуванням тризолу [5]. Для RT були використані праймери 5'-ATGGCGAACCTTGGCTACTT-3' та 5'-TCATCCCACGATCAGGAAGA-3'.

ЗТ-ПЛР проводили у 50  $\mu$ л реакційної суміші, яка містила 1 $\times$ PCR буфер (10 mM Tris-HCl [pH 8,3], 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl), кожний дезоксинуклеотидтрифосфат у концентрації 400  $\mu$ M, 0,2  $\mu$ г (від 30 до 50 пмоль) антисенсового праймеру, 10 U РНазину та 7,5 U зворотної транскриптази з вірусу пташиного мієлобластозу. Реакцію проводили 1 год при 42 °С. Для PCR готували 50  $\mu$ л реакційної суміші, яка містила 1 $\times$ PCR буфер з 10 U Taq полімерази та 0,2  $\mu$ г сенс праймеру. Термоциклічна програма включала в себе 2 хв при 94 °С, 40 циклів по 30 с при 94 °С, 1 хв при 49 °С, 1 хв при 72 °С та фінальну інкубацію 10 хв при 72 °С. Продукт RT-PCR аналізували шляхом агарозного гель-електрофорезу із зафарбовуванням ДНК бромистим етидієм та візуалізацією в УФ-світлі.

Дослідження показників системи гемостазу. Дані дослідження проводили з використанням загальновідомих методик клінічної лабораторної діагностики порушень функціонування системи коагуляції, а саме: протромбіновий час за А.Дж. Квік (1974), тромбіновий час за Е. Сірмаї (1957), час рекальцифікації за Х.Д. Бергерхоф (1954), кількість фібриногену в крові за Р.А. Рутберг та ін. [1].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Результати точкової гібридизації показали, що введення пентосан полісульфату призводить до значного зниження вмісту фізіологічного пріона у селезінці, скелетних м'язах та тонкому кишечнику щурів. Найбільш ефективний інгібуючий ефект спричинили дози 1 та 0,5 мг/кг/день пентосан полісульфату (рис. 1).

Важливим етапом регуляції біосинтезу білка є стадія трансляції. Вивчення впливу пентосан полісульфату на вміст мРНК фізіологічного пріона показало, що препарат не впливає на процес трансляції. В усіх досліджуваних органах вміст мРНК за дії різних концентрацій ППС зберігався на сталому рівні (рис. 2).

Таким чином, зниження вмісту фізіологічного пріона у периферичних пріонреплікуючих органах щурів при внутрішньом'язовому введенні пентосан полісульфату не пов'язане із пригніченням трансляції його мРНК, а може бути наслідком ендоцитозу PrP<sup>C</sup> з наступною його протеолітичною деградацією. Адаже встановле

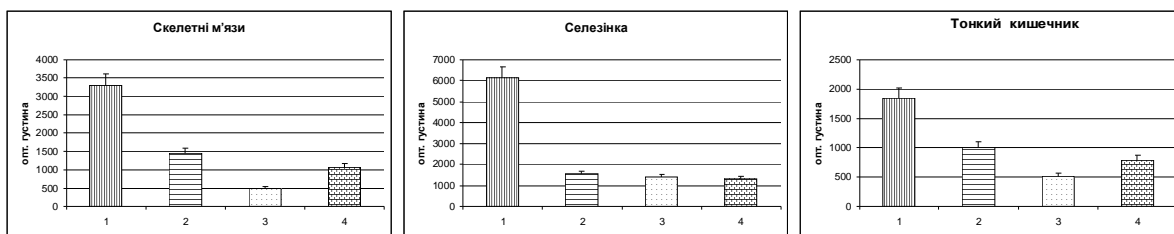


Рис. 1. Результати точкової гібридизації загального вмісту фізіологічного пріона при введенні пентосан полісульфату лабораторним тваринам.

Примітки. Тут і на наступному рисунку: 1 – контроль; 2 – ППС у дозі 0,1 мг/кг/день; 3 – ППС у дозі 0,5 мг/кг/день; 4 – ППС у дозі 1 мг/кг/день.

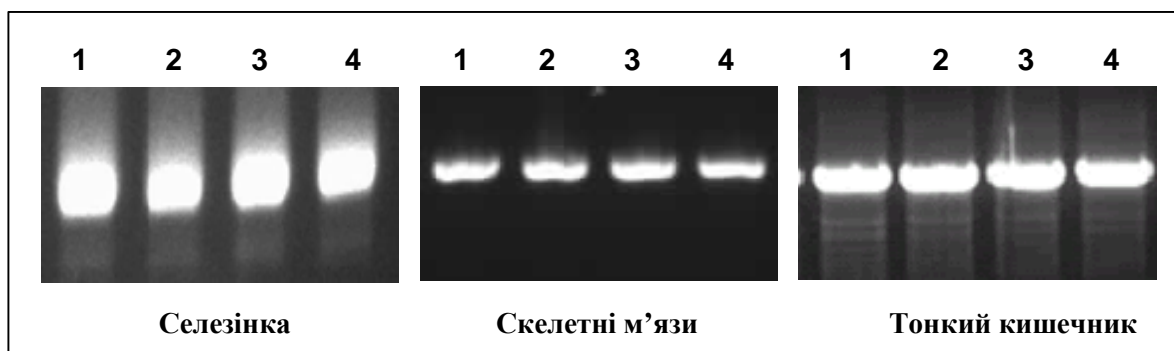


Рис. 2. Вміст мРНК фізіологічного пріона у лабораторних тварин при введенні пентосан полісульфату.

но, що ППС взаємодіє з фізіологічним пріоном через сульфатні групи з амінокислотними залишками аргініну в положеннях 148 та 151 [3].

Як лікарський засіб пентосан полісульфат є синтетичним антикоагулянтом, який, діючи через механізм фібринолізу, запобігає розвитку тромбозів і лізує утворені тромби за рахунок підвищення ендogenousого фібринолітичного потенціалу.

Нами перевірено вплив використаних концентрацій пентосан полісульфату на систему коагуляції (табл. 1). У результаті було встанов-

лено відсутність будь-яких вірогідних змін з боку тромбоцитарної та сироваткової ланок системи гемостазу, що вказує на перспективність застосування пентосан полісульфату як протипріонного агента, який не спричиняє додаткових побічних ефектів, зважаючи на свою пряму фармакологічну дію. Відсутність змін з боку системи гемостазу при введенні досліджуваних концентрацій ППС зумовлена тим, що вони є набагато нижчими порівняно з дозами, які застосовують при профілактиці та лікуванні тромбозів.

Таблиця 1 – Показники системи коагуляції за введення ППС

Показник	Контроль	0,1 мг/кг/день PPS	0,5 мг/кг/день PPS	1 мг/кг/день PPS
Тромбоцити, $\times 10^9 \text{ л}^{-1}$	250 $\pm$ 38	234 $\pm$ 30	245 $\pm$ 27	255 $\pm$ 31
<b>Тромбоцитограма</b>				
юних, %	0,28 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,08
зрілих, %	92,3 $\pm$ 0,54	91,6 $\pm$ 1,87	91,0 $\pm$ 1,45	95,3 $\pm$ 1,99
старих, %	3,8 $\pm$ 0,44	4,1 $\pm$ 0,74	3,9 $\pm$ 0,37	3,7 $\pm$ 0,42
дегенеративних, %	0,03 $\pm$ 0,008	0,04 $\pm$ 0,007	0,03 $\pm$ 0,009	0,03 $\pm$ 0,003
форм подразнення, %	1,4 $\pm$ 0,25	1,30 $\pm$ 0,14	1,38 $\pm$ 0,17	1,21 $\pm$ 0,20
Адгезивність тромбоцитів, %	38,3 $\pm$ 4,50	37,1 $\pm$ 3,42	35,8 $\pm$ 2,45	39,4 $\pm$ 3,82
Агрегація тромбоцитів, с	32 $\pm$ 15	28 $\pm$ 11	35 $\pm$ 10	37 $\pm$ 19
<b>Ретракція згустка крові</b>				
якісний метод, хв	44 $\pm$ 15	47 $\pm$ 20	41 $\pm$ 15	43 $\pm$ 9
кількісний метод, %	74 $\pm$ 18	70 $\pm$ 12	77 $\pm$ 14	78 $\pm$ 8
Фібриноген, г/л	3,25 $\pm$ 0,48	3,20 $\pm$ 0,36	3,05 $\pm$ 0,37	3,28 $\pm$ 0,39
Час згортання, с	438 $\pm$ 57	450 $\pm$ 42	439 $\pm$ 51	461 $\pm$ 58
Протромбіновий індекс, %	94,6 $\pm$ 5,36	92,1 $\pm$ 8,52	90,1 $\pm$ 10,54	89,8 $\pm$ 9,47
Тромбіновий час, с	32 $\pm$ 3	31 $\pm$ 4	35 $\pm$ 5	33 $\pm$ 4
Активованій час рекальцифікації крові, с	60 $\pm$ 7	62 $\pm$ 4	61 $\pm$ 4	65 $\pm$ 3
Активованій частковий тромбопластиновий час, с	36 $\pm$ 3	35 $\pm$ 4	37 $\pm$ 5	36 $\pm$ 5
Фактор XIII, %	104 $\pm$ 16	101 $\pm$ 10	108 $\pm$ 12	95 $\pm$ 18
<b>Антитромбін III, %</b>	108 $\pm$ 7	114 $\pm$ 8	111 $\pm$ 10	101 $\pm$ 9
Фібринолітична активність, с	625 $\pm$ 87	637 $\pm$ 62	618 $\pm$ 45	652 $\pm$ 55
Продукти деградації фібрину і фібриногену, мкг/мл	3,54 $\pm$ 0,78	3,12 $\pm$ 0,41	3,75 $\pm$ 0,38	3,38 $\pm$ 0,33
<b>Паракоагуляційні тести</b>				
етаноловий	негативний	—  —	—  —	—  —
о-фенантроліновий	негативний	—  —	—  —	—  —
протамінсульфатний	негативний	—  —	—  —	—  —

**ВИСНОВКИ.** 1. Внутрішньом'язове введення пентосан полісульфату щурам спричиняє зниження вмісту фізіологічного пріона у селезінці, тонкому кишечнику, скелетних м'язах.

2. Пентосан полісульфат у дозах 0,1; 0,5 та 1 мг/кг/день не впливає на рівень мРНК фізіологічного пріона та не викликає негативних змін у показниках системи гемостазу.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Балуда В.П. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / В.П. Балуда, З.С. Баркаган, Е.Д. Гольдберг. – Томск, 1980. – С. 314.
2. Влізло В.В. Вміст фізіологічної форми пріону за дії пентосан полісульфату (SP-54) у тканинах щура / В.В. Влізло, В.В. Стадник, Х.Я. Майор та ін. // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 1. – С. 33-39.
3. Стадник В.В. Взаємодія фізіологічного пріона з пентосан полісульфатом *in vitro* / В.В. Стадник, Х.Я. Майор, П.І. Вербицький, В.В. Влізло // Експерим. та клін. фізіол. та біохім. – 2008. – № 3. – С. 33-37.
4. Caughey B. Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by Congo red / B. Caughey, R.E. Race // J. Neurochem. – 1992. – **59**. – P. 768-771.
5. Doh-ura K. Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models / K. Doh-ura, K. Ishikawa, I. Murakami-Kubo et al. // J. Vird. – 2004. – **78**. – P. 4999-5006.
6. Horiuchi M. A cellular form of prion protein (PrP<sup>C</sup>) exists in many non-neuronal tissues of sheep / M. Horiuchi, N. Yamazaki, T. Ikeda // J. Gen. Virol. – 1995. – **76**. – P. 2583-2587.
7. Laboratory animal protection: the European Convention and the Dutch Act // Vet Q. – 1986. – **8** (4). – P. 346-349.
8. Mannhalter C. Evaluation of RNA isolation methods and reference genes for RT-PCR analyses of rare target RNA / C. Mannhalter, D. Koizar, G. Mitterbauer // Clin. Chem. Lab. Med. – 2000. – **38** (2). – P. 171-177.
9. Wong C. Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP<sup>Sc</sup>-dependent cellfree formation of protease-resistant prion protein / C. Wong, L.W. Xiong, M. Horiuchi et al. // EMBO. – 2001. – **20**. – P. 377-386.

## СОДЕРЖИМОЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО ПРИОНА И ЕГО мРНК ПРИ ДЕЙСТВИИ ПЕНТОСАН ПОЛИСУЛЬФАТА

Х.Я. Майор<sup>1</sup>, В.В. Стадник<sup>1</sup>, М.В. Кинах<sup>2</sup>, В.В. Влізло<sup>1</sup>

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ УААН<sup>1</sup>  
ИНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГИИ И ТРАНСФУЗИОЛОГИИ МОЗ УКРАИНЫ<sup>2</sup>

#### Резюме

Пентосан полисульфат, введенный крысам внутримышечно, вызывает уменьшение содержимого физиологического приона в селезенке, тонком кишечнике и скелетных мышцах. Исследуемый препарат не влияет на уровень мРНК физиологического приона в данных органах и тканях животных. В то же время дозы пентосан полисульфата, которые ведут к снижению содержимого PrP<sup>C</sup>, не вызывают побочных эффектов в системе гемостаза организма крыс.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: крысы, селезенка, кишечник, мышцы, физиологический прион, мРНК, пентосан полисульфат, гемостаз.

## CONTENT OF PHYSIOLOGICAL PRION AND ITS mRNA UNDER THE INFLUENCE OF PENTOSAN POLYSULFATE

Kh.Ya. Mayor<sup>1</sup>, V.V. Stadnyk<sup>1</sup>, M.V. Kinakh<sup>2</sup>, V.V. Vlizlo<sup>1</sup>

INSTITUTE OF ANIMAL BIOLOGY OF UAAS<sup>1</sup>  
INSTITUTE OF HEMATOLOGY AND TRANSFUSIOLOGY OF MPH OF UKRAINE<sup>2</sup>

#### Summary

Pentosan polysulfate injected to rats intramuscularly causes decrease of physiological prion content in the spleen, thin intestine and skeletal muscles. Tested medicine does not influence on mRNA level of physiological prion in given organs and tissues of rats. In the same time doses of pentosan polysulfate which lead to decreasing PrP<sup>C</sup> content do not cause side effects in the system of hemostasis in the organism of rats.

KEY WORDS: rats, spleen, intestine, muscles, physiological prion, mRNA, pentosan polysulfate, hemostasis.

Отримано 08.04.2009 р.

Адреса для листування: Х.Я. Майор, Інститут біології тварин УААН, вул. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна.

## МЕТАБОЛІЧНА СКЛАДОВА КАЛЬЦИФІКАЦІЇ КЛАПАННОГО АПАРАТУ СЕРЦЯ У ХВОРИХ НА ПРОГРАМНОМУ ГЕМОДІАЛІЗІ

А.І. Гоженко<sup>1</sup>, І.Р. Мисула<sup>2</sup>, О.Б. Сусла<sup>2</sup>, І.Г. Якубишина<sup>2</sup>  
УКРАЇНСЬКИЙ НДІ МЕДИЦИНИ ТРАНСПОРТУ МОЗ УКРАЇНИ<sup>1</sup>, ОДЕСА  
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО<sup>2</sup>

*Вивчено динаміку показників ліпідного профілю, прооксидантно-антиоксидантної системи та параметрів ендотоксемії у хворих із кальцинозом клапанів серця на програмному гемодіалізі. Встановлено, що кальцифікація клапанного апарату серця за умов діалісної стадії хронічної хвороби нирок поєднується з розвитком оксидативного стресу, синдрому ендогенної інтоксикації, незначними порушеннями ліпідного гомеостазу. Зроблено висновок про доцільність застосування засобів, що проявляють нормалізуючий вплив на рівень ліпідної пероксидації, антиоксидантний стан та вираження ендогенної токсемії у гемодіалітичних хворих із клапанною кальцифікацією.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** гемодіаліз, серце, клапанний апарат, кальцифікація, метаболізм, перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, ендогенна інтоксикація.

ВСТУП. З'ясування патогенетичних основ формування кальцифікації серцево-судинної системи, зокрема кальцинозу клапанів серця (ККС), у хворих на програмному гемодіалізі є одним із актуальних напрямків сучасної нефрології. Актуальність проблематики ККС зумовлена тим, що останній відіграє особливу роль у формуванні, перебігу серцево-судинної патології і виникненні фатальних подій – розвитку тяжких серцевих дисфункцій, порушень серцевого ритму, серцевої недостатності, артеріальних емболій і раптової смерті [25, 27]. Повідомлення останніх років свідчать про те, що в реалізації механізмів кардіоваскулярної кальцифікації в діалітичній стадії хронічної хвороби нирок (ХХН) все більшу увагу приділяють метаболічним порушенням, а саме: змінам у ліпідному обміні, оксидативному стресу, накопиченню уремічних токсинів тощо. Існуючі дані літератури щодо порушень ліпідного гомеостазу за цих умов нерідко є суперечливими [4, 26, 29]; зміни прооксидантно-антиоксидантної системи стосуються лише процесів судинної кальцифікації [22, 28], а роботи щодо вираження ендогенної токсемії у гемодіалітичних пацієнтів із ККС поодинокі [21] або й зовсім відсутні.

Ймовірні патогенетичні взаємозв'язки клапанної кальцифікації і ХХН зумовлені не лише дисрегуляцією мінерального метаболізму, але

й впливом цілої низки обмінних порушень, які характерні для термінальної ниркової недостатності [19] та реалізують свій вплив на всі органи і системи, в тому числі й на клапанний апарат серця (КАС).

З огляду на це, метою даного дослідження стало визначення ролі порушень ліпідного обміну, активації вільнорадикального окиснення ліпідів, ендогенної інтоксикації (ЕІ) в патогенезі кальцифікації КАС у хворих на програмному гемодіалізі (ГД).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У дослідження включено 74 хворих (чоловіків – 41, жінок – 33), які перебували на лікуванні програмним ГД у відділенні гемодіалізу Тернопільської обласної комунальної клінічної лікарні. Середній вік пацієнтів становив 47 років, тривалість ГД – 23,5 місяців. Хворих на хронічний гломерулонефрит було 51,4 %, хронічний пієлонефрит – 18,9 %, діабетичну нефропатію – 17,6 %, полікістоз нирок – 12,2 %. Стан мітрального, аортального клапанів (норма, ущільнення, кальциноз), наявність клапанних дисфункцій, морфометричні та функціональні параметри серця вивчали шляхом виконання доплер-ЕхоКС дослідження на апараті "Aloka SSD 2000" [3].

Всім хворим проводили загальноклінічне обстеження, включаючи вивчення анамнезу, клінічної симптоматики, стандартні лабораторні й інструментальні тести. Матеріалами дослідження були сироватка крові, плазма крові та

© А.І. Гоженко, І.Р. Мисула, О.Б. Сусла, І.Г. Якубишина, 2009.

цільна кров. З метою дослідження ліпідного обміну визначали сироватковий вміст загального холестерину (ЗХС), ХС у ліпопротеїдах високої щільності (ХС-ЛПВЩ) і тригліцеридів (ТГ). Вміст ХС у ліпопротеїдах низької щільності (ХС-ЛПНЩ) розраховували за формулою Фрідвальда (1972). Показники активності пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) вивчали такими методами: вміст малонового діальдегіду (МДА) визначали фотоколориметричним методом за інтенсивністю забарвленого комплексу, який утворюється при взаємодії МДА з тіобарбітуровою кислотою в кислому середовищі [16]; стан антиоксидантної системи (АОС) визначали такими методами: активність каталази (КТ) (КФ 1.11.1.6) – фотоколориметричним методом за інтенсивністю забарвленого комплексу, який утворюється при взаємодії пероксиду водню з молібдатом амонію [10], активність супероксиддисмутази (СОД) (КФ 1.15.1.1) – за ступенем інгібування відновленого нітротетразолію синього [7], концентрацію SH-груп в реакції з п-меркурбензоатом натрію, вміст церулоплазміну (ЦП) (КФ 1.16.3.1) – за кількістю утворених забарвлених продуктів окиснення п-фенілендіаміну в присутності ЦП [9]. Показники ЕІ вивчали такими методами: вміст молекул середньої маси (МСМ) згідно з методичними рекомендаціями [1] – досліджували середні молекули при довжині хвилі 254 нм (СМ/254) (визначалися ланцюгові амінокислоти), середні молекули при довжині хвилі 280 нм (СМ/280) (визначалися ароматичні амінокислоти) та сорбційну здатність еритроцитів (СЗЕ) – за кількістю поглинутого барвника еритроцитарними мембранами. Кількість циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) визначали шляхом преципітації їх розчином поліетиленгліколю-6000 [6].

ГД хворим виконували за стандартною програмою (3 рази на тиждень по 4-4,5 год) на апаратах “Штучна нирка” фірми “Gambro”

(Швеція) з використанням напівсинтетичних діалізаторів і бікарбонатного буфера. Забезпечена доза діалізу (коефіцієнт  $Kt/V$ ), розрахована за формулою натурального логарифму [18], складала не менше 1,25.

Для статистичного аналізу даних використовували пакет прикладних програм STATISTICA (StatSoft, USA, v6.0). Застосовували методи непараметричної статистики – U-критерій Манна-Уїтні для порівняння показників у двох групах. Статистично значимими вважали відмінності при  $p < 0,05$ . При описуванні кількісних ознак були представлені медіани і межі інтерквартильного відрізка [25; 75 %].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Кальцифікацію КАС виявлено в 44,6 % хворих на хронічному гемодіалізі: ізольований кальциноз мітрального клапана – у 23,0 %, аортального – у 4,1 %, обох клапанів – у 17,6 %. При аналізі динаміки параметрів ліпідного профілю у групах пацієнтів, які відрізнялися за наявністю кальцинозу клапанів, встановлено, що у хворих із ККС спостерігалась тенденція до зниження рівня ЗХС і ХС-ЛПНЩ (табл. 1). Поряд із цим, концентрація сироваткового вмісту ХС-ЛПВЩ і ТГ у згаданих вище групах суттєво не відрізнялась. Зазначені особливості ліпідних порушень певною мірою узгоджуються з [4, 30] і вказують на дещо нижчий рівень загального пулу ліпідів у гемодіалітичних пацієнтів із клапанною кальцифікацією. Проте, відповідно до сучасних тенденцій, не кількісний, а якісний характер змін ліпопротеїдів і/чи зміна співвідношення окремих їх фракцій/субфракцій крові відіграє суттєву роль у механізмах атерогенезу, а отже, і кальцинозу [12, 17]. Саме модифікованим ЛПНЩ надають особливого значення в ініціації і прогресуванні ендотеліального пошкодження, а провідним фактором перетворення ліпопротеїдів за цих умов є розвиток системного оксидативного стресу [14].

Таблиця 1 – Параметри ліпідного обміну та прооксидантно-антиоксидантної системи у гемодіалітичних хворих залежно від наявності/відсутності кальцифікації клапанного апарату серця

Параметр	Кальцинозу немає (n=41)	Кальциноз є (n=33)	Z (для U-критерію)	p
ХС, ммоль/л	5,19 [4,67; 5,36]	4,72 [3,92; 4,96]	1,772	0,076
ХС-ЛПВЩ, ммоль/л	1,22 [0,94; 1,24]	1,22 [1,12; 1,24]	1,079	0,281
ХС-ЛПНЩ, ммоль/л	3,37 [2,97; 3,81]	2,98 [2,33; 3,36]	2,164	0,030
ТГ, ммоль/л	1,22 [0,93; 1,31]	1,22 [0,93; 1,31]	0,142	0,887
МДА, мкмоль/л	4,569 [4,119; 5,681]	5,631 [4,356; 6,243]	2,830	0,005
СОД, ум.од.	46,3 [38,9; 57,3]	38,9 [32,8; 45,6]	2,496	0,013
КТ, %	36,2 [29,3; 45,6]	40,9 [21,9; 50,6]	0,702	0,483
ЦП, мг/л	380 [345; 410]	420 [375; 488]	2,908	0,004
SH-групи, ммоль/л	49,6 [43,2; 59,8]	45,6 [39,8; 50,2]	2,160	0,031



Порівняльний аналіз показників прооксидантно-антиоксидантної системи у пацієнтів обох груп показав, що у хворих із ККС, на відміну від пацієнтів без кальцинозу, були статистично значимі вищі величини МДА, ЦП, нижчі – активність СОД і рівень SH-груп (табл. 1). Водночас активність КТ у хворих досліджуваних груп суттєво не відрізнялась. Виснаження антиоксидантних резервів, дезорганізація АОС, очевидно, сприяють ініціації ПОЛ і активації вільнорадикального окиснення ліпідів у хворих із клапанною кальцифікацією. Можливо, нагромадження одного з прикінцевих продуктів ПОЛ, якому притаманні мембранотоксичні властивості, зумовлює пошкодження плазматичних і мітохондріальних мембран ендотеліальних клітин, знижує активність ліпідзалежних ферментативних реакцій, до яких належать ферменти іонного транспорту і дихального ланцюга мітохондрій, змінює мембранорецепторні системи клітини з розвитком медіаторного дисбалансу, активує протеолітичні й лізосомальні ферменти. Відбувається прискорений апоптоз ендотеліоцитів [15]. Крім того, оксидативний стрес модулює остеобластну трансформацію клітин судин [23]. Від зниження активності СОД може залежати прогресування ендотеліальної дисфункції у пацієнтів з ураженням коронарних судин [31]. Цікаво, що зростання активності ЦП є прогностично несприятливою ознакою щодо розвитку ІХС [20]; підвищення цього мідьвмісного антиоксиданта як білка гострої фази вказує на напруженість компенсаторної реакції [8]; збільшення концентрації ЦП віддзеркалює феномен стресу, зумовленого серцевою недостатністю і супутньою циркуляторною гіпоксією [5].

Розгортання оксидативного стресу призводить до значних додаткових порушень в організмі й посилення ендотоксикозу. Вивчення синдрому ЕІ у хворих на хронічному гемодіалізі дозволило відкрити нові горизонти щодо механізмів розвитку кальцифікації КАС. Наростання ендотоксемії у гемодіалізних хворих із ККС проявлялось суттєвим збільшенням кількості МСМ – інтегрального показника метаболічних порушень [11] порівняно з пацієнтами без кальцинозу, причому зростання останніх більш значним було для пулу СМ/280 (табл. 2). Зазначену тезу можна пояснити переважанням катаболічних процесів в організмі на гемодіалізі, спотворенням біосинтетичних процесів, можливо, приєднанням аутоімунного компонента [2, 13].

Динаміка ЦІК за цих умов, з одного боку, підтверджує глибші зміни ендотоксикозу у хворих із ККС, а з іншого – вказує на можливий вищий вміст в імунних комплексах модифікованих ліпопротеїдів [17]. Деструктивні процеси мембран еритроцитів за показником СЗЕ також були більш вираженими у групі пацієнтів із клапанним кальцинозом відносно групи без кальцинозу (табл. 2).

Отже, за умов діалізної стадії ХХН розвивається цілий каскад метаболічних перетворень, які можуть сприяти атерогенезу і бути фактором формування клапанної кальцифікації у гемодіалізних хворих. Дослідження кальцинованих клапанів дозволяє виявити пошкодження ендотелію, потовщення субендотеліального шару, накопичення ліпідів, ліпопротеїнів, білків, запальних клітин, протеїнів кісткового матриксу, а також осередки інтенсивного звапнення в зонах ліпідної акумуляції [24].

Таблиця 2 – Показники ендогенної інтоксикації у гемодіалізних хворих залежно від наявності/відсутності кальцифікації клапанного апарату серця

Параметр	Кальцинозу немає (n=41)	Кальциноз є (n=33)	Z (для U-критерію)	p
СМ/254, ум.од.	545 [496; 612]	598 [544; 668]	2,410	0,016
СМ/280, ум.од.	236 [211; 283]	250 [236; 311]	2,916	0,004
СЗЕ, %	56,6 [50,6; 65,1]	60,3 [56,1; 70,2]	2,243	0,025
ЦІК, ум.од.	213 [207; 291]	283 [218; 322]	2,521	0,012

**ВИСНОВКИ.** 1. Кальцифікація клапанного апарату серця у хворих на програмному гемодіалізі поєднується з активацією вільнорадикального окиснення ліпідів, що проявляється зростанням вмісту одного з прикінцевих продуктів пероксидного окиснення ліпідів (малоновий діальдегід), зміною активності анти-

оксидантної системи (знижуються активність супероксиддисмутази, рівень SH-груп, підвищується вміст церулоплазміну) та незначними змінами ліпідного обміну (тенденція до зменшення загального холестерину, зниження вмісту холестерину ліпопротеїдів низької щільності).

2. Кальциноз клапанів серця тісно пов'язаний з наявністю і ступенем ендогенної інтоксикації, про що свідчать зростання молекул середньої маси, циркулюючих імунних комплексів та високий рівень сорбційної здатності еритроцитів.

3. Наявність комплексу метаболічних порушень у хворих на програмному гемодіалізі

з клапанною кальцифікацією націлює на необхідність використання препаратів, які проявляють нормалізуючий вплив на рівень ліпідної пероксидації, антиоксидантну систему та вираження ендогенної токсемії, що й стане предметом наших подальших досліджень.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Андрейчин М.А., Бех М.Д., Дем'яненко В.В. та ін. Методи дослідження ендогенної інтоксикації організму: Методичні рекомендації. – Київ, 1998. – 31 с.
2. Бакалюк О.Й., Панчишин Н.Я., Дзига С.В. Синдром ендогенної інтоксикації, механізм виникнення, методи ідентифікації // Вісник наукових досліджень. – 2000. – № 1. – С. 11-13.
3. Вилкенсхоф У., Крук И. Справочник по эхокардиографии: Пер. с нем. – М.: Мед. лит., 2008. – 240 с.
4. Волков М.М., Дегтерева О.А., Шевякова Е.В. Факторы, связанные с кальцинацией клапанного аппарата сердца у пациентов на хроническом гемодиализе // Нефрология. – 2007. – **11**, № 3. – С. 57-63.
5. Волчегорский И.А., Шапошник И.И., Алексеев Е.Н., Харченкова Н.В. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и церулоплазмينا в крови как показателя толерантности к физической нагрузке при гипертрофической кардиомиопатии // Клинич. лабор. д-ка. – 2002. – № 2. – С. 11-13.
6. Гриневич Ю.А., Алферов А.М. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело. – 1981. – № 8. – С. 493-495.
7. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. Активность и изоферментный спектр супероксиддисмутазы эритроцитов и плазмы крови человека // Лаб. дело. – 1983. – № 10. – С. 30-33.
8. Ковтунова М.Е., Паньков В.Н., Перевалова Н.Н. Церулоплазмин и среднимолекулярные пептиды как критерии течения острого миелобластного лейкоза // Клинич. лабор. д-ка. – 2003. – № 5. – С. 52-54.
9. Колб В.Г., Камышников В.С. Клиническая биохимия. – Минск: Беларусь, 1986. – 312 с.
10. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова Н.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
11. Корякина Е.В., Белова С.В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы) // Клинич. лабор. д-ка. – 2004. – № 3. – С. 3-8.
12. Лугай М.И., Голикова И.П., Слободской В.А. Роль дисфункции эндотелия, воспаления и дислипидемии в атерогенезе // Укр. кардіол. журн. – 2007. – № 5. – С. 37-47.
13. Николаев А.Ю., Милованов Ю.С. Лечение почечной недостаточности. – М.: Медицина, 1999. – 362 с.
14. Панина И.Ю. Вазомоторная форма эндотелиальной дисфункции при хронической болезни почек // Нефрология. – 2006. – **10**, № 2. – С. 33-37.
15. Руда М.М., Парфенова Е.В., Карпов Ю.А. Предшественники эндотелиальных клеток: роль в восстановлении функции эндотелия и перспективы терапевтического применения // Кардиология. – 2008. – № 1. – С. 66-73.
16. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
17. Талаева Т.В., Братусь В.В. Атеросклероз: многофакторность и системность патогенеза // Укр. кардіол. журн. – 2007. – № 5. – С. 101-110.
18. Daugirdas J.T. Second generation logarithmic estimates of single-pool variable volume Kt/V: An analysis of error // J. Am. Soc. Nephrol. – 1993. – № 4. – P. 1205-1213.
19. Fort J. Chronic renal failure: a cardiovascular risk factor // Kidney Int. Suppl. – 2005. – **99**. – S. 25-29.
20. Gocmen A.Y., Sahin E., Semiz E., Gumuslu S. Is elevated serum ceruloplasmin level associated with increased risk of coronary artery disease? // Can. J. Cardiol. – 2008. – **24**, № 3. – P. 209-212.
21. Ikee R., Honda K., Oka M. et al. Association of heart valve calcification with malnutrition-inflammation complex syndrome, beta-microglobulin, and carotid intima media thickness in patients on hemodialysis // Ther. Apher. Dial. – 2008. – **12**, № 6. – P. 464-468.
22. Jung Y.Y., Choi D.H., Lee S.H. Serum malondialdehyde and coronary artery disease in hemodialysis patients // Am. J. Nephrol. – 2004. – **24**, № 5. – P. 537-542.
23. Mody N., Parhami F., Sarafian T.A., Demer L.L. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – **31**, № 4. – P. 509-519.
24. Podolec P., Kopec G., Rubis P. et al. Calcific and degenerative aortic stenosis – pathogenesis and new possibilities of treatment // Przegl. Lek. – 2004. – **61**, № 6. – P. 604-608.
25. Raggi P., Bellasi A., Ferramosca E. et al. Association of pulse wave velocity with vascular and valvular calcification in hemodialysis patients // Kidney Int. – 2007. – **71**, № 8. – P. 802-807.
26. Raggi P., Bommer J., Chertow G.M. Valvular calcification in hemodialysis patients randomized to calcium-based phosphorus binders or sevelamer // J. Heart Valve Dis. – 2004. – **13**, № 1. – P. 134-141.
27. Strozecki P., Odrowaz-Sypniewska G., Manitius J. Cardiac valve calcification and left ventricular hypertrophy in hemodialysis patients // Ren. Fail. – 2005. – **27**, № 6. – P. 733-738.

28. Taki K., Tsuruta Y., Niwa T. Indoxyl sulfate and atherosclerotic risk factors in hemodialysis patients // Am. J. Nephrol. – 2007. – **27**, № 1. – P. 30-35.

29. Torun D., Sezer S., Baltali M. et. al. Association of cardiac valve calcification and inflammation in patients on hemodialysis // Ren. Fail. – 2005. – **27**, № 2. – P. 221-226.

30. William G., Goodman M.D., Jonathan Goldin M.D et al. Coronary-artery calcification in young adults with end-stage renal disease who undergoing dialysis // New Engl. J. Med. – 2008. – **342**, № 20. – P. 1478-1483.

31. Zalba G., Fortuco A., Diez J. Oxidative stress and atherosclerosis in early chronic kidney disease // Neph. Dial. Transpl. – 2006. – **21**. – P. 2686-2690.

## МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ СОСТАВЛЯЮЩАЯ КАЛЬЦИФИКАЦИИ КЛАПАННОГО АППАРАТА СЕРДЦА У БОЛЬНЫХ НА ПРОГРАММНОМ ГЕМОДИАЛИЗЕ

**А.И. Гоженко<sup>1</sup>, И.Р. Мисула<sup>2</sup>, А.Б. Сусла<sup>2</sup>, И.Г. Якубышина<sup>2</sup>**  
УКРАИНСКИЙ НИИ МЕДИЦИНЫ ТРАНСПОРТА МЗ УКРАИНЫ<sup>1</sup>, ОДЕССА  
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО<sup>2</sup>

### Резюме

Изучена динамика показателей липидного профиля, прооксидантно-антиоксидантной системы и параметров эндотоксемии у больных с кальцинозом клапанов сердца на программном гемодиализе. Установлено, что кальцификация клапанного аппарата сердца в условиях диализной стадии хронической болезни почек сочетается с развитием оксидативного стресса, синдрома эндогенной интоксикации, незначительными нарушениями липидного гомеостаза. Сделан вывод о целесообразности применения препаратов, проявляющих нормализующее действие на уровень липидной пероксидации, антиоксидантное состояние и выражение эндогенной токсемии у гемодиализных больных с клапанной кальцификацией.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гемодиализ, сердце, клапанный аппарат, кальцификация, метаболизм, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система, эндогенная интоксикация.

## METABOLIC CONSTITUENT OF CARDIAC VALVULAR CALCIFICATION IN PATIENTS ON MAINTENANCE HEMODIALYSIS

**A.I. Hozhenko<sup>1</sup>, I.R. Mysula<sup>2</sup>, O.B. Susla<sup>2</sup>, I.H. Yakubyshyna<sup>2</sup>**  
UKRAINIAN SRI OF TRANSPORT MEDICINE OF MHC OF UKRAINE<sup>1</sup>, ODESSA  
TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY<sup>2</sup>

### Summary

A study has been conducted on dynamics of indices of lipide profile, prooxidative and antioxidant system and parameters of endogenous toxemia in patients with heart valve calcification on maintenance hemodialysis. It has been proved that a cardiac valvular calcification in the conditions of the dialysis stage of chronic kidney disease combines with the development of oxidative stress, syndrome of endogenous intoxication, insignificant changes of lipid homeostasis. A conclusion has been made as to the practicability of usage of means with normalizing influence on the level of lipid peroxidation, antioxidative condition and expression of endogenous toxemia in hemodialysis patients with valvular calcification.

KEY WORDS: hemodialysis, heart, valve apparatus, calcification, metabolism, lipid peroxidation, antioxidative system, endogenous intoxication.

Отримано 11.02.2009 р.

Адреса для листування: О.Б. Сусла, вул. Руська, 18/13, Тернопіль, 46008, Україна.

## АНАЛІЗ УЧАСТІ ХОЛІНЕРГІЧНОЇ СИСТЕМИ В РЕАЛІЗАЦІЇ ФАРМАКОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ ПІРОДАЗОЛУ

О.Є. Ядловський, Л.С. Бобкова  
ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ, КИЇВ

*Квантово-хімічним методом проведено оцінку міжмолекулярної взаємодії нового анальгетика піродазолу з мускарином та допускається низька вірогідність його впливу на м-холінорецептори. Здійснено експериментальну верифікацію прогнозу і показано відсутність впливу м-холіноміметиків на антиноцицептивний, гіпотензивний ефекти піродазолу.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: піродазол, холінергічна система, гіпотензія.

ВСТУП. Створення нових знеболювальних препаратів – одне з важливих завдань сучасної фармакології, оскільки немає на сьогодні анальгетика, який би оптимально задовольняв вимоги клініки [2, 5]. Всебічне вивчення властивостей нового знеболювального препарату дозволяє оптимізувати його застосування, тобто вибрати оптимальну нозологію для використання, а також найбільш безпечний та ефективний режим застосування [3].

В ДУ “Інститут фармакології та токсикології АМН України” проводять комплексні дослідження зі створення нового неопіоїдного анальгетика піродазолу. Широко відомо про холінергічний компонент у механізмі дії знеболювальних засобів різних фармакологічних груп [5]. Оскільки піродазол не має ознак пригнічення простагландинів (відсутні протизапальна, антипірогенна, ульцерогенна дії), не впливає на систему згортання крові, нами було припущено його вплив на холінергічну систему.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Квантово-хімічні розрахунки виконано на ПК за програмою “HyperChem”. Геометричну оптимізацію молекул проведено методом самоузгоджуваного поля PM3 [1].

Дослідження виконували на білих нелінійних мишах та щурах лінії Вістар (самці та самиці) масою (20±2) г і (200±20) г відповідно, розведення віварію Інституту фармакології та токсикології АМН України. Тварин утримували на стандартному харчовому раціоні

віварію, вони отримували їжу та воду для пиття ad libitum. Дослідження з метою виявлення участі холінергічного компонента в реалізації анальгетичної дії піродазолу проводили на моделі оцтовокислих “корчів” [9]. Піродазол вводили мишам внутрішньошлунково в ЕД<sub>50</sub> (0,7 мг/кг). Критерієм оцінки ефективності був процент інгібіції числа “корчів” у тварин. Використовували фармакологічні аналізатори, які вводили в комбінаціях: до або після піродазолу. Піродазол вводили за 60 хв до введення аналізаторів або через 60 хв після них. Аналізатори вводили: ареколін – 0,25 мг/кг, внутрішньовенно за 5 хв до або через 5 хв після анальгетика; ацетилхолін – 17 мг/кг, армін – 0,07 мг/кг, прозерин – 0,04 мг/кг, підшкірно за 15 хв до або через 15 хв після анальгетика. Підрахунок “корчів” проводили через 1 год після введення анальгетика піродазолу та через 5 хв або 15 хв після аналізаторів (залежно від шляху введення).

Вплив піродазолу на холінергічну систему оцінювали за впливом на показники функціонування серцево-судинної системи (частоту серцевих скорочень та систолічний тиск) у щурів. Експерименти проводили на Sphygmomanometer S-2 (Німеччина). Використовували метод фармакологічного аналізу, для чого піродазол вводили на фоні модуляторів холінергічної системи [7]. Як модулятори холінергічної системи було застосовано армін – 0,02 мг/кг, підшкірно, ареколін – 0,25 мг/кг, внутрішньом'язово, прозерин – 0,05 мг/кг, внутрішньошлунково у дозах з розрахунку на 1 кг маси тіла. Статистичну обробку даних проводили за допомогою [4].

© О.Є. Ядловський, Л.С. Бобкова, 2009.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Геометричну оптимізацію молекул, при яких молекули мускарину та катіону пірдазолу мають найменший рівень енергії, проводили методом самоузгоджуваного поля (СУП МО) за алгоритмом Паризера-Парра-Попла (ППП). На основі цієї найбільш енергетично вигідної конформації розраховували електронні характеристики молекули мускарину і катіона пірдазолу та їх міжмолекулярних адуктів. Міжмолекулярні комплекси “пірдазол/мускарин”, утворення яких передбачали за рахунок донорно-акцепторної взаємодії відповідних центрів, оцінювали на основі розрахунку і зіставлення молекулярних енергетичних параметрів для вихідних речовин та їх адуктів.

Компліментарність катіона пірдазолу з молекулою та мускарину буде мати місце, якщо виявиться однаковий характер розміщення його ключових атомів з ключовими атомами в цих молекулах. Передбачувана структура мускаринового рецептора виведена [8] за результатами квантово-хімічних розрахунків деяких конформацій ацетилхоліну, L(+)-мускарину, D(-)-мускарону та описана в геометричних параметрах – відповідних віддаль між ключовими гетероатомами: [-O- ~ N+ ( $3,2 \pm 0,2$  Å); N+ ~ =O (або -OH) ( $5,6 \pm 0,2$  Å); =O (або HO-) ~ O- ( $2,8 \pm 0,6$  Å)]. Катіону пірдазолу, а також молекулі мускарину властиві енергетичні характеристики, знайдені в межах методу PM3 (табл. 1). Віддалі між гетероатомами в кожному

Таблиця 1 – Енергетичні характеристики оптимізованих в межах методу PM3 молекул нікотину і мускарину та катіона пірдазолу

Енергії та градієнти		Катіон пірдазолу	Мускарин
Загальна (Total Energy)	(kcal/mol)	-82963.8732	-45203.3708
	(a.u.)	-132.2087	-72.0347
зв'язків (Binding Energy)	(kcal/mol)	-4716.8624	-2577.9026
ізолюваних атомів (Isolated Atomic Energy)	(kcal/mol)	-78247.0107	-42625.4681
Електронна (Electronic Energy)	(kcal/mol)	-656198.0335	-266357.1347
між'ядерної взаємодії (Core-Core Interaction)	(kcal/mol)	573234.1603	221153.7640
Теплота утворення (Heat of Formation)	(kcal/mol)	140.1976	-92.9306
Градієнт (Gradient)	(kcal/mol/Ång)	0.01	10.72

з обчислених об'єктів наведені в таблиці 2. Порівняння отриманих геометричних параметрів показує, що структура пірдазолу в світлі запропонованої моделі мускаринового рецептора, за проведеними розрахунками, не компліментарна. Отже, пірдазол в розрахованій конформації не здатний взаємодіяти з тим рецептором, який відповідальний за біологічний ефект мускарину.

Міжмолекулярним комплексам катіона пірдазолу з мускарином, оптимізованим за умовами методу PM3, властиві енергетичні характеристики (табл. 3).

Експериментальну верифікацію прогнозу проводили з використанням аналізаторів, яким притаманна м-холіноміметична активність. Ацетилхолін пригнічує кількість “корчів” на 46,6 %. Слід зазначити, що ацетилхолін є медіатором нервового збудження. Введення ацетилхоліну в комбінаціях з пірдазолом

Таблиця 2 – Віддалі між ключовими гетероатомами пірдазолу, мускарину, нікотину

Гетероатоми та віддаль між ними	Пірдазол	Мускарин
N-N	11-13	-
Віддаль L, A	2.221	-
O-O	7-23	5-11
Віддаль L, A	8.230	3.389
O-N	7-11	5-8
Віддаль, A	6.546	3.057
O-N	7-13	11-8
Віддаль, A	7.758	3.382
O-N	23-11	-
Віддаль, A	5.581	-
O-N	23-13	-
Віддаль, A	7.703	-

Таблиця 3 – **Енергетичні характеристики оптимізованих в межах методу РМЗ міжмолекулярних комплексів катіона піродазолу з нікотинном і мускаринном**

Енергії та градієнти		Міжмолекулярний комплекс “піродазол/мускарин”
Загальна (Total Energy)	(kcal/mol)	-128180.3417
	(a.u.)	-204.2643
зв'язків (Binding Energy)	(kcal/mol)	-7307.8628
ізолюваних атомів (Isolated Atomic Energy)	(kcal/mol)	-120872.4789
Електронна (Electronic Energy)	(kcal/mol)	-1253375.4869
між'ядерної взаємодії (Core-Core Interaction)	(kcal/mol)	1125195.1452
Теплота утворення (Heat of Formation)	(kcal/mol)	34.1692
Градієнт (Gradient)	(kcal/mol/Ang)	0.0700

викликає однаковий процент пригнічення “корчів” порівняно з введенням одного піродазолу, що свідчить про відсутність його впливу на знеболювальний ефект піродазолу (табл. 4). Введення стимулятора м-холінорецепторів викликає невірогідне зниження кількості “корчів” (табл. 4). При стимуляції ареколіном практично не змінюється ефект піродазолу. Введення ареколіну на фоні анальгетика спричиняє підвищення антиноцицептив-

ної дії піродазолу до 76,1 % до введення ареколіну та зниження до 52,5 % після його введення. Але ці дані невірогідно відрізняються, що не може свідчити про істотний вплив холіноміметиків. При введенні прозерину не змінюється антиноцицептивний ефект піродазолу. Введення арміну на фоні неопіоїдного анальгетика знижує в 1,7 раза анальгетичний ефект піродазолу (табл. 4). Однак ці зміни не вірогідні порівняно з введенням одного піродазолу.

Таблиця 4 – **Вплив м-холіноміметиків на анальгезивну активність піродазолу на моделі вісцерального болю (“корчі”, викликані оцтовою кислотою)**

Групи дослідів	Кількість “корчів”		% інгібіції числа “корчів”
	$M_k \pm m, n=10$	$M_o \pm m, n=6$	
Ацетилхолін	17,8±2,0	9,5±1,3	-46,6*
Піродазол	23,9±2,3	8,3 ± 2,6	-65,3**
Ацетилхолін+піродазол	17,8±2,0	5,8±2,4	-67,4*
Піродазол+ацетилхолін	17,8±2,0	6,0±2,8	-66,3*
Ареколін	23,5±1,7	16,2±2,3	-31,1*
Ареколін+піродазол	25,9±4,2	12,3±1,6	-52,5*
Піродазол+ареколін	25,9±4,2	6,2±1,8	-76,1***
Армін	25,0±2,6	15,8±3,0	-36,8*
Армін+піродазол	25,0±2,6	9,7±2,5	-61,2***
Піродазол+армін	25,0±2,6	15,5±2,8	-38,0*
Прозерин	21,2±1,6	12,2±2,7	-42,5**
Прозерин+піродазол	22,4±1,6	8,7±3,4	-61,2**
Піродазол+прозерин	22,4±1,6	8,2±1,8	-63,4*

Примітки. 1.  $M_k$  – число “корчів” у тварин контрольної групи (введення розчинника).

2.  $M_o$  – число “корчів” у тварин дослідної групи.

3. \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем.

4. \*\* –  $p < 0,01$  порівняно з контролем.

5. \*\*\* –  $p < 0,001$  порівняно з контролем.

Піродазол викликає зниження тиску в щурів при внутрішньом'язовому введенні тривалістю до 6 год (табл. 5). Зниження систолічного тиску (СТ) супроводжується вірогідним зменшенням частоти серцевих скорочень

(ЧСС) від 11,2 до 19,1 %. При вивченні впливу піродазолу на холінергічну систему було показано, що м-холіноміметик ареколін суттєво не впливає на показники СТ та ЧСС (табл. 5). На фоні незворотного інгібітора хо-

ліностерази арміну (комбінація армін + піродазол) невірогідно зростають як СТ, так і ЧСС, що можна пояснити стимуляцією арміном холінорецепторів симпатичних гангліїв та мозкової речовини надниркових залоз. При вивченні впливу на фармакологічну дію піродазолу іншого інгібітора холіностерази – прозерину, який не проникає крізь гемато-

енцефалічний бар'єр, спостерігаються значні, але невірогідні зниження значень ЧСС до 9,1 та 13,5 % і зростання СТ до 14,5-26,5 %, що також можна пояснити впливом препарату на симпатичні ганглії [5].

Сумуючи вищенаведене, можна припускати відсутність впливу на ефект піродазолу речовин з м-холіноміметичною дією.

Таблиця 5 – Вплив холінолітиків та холіноміметиків на систолічний тиск (СТ) та частоту серцевих скорочень (ЧСС) у щурів при введенні піродазолу

Препарат	Термін спостереження			
	1 год		2 год	
	ЧСС, %	СТ, %	ЧСС, %	СТ, %
Піродазол, n=6	+11,3*	-12,7*	+13,5*	-10,6
Ареколін+піродазол, n=6	+8,9	-11,7	+11,8*	-7,7
Піродазол+ареколін, n=6	+1,9	-4	+1,2	+8
Ареколін, n=6	-9,8	-7,6	-7,2	-4,0
Армін+піродазол, n=6	+4,5	+8,6	+0,2	+11,5
Піродазол+армін, n=6	-4,2	-5,4	+4,8	-0,3
Армін, n=6	-8,7	-2,3	-10,1*	+3,2
Прозерин+піродазол, n=6	-13,5	+14,5	-11,6	+18,7
Піродазол+прозерин, n=6	+4,3	+18,9*	-9,1	+26,5
Прозерин, n=6	-6,7	-5,2	-7,8	-9,2

Примітка. \* – дані, що вірогідно відрізняються від вихідних значень (p≤0,05).

**ВИСНОВКИ.** 1. Квантово-хімічним методом проведена оцінка міжмолекулярної взаємодії піродазолу з мускарином і припускається низька вірогідність його впливу на м-холінорецептори.

2. За допомогою фармакологічного аналізу встановлено відсутність впливу м-холіноміметиків у моделюванні антиноцицептивної дії піродазолу та впливу на серцево-судинну систему.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Голиков С.Н., Кузнецов С.Г., Зацепин Э.П. Сте-реоспецифичность действия лекарственных веществ. – М.: Медицина, 1973. – 183 с.
2. Канер Р. Секреты лечения боли: Пер. с англ. – М.: Издательство Бином, 2006. – 400 с.
3. Лиманский Ю.П. Физиология боли. – К.: Здоров'я, 1986. – 96 с.
4. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистика в науке и бизнесе. – К.: Морион, 2002. – 640 с.
5. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. – Харьков:Торсинг, 1997. – 1. – 560 с.
6. Прозоровский В.Б., Саватеев Н.В. Неантихолинэстеразные механизмы действия антихолинэ-стеразных средств. – Л.: Медицина, 1976. – 160 с.
7. Трінус Ф.П., Бухтіарова Т.А., Хоменко В.С. та ін. Фармакологічний аналіз впливу парацетамолу на участь холінергічної системи в формуванні вісц-ерального больового синдрому // Ліки. – 2003. – № 5-6. – С. 46-49.
8. Kier L.B., Truit E.D. Jr. The preferred conformation of dopamine from molecular orbital theory // Journal of pharmacology and experimental therapeutics. – 1970. – 174, № 1. – P. 94-98.
9. Wood R.L. Animal models in analgesic testing // Analgesics: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives / Eds: M. Kuhar, J. Pasternak. – New York: Raven Press, 1941. – 42. – P. 74.

## АНАЛИЗ УЧАСТИЯ ХОЛИНЭРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ В РЕАЛИЗАЦИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПИРОДАЗОЛА

О.Е. Ядловский, Л.С. Бобкова

ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ, КИЕВ

### Резюме

Квантово-химическим методом проведена оценка межмолекулярного взаимодействия нового анальгетика пиродазола с мускарином и допускается низкая вероятность его влияния на м-холинорецепторы. Осуществлена экспериментальная верификация прогноза и показано отсутствие влияния м-холиномиметиков на антиноцицептивный, гипотензивный эффекты пиродазола.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пиродазол, холинэргическая система, гипотензия.

## ANALYSIS OF CHOLINERGIC SYSTEM PARTICIPATION IN REALIZATION OF PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF PYRODAZOL

O.Ye. Yadlovsky, L.S. Bobkova

INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF AMS OF UKRAINE, KYIV

### Summary

By means of quantum chemical method was carried out the assessment of intermolecular interactions of a new analgetic pyrodazol with muscarin and the low probability of its effect on to m-cholinoreceptors was supposed. The experimental verification of the forecast was performed and the absence of effect of m-cholinomimetics on to antinociceptive and hypotensive effects of pyrodazol was shown.

KEY WORDS: pyrodazol, cholinergic system, antinociceptive effect, hypotension.

Отримано 3.11.2008 р.

Адреса для листування: О.Е. Ядловський, вул. Бугорна, 10 а, кв. 19, Київ, 03086, Україна.



## ДОСЛІДЖЕННЯ ФОСФОЛІПІДІВ ШКІРИ І СИРОВАТКИ КРОВІ У ХВОРИХ НА ВІТИЛІГО

**Б.Т. Саатов<sup>1,2</sup>, О.І. Умеров<sup>1</sup>**  
 ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ АН РУз<sup>1</sup>, ТАШКЕНТ  
 НДІ ДЕРМАТОЛОГІЇ І ВЕНЕРОЛОГІЇ МОЗ РУз<sup>2</sup>, ТАШКЕНТ

*Вивчено вміст і фракційний склад фосфоліпідів у шкірі й сироватці крові здорових осіб і хворих на вітиліго. Встановлено зниження вмісту сумарних фосфоліпідів, як у шкірі, так і в сироватці крові хворих, порівняно з нормою. При фракціонуванні загальних фосфоліпідів шкіри і сироватки крові за допомогою тонкошарової хроматографії на хроматограмах виявлено 8 фракцій. Порівняльне вивчення кількісних показників окремих фракцій фосфоліпідів у шкірі й сироватці крові здорових осіб і хворих на вітиліго показало певну відмінність. Порівняно з нормою при вітиліго спостерігалось помітне зниження вмісту нейтральних фосфоліпідів на тлі достовірного збільшення кількості кислих фракцій фосфоліпідів у вивчених об'єктах дослідження. Мало місце найбільш виражене підвищення вмісту лізофосфатидилхоліну і фосфатидної кислоти при вітиліго. Отже, при вітиліго-нозному ураженні організму відбуваються значні порушення у фосфоліпідному складі шкіри і сироватці крові хворих.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **вітиліго, фосфоліпіди, шкіра, сироватка крові.**

ВСТУП. Структурне і функціональне значення фосфоліпідів у життєдіяльності організму величезне. Вони беруть безпосередню участь в таких фундаментальних клітинних процесах, як рецепція, транспорт іонів і субстратів, чутливість тканин до різноманітних впливів, адгезія і агрегація клітин, регуляція активності ферментів і так далі [4, 8, 9, 15, 17, 20]. Показано, що нормальне функціонування органів і тканин здійснюється тільки при цілісності мембранних фосфоліпідів [3, 20]. Будь-які порушення складу і вмісту фосфоліпідів призводять до порушень функціональної активності мембран, а отже, всієї клітини й організму [2, 5, 14].

Як видно з вищесказаного, зміна фосфоліпідного складу органів і тканин займає особливе місце в механізмі виникнення і розвитку патологічних станів. З огляду на цю позицію, ми вирішили досліджувати фосфоліпіди шкіри і сироватки крові у хворих на вітиліго. Вітиліго – поширене захворювання людини, яке характеризується різким зменшенням вмісту меланіну або його повною відсутністю в уражених ділянках шкіри хворих. За даними літератури, від цього дерматозу страждає близько 1,2 % населення земної кулі [1, 12]. Протягом останніх років спостерігається інтенсивне зростання числа хворих на вітиліго, особливо дитячого і юнацького віку, у всьому світі. Проте механізми, які призводять до появи і розповсюдження білих плям на шкірі, все ще не вста-

новлено [16, 19]. Метаболічні порушення, що відбуваються при розвитку вітиліго, не з'ясовано. Залишається також остаточно не вирішеним питання ефективного лікування даного дерматозу [6, 13]. Тому широке вивчення основних ланок метаболічних порушень як у шкірі, так і в цілому організмі хворого має важливе науково-практичне значення в з'ясуванні механізмів розвитку вітиліго і розробці ефективних методів його патогенетичної терапії.

З огляду на це, метою даної роботи було вивчення вмісту і фракційного складу фосфоліпідів у шкірі й сироватці крові здорових осіб і хворих на вітиліго.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Дослідження проводили на 12 здорових особах і 27 хворих на вітиліго. Об'єктами дослідження слугували матеріал біопсії шкіри і сироватка крові. У хворих на вітиліго неуразені та депігментовані ділянки шкіри вивчали окремо.

Екстракцію ліпідів з біоптатів шкіри і сироватки крові та їх очищення від неліпідних домішок здійснювали за методикою Фольча [18] в модифікації Кейтса [7] з використанням хлороформ-метанолової суміші (2:1). Отриманий загальний ліпідний екстракт застосовували для вимірювання кількісного складу і фракціонування фосфоліпідів. Про кількість загальних фосфоліпідів і їх окремих фракцій судили за вмістом в них фосфору, який визначали після мінералізації зразків за методикою Vaskovsky et al. [21]. Результати виражали в

мкг Р на 1 г сухої тканини шкіри і на 1 мл сироватки крові. Фракційний склад фосфоліпідів визначали за допомогою одновимірної висхідної хроматографії на тонкому шарі силікагелю з використанням скляної пластинки розміром 13x18 см, застосовували систему розчинників, що містила хлороформ:метанол:оцтову кислоту:воду (65:43:16:4). Після висушування пластинок фракції фосфоліпідів проявляли в парах йоду. Ідентифікацію фракції фосфоліпідів проводили шляхом нанесення на пластинку свідків. Отримані цифрові дані піддавали статистичній обробці з використанням пакета програм Microsoft Office.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. I. Дослідження шкірної тканини.** У хворих на вітиліго вміст загальних фосфоліпідів у шкірі достовірно менший, ніж у здорових осіб. При цьому зниження рівня сумарних фосфоліпідів спостерігалось як в неуражених, так і в уражених ділянках шкіри хворих на вітиліго. Кількісний вміст загальних фосфоліпідів у шкірі здорових осіб складав 1324,4 (57,9 мкг ліпідного фосфору на 1 г наважки сухої тканини), а цей показник в неуражених і депігментованих ділянках шкіри хворих становив, відповідно, (1039,5±46,1) і (1157±52,9) мкг Р/г сухої тканини.

При фракціонуванні загальних фосфоліпідів шкіри за допомогою тонкошарової хроматографії на силікагелі ми виявили всі основні фракції фосфоліпідів. Показано, що фракційний склад фосфоліпідів шкіри аналогічний іншим органам і тканинам людини [2, 10, 11]. Проте кількісний склад і співвідношення окремих фракцій фосфоліпідів шкіри та інших органів значно відрізняються один від одного.

Порівняльне дослідження кількісного вмісту індивідуальних фракцій фосфоліпідів у біоптатах шкіри здорових осіб і хворих на вітиліго виявило помітну відмінність в отриманих

результатах (табл. 1). При цьому цікавим є той факт, що відхилення від нормальних величин вмісту окремих фракцій фосфоліпідів в неуражених і уражених ділянках шкіри хворих на вітиліго мало однонаправлений характер. Як видно з даних таблиці 1, у шкірі хворих на вітиліго, на відміну від норми, спостерігалось достовірне збільшення вмісту лізофосфатидилхоліну (ЛФХ) і фосфатидної кислоти (ФК). Порівняно з показниками здорової шкіри в неуражених і уражених ділянках шкіри хворих на вітиліго ми встановили помітне зниження вмісту нейтральних фосфоліпідів (сфінгомієлін (СФМ), фосфатидилхолін (ФХ), фосфатидилетаноламін (ФЕА)) на тлі підвищення кількості кислих фракцій фосфоліпідів (фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилінозит (ФІ), кардіоліпін (КЛ), лізофосфатидилхолін, фосфатидна кислота). Так, якщо частка нейтральних фосфоліпідів у шкірі здорових осіб складала в середньому 81,22 % від суми фосфоліпідів, то цей показник в неуражених і уражених ділянках шкіри хворих на вітиліго дорівнював 69,23 і 72,56 % відповідно. Середні показники суми кислих фосфоліпідів у здоровій шкірі, а також в неуражених і депігментованих ділянках шкіри при вітиліго складала, відповідно, 18,78, 30,77 і 27,44 %. Аналіз співвідношень кислих та нейтральних фракцій фосфоліпідів у шкірі здорових осіб і хворих на вітиліго дав такі результати: норма – 0,23, неуражена ділянка шкіри при вітиліго – 0,44 і вітилігоозна ділянка – 0,38.

Таким чином, результати проведених досліджень дозволяють зробити висновок, що фосфоліпідний склад шкіри піддається значній зміні при її вітилігоозному ураженні. Слід зазначити, що результати наших досліджень є абсолютно новими, оскільки в літературі відсутні будь-які дані про фосфоліпідний склад шкіри людини в нормі й при патології.

Таблиця 1 – Фракційний склад фосфоліпідів шкіри в нормі та при вітиліго

Фракції фосфоліпідів	Норма		Неуражена ділянка		Уражена ділянка	
	%	мкг Р/г тканини	%	мкг Р/г тканини	%	мкг Р/г тканини
лізофосфатидилхолін	3,37	44,63±1,96	5,82	60,49±2,68**	5,26	60,88±2,78**
сфінгомієлін	20,62	273,09±11,95	17,89	185,96±8,25*	18,23	211,0±9,67*
фосфатидилхолін	37,61	498,1±21,18	32,86	341,55±15,17*	34,25	396,44±18,15
фосфатидилсерин	3,34	44,22±1,93	5,77	59,98±2,64**	4,48	51,88±2,38*
фосфатидилінозит	6,15	81,43±3,56	7,64	79,42±3,51	7,94	91,9±4,21*
фосфатидилетаноламін	22,99	304,48±13,32	18,48	192,08±8,51*	20,08	232,41±10,64
кардіоліпін	2,21	29,27±1,26	4,3	44,71±1,99**	4,56	52,8±2,41**
фосфатидна кислота	3,71	49,12±2,15	7,24	75,26±3,33**	5,2	60,18±2,75**

Примітка. Тут і в наступній таблиці відмінності достовірні щодо норми: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,001$ .

**II. Дослідження сироватки крові.** Були досліджені вміст загальних фосфоліпідів і фосфоліпідний спектр в сироватці крові здорових осіб і хворих на вітиліго. Результати дослідження представлені в таблиці 2. При вітиліго кількісний вміст загальних фосфоліпідів у сироватці крові хворих мав тенденцію до зниження порівняно з нормою, проте отримані результати виявилися статистично не достовірними. У сироватці крові здорових осіб вміст сумарних фосфоліпідів складав у середньому 74,67 (5,36 мкг ліпідного фосфору на 1 мл сироватки), а при вітиліго цей показник дорівнював 69,01 (5,16 мкг Р/мл ( $p < 0,05$ )).

Фракціонування загальних фосфоліпідів сироватки крові за допомогою тонкошарової хроматографії на силікагелі показало наявність на хроматограмах 8 фракцій як у здо-

рових осіб, так і у хворих на вітиліго. При порівняльному аналізі результатів дослідження були виявлені певні відмінності в кількісному вмісті окремих фракцій фосфоліпідів у сироватці крові здорових осіб і хворих на вітиліго. Ми встановили достовірне підвищення кількості ЛФХ і ФК та зниження вмісту ФІ та КЛ при вітиліго. Так, якщо вміст ЛФХ у сироватці крові здорових осіб складав у середньому 6,6 % і ФК – 2,52 % від загальних фосфоліпідів, то в сироватці крові хворих на вітиліго він становив 8,6 і 4,13 % відповідно. У нормі вміст ФІ складав у середньому 4,97 % і КЛ – 1,67 %, а при вітиліго цей показник дорівнював 4,11 і 0,7 % відповідно. Кількісний вміст решти фракцій фосфоліпідів у сироватці крові хворих на вітиліго практично не відрізнявся від нормальних величин.

Таблиця 2 – Фосфоліпідний склад сироватки крові хворих на вітиліго

Фракції фосфоліпідів	Норма		Вітиліго	
	%	мкг ліпідного Р/мл сироватки	%	мкг ліпідного Р/мл сироватки
лізофосфатидилхолін	6,62	4,94±0,32	8,61	5,94±0,35*
сфінгомієлін	12,64	9,44±0,72	14,41	9,94±0,75
фосфатидилхолін	65,95	49,25±3,45	62,62	43,22±3,28
фосфатидилсерин	3,62	2,7±0,2	3,19	2,2±0,17
фосфатидилінозит	4,97	3,71±0,28	4,11	2,84±0,21*
фосфатидилетаноламін	2,01	1,5±0,11	2,23	1,54±0,12
кардіоліпін	1,67	1,25±0,09	0,70	0,48±0,04**
фосфатидна кислота	2,52	1,88±0,14	4,13	2,85±0,21**
сума	100	74,67±5,36	100	69,01±5,16

**ВИСНОВКИ.** Наведені вище результати наших досліджень показують, що, незважаючи на відсутність достовірних відмінностей у вмісті сумарних фосфоліпідів у сироватці крові здорових осіб і хворих на вітиліго, має місце незаперечний доказ зміни кількісного вмісту індивідуальних фракцій фосфоліпідів у сироватці крові хворих на вітиліго порівняно з аналогічними показниками у здорових осіб. За нашими даними, найбільш глибокій зміні при вітиліго піддаються фракції ЛФХ і ФК як у шкірній тканині, так і в сироватці крові хворих. Спостерігалось різке збільшення цих фосфоліпідів у вивчених об'єктах досліджень. Підвищення концентрації ЛФХ можна пояснити інтенсифікацією перекисного окиснення ліпідів в організмі хворих на вітиліго, що було продемонстровано в дослідженнях ряду авторів [12, 16, 19]. Окиснювальний стрес, що мав місце при вітиліго, може призвести до зміни

активності фосфоліпази А2 або пригнічення процесу реакціювання ЛФХ, що, зрештою, проявлялось збільшенням вмісту останнього. Накопичення ФК як у шкірі, так і в сироватці крові хворих на вітиліго, на наш погляд, можна пояснити тим, що при даній патології відбувається або гальмування перетворення ФК в інші, складніші, фосфоліпіди, або посилений розпад основних фракцій фосфоліпідів, зокрема нейтральних. Дійсно, з результатів даної роботи видно зниження рівня ФХ в сироватці крові й ФХ та ФІ в шкірі при вітиліго.

Таким чином, аналіз результатів наших досліджень наводить на думку, що, по-перше, вітиліго є не місцевим, а системним захворюванням організму, а по-друге, виявлене порушення фосфоліпідного обміну займає важливе місце в молекулярному механізмі розвитку депігментації шкіри при даній патології.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Аріфов С.С., Аріфова М.Х.. Вітиліго – Ташкент: O'qituvchi, 2006. – 167 с.
2. Артікова Д.Т., Джаббаров К.Д., Зайнутдінов Б.Р. Дослідження складу фосфоліпідів піднебінних мигдалин при хронічному тонзиліті // Бюлетень Асоціації лікарів Узбекистану. – 2006. – № 1. – С. 64-66.
3. Васьковський В.Е. Ліпіди // Соросівський освітній журнал. – 1997. – № 3. – С. 22-27.
4. Владимиров Ю.А. Біологічні мембрани і незапрограмована смерть клітини // Соросівський освітній журнал. – 2000. – № 9. – С. 2-9.
5. Владимиров Ю.А. Роль порушення властивостей ліпідного шару мембран в розвитку патологічних процесів // Патол. фізіол. і експерим. тер. – 1989. – № 4. – С. 7-9.
6. Капкаєв Р.А., Любан Б.Л., Ібрагімов О.Д., Камалов Х.Х. Сучасний погляд на проблему вітиліго і наш досвід його лікування // Новини дерматології і репродуктивного здоров'я. – 2008. – № 2. – С. 77-81.
7. Кейтс М. Техніка ліпідології. – М.: Мир, 1975. – С. 324.
8. Роль ліпідів в метаболічному ефекті гормонів / За ред. А.Н. Миколаєва. – Ташкент: Фан, 1990. – С. 10-138.
9. Саатов Т.С. Роль ліпідних компонентів біологічних мембран в рецепції гормонів і функціонуванні аденілатциклазної системи // Укр. біохім. журн. – 1981. – **53**, № 2. – С. 44-51.
10. Саатов Т.С., Абідов А.А., Ісамітдінова І.М. Фосфоліпідний склад тромбоцитів крові в нормі і при цукровому діабеті // Проблеми ендокринології. – 1982. – № 5. – С. 3-6.
11. Саатов Т.С., Саїпов Т.Д., Ісаєв Е.І., Мансуров Б.М. Кількісний склад і функціональна роль фосфоліпідів щитовидної залози при вузловому гіпотиреоїдному зобі // Проблеми ендокринології. – 1987. – № 1. – С. 5-8.
12. Солов'ян Л.Е., Ломоносов К.М. Вітиліго. Сучасний стан проблеми (за матеріалами XXI Всесвітнього конгресу дерматологів) // Рос. журн. шкірних і венеричних хвороб. – 2008. – № 5. – С. 80-81.
13. Суворов А.П., Жаркова Е.Е., Богомоллов Н.В. Фототерапія вітиліго // Рос. журн. шкірних і венеричних хвороб. – 2008. – № 5. – С. 81-83.
14. Тулабаєва Г.М., Рахімов Ш.М., Саатов Т.С. Характеристика стану фосфоліпідного обміну при важких клінічних формах інфаркту міокарда // Журн. теорет. і клін. мед. – 2001. – № 4. – С. 30-33.
15. Cocco L., Maraldi N.M., Manzoli F.A. et al. Phospholipid interaction in rat liver nuclear matrix // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1980. – **96**. – P. 890-898.
16. Dell Anna L.M., Picardo M. A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo // Pigment Cell. Res. – 2006. – **19**. – P. 406-411.
17. Farese R.V. Phospholipids as intermediates in hormone action // Molec. Cell Endocrinol. – 1984. – **35**. – P. 1-14.
18. Folch J. A simple method for the isolation and purification on total lipids from animal tissues // J. Biol. Chem. – 1957. – **226**. – P. 497-509.
19. Korsunskaya I.M., Suvorova K.N., Dvoryankova E.V. Modern Aspects of Vitiligo Pathogenesis // Doklady Biological Sciences. – 2003. – **388**. – P. 38-40.
20. Saatov T.S., Akramova G.S. Structural integrity of plasma membrane lipid matrix and transmembrane transfer of hexoses upon diabetes mellitus // Chemistry and Physics of lipids. – 2000. – **7**, № 1. – P. 57-58.
21. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasensky T. Universal reagent for phospholipid analysis // J. Chromatogr. – 1975. – **114**. – P. 129-141.

## ИССЛЕДОВАНИЕ ФОСФОЛИПИДОВ КОЖИ И СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ВИТИЛИГО

**Б.Т. Саатов<sup>1,2</sup>, О.И. Умеров<sup>1</sup>**

**ИНСТИТУТ БИОХИМИИ АН РУз<sup>1</sup>, ТАШКЕНТ  
НИИ ДЕРМАТОЛОГИИ И ВЕНЕРОЛОГИИ МЗ РУз<sup>2</sup>, ТАШКЕНТ**

### Резюме

*Изучено содержание и фракционный состав фосфолипидов в коже и сыворотке крови здоровых лиц и больных витилиго. Установлено снижение содержания суммарных фосфолипидов, как в коже, так и в сыворотке крови, по сравнению с нормой. При фракционировании общих фосфолипидов кожи и сыворотки крови с помощью тонкослойной хроматографии на хроматограммах обнаружено 8 фракций. Сравнительное изучение количественных показателей отдельных фракций фосфолипидов в коже и сыворотке крови здоровых лиц и больных витилиго показало некоторое отличие. По сравнению с нормой при витилиго наблюдалось заметное снижение содержания нейтральных фосфолипидов на фоне достоверного увеличения количества кислых фракций фосфолипидов в изученных объектах исследования. Имело место наиболее выраженное повышение содержания лизофосфатидилхолина и фосфатидной кислоты при витилиго. Таким образом, при витилигоизмом поражении организма происходят значительные нарушения в фосфолипидном составе кожи и сыворотке крови больных.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** витилиго, фосфолипиды, кожа, сыворотка крови.

# STUDY OF SKIN AND BLOOD SERUM PHOSPHOLIPIDS IN PATIENTS WITH VITILIGO

B.T. Saatov, O.I. Umerov

INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY, UZBEKISTAN ACADEMY OF SCIENCES<sup>1</sup>, TASHKENT  
SRI OF DERMATOLOGY AND VENEROLOGY OF MPH OF UR<sup>2</sup>, TASHKENT

## Summary

*Content and fraction composition of phospholipids in the skin and blood serum in healthy subjects and patients with vitiligo were studied. Decrease in the content of sum phospholipids both in the skin and blood serum as compared with the normal one was established. Upon fractionating of total phospholipids of the skin and blood serum by means of thin layer chromatography 8 fractions were found on the chromatograms. Comparative study on quantitative parameters of individual fractions of the skin and blood serum phospholipids in healthy subjects and patients with vitiligo revealed definite difference. Contrary to the normal parameters marked decrease in the content of neutral against the confident increase in acidic fractions of phospholipids was found in the objects under the study. In vitiligo the most marked increase in the content of lysophosphatidylcholine and phosphatidic acid was noted. Upon vitiligious damage of an organism significant disorders in phospholipid content in the skin and blood serum of the patients can be seen.*

KEY WORDS: vitiligo, phospholipids, skin, blood serum.

Отримано 3.04.2009 р.

Адреса для листування: Б.Т. Саатов, просп. Х. Абдуллаєва, 56, Ташкент, 100125, Узбекистан.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

## ЖИРНОКИСЛОТНИЙ СКЛАД ЛІПІДІВ ПЛАЗМИ КРОВІ ТА ЛЕЙКОЦИТІВ ЩУРІВ ЗА РІЗНОГО ВМІСТУ В РАЦІОНІ ПОЛІНЕНАСИЧЕНИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ

А.П. Дідович, І.В. Вудмаска, О.І. Віщур  
Львівський національний університет ветеринарної медицини  
та біотехнологій імені С.З. Ґжицького  
Інститут біології тварин УААН, Львів

*Наведено результати дослідження впливу введення до раціону щурів соняшникової олії, ріпакової олії або риб'ячого жиру на співвідношення жирних кислот у ліпідах плазми крові та лейкоцитів. Встановлено значне збільшення кількості поліненасичених жирних кислот родини n-3 у плазмі крові та лейкоцитах тварин, які отримували риб'ячий жир. Вміст жирних кислот родини n-6 при цьому дещо зменшувався.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** щури, жирні кислоти, n-3, n-6, раціон, плазма крові, лейкоцити.

ВСТУП. Поліненасичені жирні кислоти впливають на формування імунної відповіді організму, діючи як внутрішньоклітинні та міжклітинні медіатори [11, 13, 16, 26, 35, 36]. З арахідонової та ейкозапентаєнової кислот (похідні, відповідно, лінолевої та ліноленової кислот) в організмі синтезується велика кількість біологічно активних сполук, частина з яких пов'язана із запальними процесами та імунною функцією [6, 7, 10-12, 15, 24, 27, 34]. З арахідонової кислоти (20:4 n-6) утворюються прозапальні медіатори: у нейтрофілах – лейкотрієни  $B_4$  (агрегація нейтрофілів),  $C_4$ ,  $D_4$ ,  $E_4$  (звуження судин та бронхів, підвищення проникності капілярів), в ендотеліальних клітинах – простагландин  $I_2$  (інгібування агрегації еритроцитів, розширення судин), в еритроцитах – тромбоксан  $A_2$  (активація агрегації еритроцитів, звуження судин). З ейкозапентаєнової кислоти (20:5 n-3) утворюються протизапальні медіатори: у нейтрофілах – лейкотрієни  $B_5$  (агрегація нейтрофілів),  $C_4$ ,  $D_4$ ,  $E_4$ , в ендотеліальних клітинах – простагландин  $I_2$ , в еритроцитах – тромбоксан  $A_3$  (звуження судин, помірною активація агрегації еритроцитів).

Поліненасичені жирні кислоти впливають на імунну і запальну функції як опосередковано, через утворення простагландинів, лейкотрієнів, тромбоксанів [24, 25], так і безпосередньо, діючи на синтез біологічно активних перекисних сполук, продукцію цитокінів, міграцію лейкоцитів, фагоцитоз, трансмембранну передачу сигналу, транскрипцію генів, ацилювання білків, обмін кальцію [1, 26]. Кислоти родини n-3 пригнічують проліферацію лімфо-

цитів, синтез цитокінів та антитіл, апоптоз, активність Т-лімфоцитів [7, 8, 21, 26, 28, 29, 31]. Кислоти родини n-6 мають більш складну і різнобічну дію, вони можуть проявляти як інгібуючий, так і стимулювальний вплив [26]. У жирових тілах активних лейкоцитів зростає концентрація цитокінів, хемокінів, факторів росту [3].

Більшість жирних кислот, наявних у лейкоцитах, входить до складу двох ліпідних структур – клітинних мембран та цитоплазматичних жирових включень [3]. Жирові включення являють собою оточені моношаром фосфоліпідів вакуолі, що містять триацилгліцероли та ефіри холестеролу [32]. Хоча жирові включення характерні для багатьох типів клітин, особливо адипоцитів, у лейкоцитах вони виконують специфічну функцію. Особливістю жирових включень лейкоцитів є високий вміст у них поліненасичених жирних кислот. Встановлено, що кількість жирових включень, а відповідно і кількість жирних кислот у лейкоцитах, зростає при стимулюванні імунної функції організму [3]. При цьому в їх складі збільшується вміст поліненасичених жирних кислот, особливо арахідонової (20:4 n-6), ейкозапентаєнової (20:5 n-3) та докозагексаєнової (22:6 n-3). Отже, жирові включення у лейкоцитах, на відміну від жирових включень інших клітин, зокрема адипоцитів, не виконують функції енергетичного депо (або ж вона є неосновною), а служать для депонування поліненасичених жирних кислот. Вони також містять необхідні ферменти синтезу ейкозаноїдів, жирних кислот (ацетил-КоА-карбоксилаза), стероїдів (сквален-епоксидаза, 17-β-гідроксистероїлдегідрогеназа, ланостеринсинтаза) [3].

© А.П. Дідович, І.В. Вудмаска, О.І. Віщур, 2009.

Насичені жирні кислоти також впливають на функцію лейкоцитів. Зокрема, лауринова (12:0), міристинова (14:0), пальмітинова (16:0) і стеаринова (18:0) кислоти стимулюють активність макрофагів і утворення запальних цитокінів [30].

Жирнокислотний склад лейкоцитів, як і інших клітин організму, залежить від жирнокислотного складу раціону [5, 20, 23, 33]. Змінюючи ліпідний компонент раціону, можна у широких межах модифікувати вміст і співвідношення жирних кислот у мембранах та, особливо, жирових включеннях. Таким чином, збільшення у раціоні здорових особин кількості та співвідношення поліненасичених жирних кислот дає можливість підвищити їх вміст у лейкоцитах, що посилює імунні та протизапальні властивості організму при інфікуванні.

Значна частина жирних кислот, що надходять з кормом, депонується у жировій тканині. Отже, введення до раціону жирових добавок певного складу не лише змінює жирнокислотний склад лейкоцитів безпосередньо після всмоктування у кров, а й забезпечує запас поліненасичених жирних кислот в адипоцитах [30], що при необхідності дозволяє швидко мобілізувати їх у кров'яне русло й активувати лейкоцити для імунної та протизапальної відповіді.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Дослід проведено на трьох групах безпородних білих щурів, по 10 особин у кожній групі. Тварини отримували стандартний корм, що містив 5 % жиру. Жировим компонентом раціону щурів 1-ї групи була соняшникова олія, 2-ї – ріпакова олія, а 3-ї – риб'ячий (трісковий) жир. Таким чином, ми використовували три експериментальні раціони, аналогічні за всіма складниками і показниками поживності, які відрізнялись лише за жирнокислотним складом. Вказані раціони згодовували протягом одного місяця. Наприкінці досліду щурів забивали і брали для досліджень зразки крові. Плазму крові отримували шляхом центрифугування цільної крові. Лейкоцити виділяли седиментацією [4, 14, 19]. Для цього до 5 мл гепаринізованої крові додавали 2,5 мл 6 % розчину декстрану і витримували 1 год за кімнатної температури для агрегації та седиментації еритроцитів. До супернатанту додавали 5 мл фосфатного буфера (рН 7,0), після чого центрифугували при 160 g протягом 5 хв. Осад 10 хв ресуспендували в 1 мл 0,9 % розчину NaCl для видалення залишків еритроцитів. Клітини знову промивали фосфатним буфером і центрифугували при 160 g протягом 10 хв. Лейкоцити

ресуспендували у 2 мл охолодженого 1,8 % розчину NaCl. Суспензію перемішували і центрифугували протягом 5 хв. Супернатант видаляли, а осад використовували для досліджень.

Ліпіди екстрагували за методом Блая і Даера [2]. Жирні кислоти метилювали метилом натрію за кімнатної температури з наступним підкисленням сірчаною кислотою і продовженням метилювання за температури 70 °C [9, 17, 18, 22, 28]. Для дослідження жирнокислотного складу лейкоцитів, через недостатню для аналізу кількість матеріалу, зразки метилових ефірів жирних кислот щурів кожної з груп об'єднували попарно. Жирнокислотний склад визначали методом газорідної хроматографії на газовому хроматографі Hewlett Packard HP-6890 з полум'яно-іонізаційним детектором, обладнаному капілярною колонкою SP-2380, довжиною 100 м (Supelco). Програмували температуру термостата колонок від 40 до 260 °C. Температура дозатора – 280 °C, детектора – 290 °C. Газ-носії – гелій. Для ідентифікації хроматографічних піків та обрахунку хроматограм використовували стандарти метилових ефірів жирних кислот (Supelco).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Виявлено відмінності у жирнокислотному складі досліджуваних раціонів залежно від виду жирового інгредієнта (табл. 1). Раціон з ріпаковою олією відрізнявся від раціону із соняшnikовою олією більшим вмістом олеїнової, лінолевої і гадолеїнової кислот та меншим вмістом лінолевої кислоти. Раціон з риб'ячим жиром містив більше міристинової, пальмітинової, ейкоза- і докозапентаєнової та докозагексаєнової кислот, ніж раціони з рослинними жирами, тоді як олеїнової і лінолевої кислот у ньому було менше. Специфічність жирнокислотного складу вказаних жирів призвела до суттєвих відмінностей у співвідношенні n-6 та n-3 кислот, яке у раціоні з ріпаковою олією було втричі меншим, ніж у раціоні із соняшnikовою олією, а в раціоні з риб'ячим жиром – відповідно, у 14 і 4 рази меншим, ніж у раціонах із соняшnikовою і ріпаковою олією. Усі відмінності в таблиці 1, за винятком кислот 20:2 і 20:3, вірогідні.

Відмінності у співвідношенні насичених і мононенасичених жирних кислот у плазмі крові щурів 1-ї та 2-ї груп переважно корелювали з відмінностями їх вмісту в раціонах (табл. 2). Така закономірність була характерною і для кислот родини n-6 – лінолевої та арахідонової. Натомість відносний вміст кислот родини n-3 мав певні особливості. Так, незважаючи на значно більший вміст лінолевої кислоти у раціоні, який містив ріпакову олію, порівня

Таблиця 1 – Жирнокислотний склад корму, % загальної кількості жирних кислот

Жирні кислоти		Групи тварин		
		1-ша	2-га	3-тя
14:0	міристинова	0,23±0,01	0,28±0,01**	2,11±0,03***
16:0	пальмітинова	9,46±0,11	10,32±0,08***	17,25±0,12***
16:1 n-7	пальмітолеїнова	0,38±0,02	0,57±0,02***	4,40±0,09***
18:0	стеаринова	4,51±0,05	3,70±0,14***	3,26±0,12**
18:1 n-9	олеїнова	31,12±0,52	43,33±0,31***	20,43±0,44***
18:2 n-6	лінолева	48,90±0,70	31,26±0,35***	23,92±0,28***
18:3 n-3	ліноленова	3,48±0,09	8,00±0,05***	5,24±0,16***
20:1 n-9	гадолеїнова	0,85±0,03	1,54±0,07***	0,56±0,05**
20:2 n-9	ейкозадієнова	0,12±0,01	0,11±0,01	0,10±0,01
20:3 n-6	ейкозатрієнова	0,15±0,02	0,12±0,01	0,10±0,01
20:4 n-6	арахідонова	0,23±0,01	0,18±0,02	0,07±0,02***
20:5 n-3	ейкозапентаєнова	0,15±0,04	0,15±0,01	8,30±0,19***
22:5 n-3	докозапентаєнова	0,25±0,01	0,24±0,02	2,89±0,08***
22:6 n-3	докозагексаєнова	0,17±0,01	0,20±0,02	11,37±0,57***
Співвідношення n-6 / n-3		12,16	3,67	0,87

Примітка. Тут і в наступних таблицях вірогідність відмінностей порівняно з 1-ю групою: \* – <0,05; \*\* – <0,01; \*\*\* – <0,001.

но з раціоном з соняшниковою олією, її кількість у плазмі крові щурів 2-ї групи була меншою ( $p<0,01$ ). Очевидно, частина лінолевої кислоти елонгується і десатурується, про що свідчить зростання вмісту ейкозапентаєнової ( $p<0,001$ ), докозапентаєнової та докозагексаєнової ( $p<0,05$ ) кислот у плазмі крові тварин 2-ї групи.

У плазмі крові щурів 3-ї групи (риб'ячий жир) жирнокислотний склад корелював зі складом раціону для насичених жирних кислот. Проте, незважаючи на меншу кількість у раціоні тварин цієї групи олеїнової та лінолевої кислот, у плазмі крові їх кількість не відрізня-

лася від показників 2-ї групи. Вміст лінолевої кислоти у плазмі крові щурів незначно залежав від її наявності у кормі. Це видно з того, що найбільшу її кількість виявлено у крові тварин 1-ї групи ( $p<0,01$ ), які отримували раціон з найменшою кількістю цієї жирної кислоти. Кров щурів 3-ї групи містила значно менше, ніж кров тварин 1-ї та 2-ї груп, ейкозатрієнової та арахідонової кислот – похідних лінолевої кислоти, якої у складі їх раціону також було менше. Наявність великої кількості ейкоза- і докозапентаєнової та докозагексаєнової кислот у раціоні з рибачим жиром призвела до суттєвого зростання їх вмісту в плазмі крові ( $p<0,001$ ).

Таблиця 2 – Жирнокислотний склад плазми крові, % загальної кількості жирних кислот

Жирні кислоти		Групи тварин		
		1-ша	2-га	3-тя
14:0	міристинова	0,58±0,02	0,71±0,03**	1,35±0,10***
16:0	пальмітинова	14,29±0,48	14,00±0,65	17,22±0,51
16:1 n-7	пальмітолеїнова	1,01±0,05	1,25±0,07*	2,81±0,08***
18:0	стеаринова	12,46±0,47	14,44±0,71*	10,11±0,50**
18:1 n-9	олеїнова	27,60±1,22	36,42±0,84***	27,38±1,59
18:2 n-6	лінолева	30,28±1,64	18,34±0,40***	22,46±1,33**
18:3 n-3	ліноленова	2,51±0,12	1,86±0,09**	1,87±0,07**
20:1 n-9	гадолеїнова	0,08±0,01	0,13±0,01***	0,05±0,01**
20:2 n-9	ейкозадієнова	0,21±0,01	0,28±0,02*	0,25±0,02
20:3 n-6	ейкозатрієнова	1,86±0,04	2,11±0,11	0,75±0,03
20:4 n-6	арахідонова	7,22±0,33	6,77±0,27	3,50±0,09**
20:5 n-3	ейкозапентаєнова	0,55±0,04	1,97±0,05***	7,64±0,28***
22:5 n-3	докозапентаєнова	0,38±0,02	0,49±0,02	0,97±0,04***
22:6 n-3	докозагексаєнова	0,97±0,05	1,23±0,11*	3,64±0,15***
Співвідношення n-6 / n-3		8,93	4,90	1,89



Незважаючи на більшу кількість міристинової та меншу кількість стеаринової кислот у плазмі крові щурів 3-ї групи ( $p < 0,001$ ), у лейкоцитах тварин всіх груп їх вміст майже не відрізнявся (табл. 3). Не виявлено у лейкоцитах міжгрупових відмінностей і для олеїнової, лінолевої, ліноленової, гадолеїнової та ейкозатрієнової кислот, кількість яких у плазмі крові суттєво відрізнялась у тварин різних груп.

У лейкоцитах щурів 2-ї групи виявлено менше, ніж у тварин 1-ї групи, арахідонової та більше ейкозапентаєнової кислот ( $p < 0,01$ ), що узгоджується з їх кількістю у плазмі крові й пов'язано з різною кількістю у складі соняшникової і ріпакової олій їх попередників – лінолевої та ліноленової кислот.

Лейкоцити щурів 3-ї групи відрізнялися від лейкоцитів тварин 1-ї та 2-ї груп набагато більшим вмістом жирних кислот з довжиною вуглецево-

го ланцюга 20 і 22 вуглецевих атомів ( $p < 0,001$ ) – попередників біологічно активних речовин, які беруть участь у регулюванні імунної відповіді та запальної функції. Кислот родини n-6 (ейкозатрієнової та арахідонової) було менше, а кислот родини n-3 (ейкоза- і докозапентаєнової та докозагексаєнової) – більше, ніж у лейкоцитах щурів 1-ї та 2-ї груп. Особливо значні відмінності виявлено для n-3 попередника ейкозаноїдів – ейкозапентаєнової кислоти, частка якої в жирнокислотному складі ліпідів лейкоцитів щурів 3-ї групи була у шість разів більшою, ніж у лейкоцитах тварин 1-ї групи, і в чотири рази більшою порівняно з лейкоцитами щурів 2-ї групи. Зменшення кількості n-6 попередника ейкозаноїдів – арахідонової кислоти у лейкоцитах щурів 3-ї групи не таке значне. Порівняно з лейкоцитами тварин 1-ї та 2-ї груп її кількість була меншою лише в 1,6 і 1,2 раза відповідно.

Таблиця 3 – Жирнокислотний склад лейкоцитів, % загальної кількості жирних кислот

Жирні кислоти		Групи тварин		
		1-ша	2-га	3-тя
14:0	міристинова	0,12±0,01	0,15±0,02	0,14±0,01
16:0	пальмітинова	28,61±1,22	31,32±2,09	27,50±0,78
16:1 n-7	пальмітолеїнова	0,08±0,01	0,12±0,01*	0,15±0,02*
18:0	стеаринова	17,13±0,74	19,39±0,90	20,10±0,73
18:1 n-9	олеїнова	20,41±0,50	21,57±1,12	22,76±1,47
18:2 n-6	лінолева	16,55±1,10	13,44±0,75	14,61±0,84
18:3 n-3	ліноленова	0,60±0,02	0,73±0,05	0,52±0,02
20:1 n-9	гадолеїнова	0,62±0,04	0,48±0,04	0,71±0,05
20:2 n-9	ейкозатрієнова	0,11±0,01	0,14±0,01	0,08±0,01
20:3 n-6	ейкозатрієнова	1,74±0,10	1,55±0,07	0,97±0,05***
20:4 n-6	арахідонова	12,49±0,64	9,33±0,48**	7,56±0,23***
20:5 n-3	ейкозапентаєнова	0,31±0,02	0,46±0,03**	1,94±0,09***
22:5 n-3	докозапентаєнова	0,11±0,01	0,09±0,01	0,37±0,02***
22:6 n-3	докозагексаєнова	1,12±0,06	1,23±0,03	2,59±0,08***
Співвідношення n-6 / n-3		14,38	9,69	4,27

**ВИСНОВКИ.** 1. Ліпіди плазми крові щурів, які отримували ріпакову олію, містять більше олеїнової, ейкозапентаєнової та докозагексаєнової кислот, менше – лінолевої та ліноленової, ніж ліпіди плазми крові тварин, які одержували соняшникову олію. У плазмі крові щурів, які отримували риб'ячий жир, виявлено менше ейкозатрієнової та арахідонової кислот, більше – ейкоза- і докозапентаєнової та докозагексаєнової.

2. У лейкоцитах щурів, які отримували риб'ячий жир, виявлено значно більше кислот родини n-3 (ейкоза- і докозапентаєнової та докозагексаєнової), менше – кислот родини n-6 (ейкозатрієнової та арахідонової). Для лейкоцитів щурів, які одержували ріпакову олію, порівняно з лейкоцитами тварин, які отримували соняшникову олію, встановлено подібні зміни, проте виражені вони були значно меншою мірою.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Belluzzi A. Polyunsaturated fatty acids (n-3 AGPIs) and inflammatory bowel disease (IBD): pathogenesis and treatment / A. Belluzzi // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. – 2004. – 8. – P. 225–229.

2. Bligh E.G. A rapid method for total lipid extraction and purification / E.G. Bligh, W.J. Dyer // Can. J. Biochem. Physiol. – 1959. – 37. – P. 911–917.

3. Bozza P.T. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation / P.T. Bozza,

- C.B. Melo // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. – 2005. – **100**, suppl. 1. – P. 113-120.
4. Bretz U. Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes / U. Bretz, M. Baggolini // J. Cell. Biol. – 1974. – **63**. – P. 251-269.
5. Calder P.C. Dietary modification of inflammation with lipids / P.C. Calder // Proc. Nutr. Soc. – 2002. – **61**. – P. 345-358.
6. Calder P.C. Fatty acids and lymphocyte functions / P.C. Calder, P. Yaqoob, F. Thies [et al.] // Br. J. Nutr. – 2002. – **87**. – P. 31-48.
7. Calder P.C. Long-chain polyunsaturated fatty acids and inflammation / P.C. Calder // Scandinavian J. Food Nutr. – 2006. – **50**, suppl. 2. – P. 54-61.
8. Calder P.C. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic / P.C. Calder // Lipids. – 2003. – **8**. – P. 343-352.
9. Cert A. Methods of preparation of fatty acid methyl esters (FAME). Statistical assesment of the precision characteristics from a collaborative trial / A. Cert, W. Moreda, M.C. Perez-Camino // Grasas Aceites. – 2000. – **51**, № 6. – P. 447-456.
10. Chlopicki S. Obligatory role of lipid mediators in platelet-neutrophil adhesion / S. Chlopicki, M. Lomnicka, R.J. Gryglewski // Thromb. Res. – 2003. – **15**. – P. 287-292.
11. Das U.N. Essential fatty acids and their metabolites could function as endogenous HMG-CoA reductase and ACE enzyme inhibitors, anti-arrhythmic, anti-hypertensive, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, cytoprotective, and cardioprotective molecules / U.N. Das // Lipids in Health and Disease. – 2008. – **7**. – P. 37-54.
12. De Caterina R. Control of endothelial-leukocyte adhesion molecules by n-3 fatty acids / R. De Caterina, P. Libby // Lipids. – 1996. – **31**. – P. 557-563.
13. Doshi M. Effect of dietary enrichment with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) or n-9 PUFA on arachidonate metabolism in vivo and experimentally induced inflammation in mice / M. Doshi, S. Watanabe, T. Niimoto [et al.] // Biol. Pharm. Bull. – 2004. – **27**, № 3. – P. 319-323.
14. Erman F. Determination of saturated and unsaturated fatty acids amount in leukocyte membranes from subjects fed with solid and fluid oils / F. Erman, S. Aydin, Y. Demir [et al.] // J. Biochem. Mol. Biol. – 2006. – **39**, № 5. – P. 516-521.
15. Garcia M.D.M. Importance of lipids in the nutritional treatment of inflammatory diseases / M.D.M. Garcia, C.M.A. Garcia, A.G. Hernandez // Nutr. Hosp. – 2006. – **21**, suppl. 2. – P. 28-41.
16. Horrocks L.A. Docosahexaenoic acid in the diet: its importance in maintenance and restoration of neural membrane function / L.A. Horrocks, A.A. Farooqui // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. – 2004. – **70**. – P. 361-372.
17. Ichihara K. An improved method for rapid analysis of the fatty acids of glycerolipids / K. Ichihara, A. Shibahara, K. Yamamoto [et al.] // Lipids. – 1996. – **31**, № 5. – P. 535-539.
18. JUPAC. Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 7th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986.
19. Kelmner M.S. Separation and functional characterization of human neutrophil subpopulations / M.S. Kelmner, J.I. Gallin // Blood. – 1978. – **51**. – P. 659-669.
20. Kew S. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans / S. Kew, M.D. Mesa, S. Tricon [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. – 2004. – **79**. – P. 674-681.
21. Kew S. Relation between the fatty acid composition of peripheral blood mononuclear cells and measures of immune cell function in healthy, free-living subjects aged 25-72 / S. Kew, T. Banerjee, A. Minihane [et al.] // Am. J. Clin. Nutr. – 2003. – **77**. – P. 1278-1286.
22. Liu K.-S. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-chromatographic analysis of lipids in biological materials / K.-S. Liu J. // Am. Oil Chem. Soc. – 1994. – **71**, № 11. – P. 1179-1299.
23. Lombardi V.R.M. Short term food supplementation effects of a fish derived extract on the immunological status of pregnant rats and their suckings pups / V.R.M. Lombardi, A. Cagiao, L. Fernandez-Novoa [et al.] // Nutr. Res. – 2001. – **21**. – P. 1425-1434.
24. McCowen K.C. Essential fatty acids and their derivatives / K.C. McCowen, B.R. Bistrrian // Curr. Opin. Gastroenterol. – 2005. – **21**. – P. 207-215.
25. Nakamura M.T. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals / M.T. Nakamura, T.Y. Nara // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids. – 2003. – **68**. – P. 145-150.
26. Pompeia C. Effect of fatty acids on leukocyte function / C. Pompeia, L.R. Lopes, C.K. Miyasaka [et al.] // Braz. J. Med. Biol. Res. – 2000. – **33**. – P. 1255-1268.
27. Sethi S. Oxidized omega-3 fatty acids in fish oil inhibit leukocyte-endothelial interactions through activation of PPAR / S. Sethi, O. Ziouzenkova, H. Ni [et al.] // Blood. – 2002. – **100**, № 4. – P. 1340-1346.
28. Shaikh S.R. Immunosuppressive effects of polyunsaturated fatty acids on antigen presentation by human leukocyte antigen class I molecules / S.R. Shaikh, M. Edidin // J. Lipid Res. – 2007. – **48**. – P. 127-138.
29. Simopoulos A.P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases / A.P. Simopoulos // J. Am. Coll. Nutr. – 2002. – **21**. – P. 495-505.
30. Smith C.W. Diet and leukocytes / C.W. Smith // Am. J. Clin. Nutr. – 2007. – **86**. – P. 1257-1258.
31. Switzer K.C. (n-3) Polyunsaturated fatty acids promote activation-induced cell death in murine T lymphocytes / K.C. Switzer, D.N. McMurray, J.S. Morris [et al.] // J. Nutr. – 2003. – **133**. – P. 496-503.
32. Tauchi-Sato K. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition / K. Tauchi-Sato, S. Ozeki, T. Houjou [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, № 46. – P. 44507-44512.
33. Thies F. Manipulation of the type of fat consumed

by growing pigs affects plasma and mononuclear cell fatty acid compositions and lymphocyte and phagocyte functions / F. Thies, L.D. Peterson, J.R. Powell [et al.] // J. Anim. Sci. – 1999. – **77**. – P. 137-147.

34. Wallace F.A. Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects / F.A. Wallace, E.A. Miles, P.C. Calder // Br. J. Nutr. – 2003. – **89**. –

P. 679-689.

35. Yaqoob P. Lipids and immune response / P. Yaqoob // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 1998. – **1**. – P. 153-161.

36. Yaqoob P. Lipids and the immune response: from molecular mechanisms to clinical applications / P. Yaqoob // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2003. – **6**. – P. 133-150.

## **ЖИРНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ ЛИПИДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ И ЛЕЙКОЦИТОВ КРЫС ПРИ РАЗНОМ СОДЕРЖАНИИ В РАЦИОНЕ ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ**

**А.П. Дидович, И.В. Вудмаска, О.И. Вищур**

ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОТЕХНОЛОГИЙ  
ИМЕНИ С.З. ГЖИЦКОГО  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ УААН, ЛЬВОВ

### **Резюме**

*Представлены результаты исследования влияния введения в рацион крыс подсолнечного масла, рапсового масла или рыбьего жира на соотношение жирных кислот в липидах плазмы крови и лейкоцитов. Установлено значительное увеличение количества полиненасыщенных жирных кислот семейства n-3 в плазме крови и лейкоцитах животных, получавших рыбий жир. Содержание жирных кислот семейства n-6 при этом несколько уменьшалось.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** крысы, жирные кислоты, n-3, n-6, рацион, плазма крови, лейкоциты.

## **FATTY-ACID PROFILE OF BLOOD PLASMA AND LEUKOCYTES OF RATS FED DIETS CONTAINING DIFFERENT LEVELS OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS**

**A.P. Didovych, I.V. Vudmaska, O.I. Vishchur**

LIVIV NATIONAL UNIVERSITY OF VETERINARY MEDICINE AND BIOTECHNOLOGIES BY S.Z. GZHYTSKY  
INSTITUTE OF ANIMAL BIOLOGY OF UAAS, LVIV

### **Summary**

*Data about investigation of influence of sunflower, rapeseed or fish oil inclusion into standard rats diet as a fat component on fatty acids composition of blood plasma and leucocytes are presented. Significant increasing of n-3 polyunsaturated fatty acids level in the blood plasma and leucocytes of animals diet with fish oil have been found. At the same time content of n-6 polyunsaturated fatty acids has been decreased.*

**KEY WORDS:** rats, fatty acids, n-3, n-6, diet, blood plasma, leucocytes.

Отримано 26.05.2009 р.

**Адреса для листування:** А.П. Дідович, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, вул. Пекарська, 50, Львів, 79010, Україна.

## ЗАЛЕЖНІСТЬ ПРОТИСУДОМНОЇ АКТИВНОСТІ ВІД МОЛЕКУЛЯРНОЇ БУДОВИ

В.А. Георгіянци, Л.О. Перехода, А.В. Глуценко  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

*Розраховано коефіцієнти розподілу, експериментально визначено хроматографічний час утримання та значення величини утримання для відомих протисудомних препаратів і похідних барбітурової кислоти. Встановлено, що величина ліпофільності добре корелює з хроматографічним часом утримання та величиною утримання в ряді сполук певної спільної структури – похідних барбітурової кислоти.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** ліпофільність, хроматографічний час утримання, кореляція, величина утримання, протисудомна активність, похідні барбітурової кислоти.

ВСТУП. В останні роки значне розповсюдження отримали підходи до вибору структур цілеспрямованого синтезу, який базується на різноманітних моделях, що визначають зв'язок між структурою молекул та її біологічною дією. Створення лікарських засобів із заданою біологічною активністю та мінімальною кількістю або відсутністю побічних ефектів (мішенеспецифічна активність), що є завданням хіміків, не можливе на даний час без раціонального драг-дизайну (від англ. drug – ліки) [15, 16].

Найбільш доступною є концепція “схожість з лідерами” (“lead-likeness”) – емпіричні правила, одержані за результатами статистичних досліджень властивостей сполук-лідерів та отриманих при їх оптимізації лікарських препаратів [3, 12]. Саме з лідерів шляхом поліпшення структури та поглибленого тестування виявляють кандидата в ліки (drug candidate). За цією концепцією структуру органічної сполуки описують за допомогою фізико-хімічних властивостей – так званих дескрипторів [4]. Шляхом аналізу даних дескрипторів або відбирають найбільш перспективні сполуки (PASS), або виключають небажані (ADMET) [10, 14]. Досить великий вплив на величину біологічної активності, за даними авторів [5, 6, 9], мають такі дескриптори, як значення ліпофільності або гідрофобного параметра, дипольного моменту, молекулярної маси, константи Гамета, стеричного параметра Тафта

замісників у певних атомів, атомних зарядів, електронної густини, чисельність Н-донорів, чисельність Н-акцепторів, чисельність конформаційно рухливих зв'язків, ароматичність, ступінь розгалуження зв'язків, присутність або відсутність специфічних функціональних груп та ін. Одним із найбільш важливих критеріїв оцінювання взаємозв'язку “структура–активність” для речовин протисудомної дії, що обов'язково повинні проходити ГЕБ, вважають ліпофільність сполуки [8, 13]. Вченими доведено, що однією з умов проявлення біологічної дії органічних сполук на ЦНС є комбінація термінальних ліпофільних центрів (одного або кількох) та гідрофільних ділянок різної довжини, що містять у вигляді підструктурних фрагментів гідроксильні, карбоксильні, сульфамідні, аміногрупи та ін. Наявність ліпофільних центрів сприяє їх захопленню, транспорту за допомогою сироваткового альбуміну та іммобілізації на рецепторних ділянках або фосфоліпідному шарі мембран, а гідрофільні групи в основному визначають полярність та просторову конфігурацію молекули в цілому, впливають на розподіл електронної густини та здатність утворювати стійкі комплекси з іонами металів, а отже, і на напрямок та величину біологічної дії. Ліпофільність взаємопов'язана з біологічною доступністю, накопиченням та виведенням речовини з організму. Певна ліпофільність сприяє кращому всмоктуванню та розподілу лікарських речовин в організмі [8].

У 60-ті роки Хенч у своїх роботах довів, що залежність між коефіцієнтом розподілу та біологічною активністю може мати параболічний

© В.А. Георгіянци, Л.О. Перехода А.В. Глуценко, 2009.

характер, тобто підвищення ліпофільності сприяє проникненню молекули через мембрани клітин, зокрема гематоенцефалічний бар'єр, шляхом пасивної дифузії, але після досягнення оптимуму ліпофільності подальше її підвищення призводить до зниження активності [7]. Хенч та Реккер також встановили фрагментарні гідрофобні константи функціональних груп, за якими можна розрахувати коефіцієнт розподілу за структурною формулою речовин, використовуючи комп'ютерні програми, та довели, що співвідношення  $\log P \approx 2$  оптимальне для того, щоб лікарський засіб проходив ГЕБ [7]. Іншими словами, при заданій величині ліпофільності концентрація введеної речовини в ЦНС біооб'єкта є максимальною. Враховуючи також те, що протисудомні засоби пацієнт повинен приймати впродовж усього життя, доцільним є створення менш токсичних пероральних протисудомних засобів пролонгованої дії.

Вченими встановлено, що пероральна активність збільшується при врахуванні правил Ліпінського [11], які базуються на фізико-хімічних параметрах сполук. За цими правилами регламентуються:

- молекулярна маса (MW) – не більше 500;
- коефіцієнт розподілу в системі 1-октанол/вода ( $\log P$ ) – не більше 5;
- логарифм розчинності у воді (г/мл) при  $pH=7,4$  ( $\log Sw$ ) – не менше 5;
- кількість ароматичних кілець – не більше 4;
- кількість нетермінальних зв'язків (RotB), що обертаються, – не більше 10;
- кількість донорів водневого зв'язку (Hd) – не більше 5;
- кількість акцепторів водневого зв'язку (Ha) – не більше 10;

• частка речовини, що проникає із шлунково-кишкового тракту в кровотік за допомогою пасивної дифузії і без урахування метаболічної деградації (FA), – не менше 75 %.

Враховуючи все вищезазначене, на нашу думку, при пошуку нових лікарських засобів, що діють на ЦНС, необхідно враховувати показник ліпофільності, що повинен перебувати в межах  $5 \leq \log P \leq 2$ .

Метою даної роботи було виявлення можливих кореляцій між фізико-хімічними константами органічних молекул відомих протисудомних засобів, що належать до різних хімічних груп, та в ряді сполук певної спільної структури, що відрізняються тільки замісниками, – в ряді похідних барбітурової кислоти.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Для виявлення можливих кореляцій і розроблення стратегії подальшого цілеспрямованого пошуку нових протисудомних речовин нами проведено визначення коефіцієнта розподілу для вибірки з 14 протисудомних препаратів та 13 похідних барбітурової кислоти розрахунковим комп'ютерним методом за допомогою програми ACD/Labs. Для протисудомних засобів експериментально визначено методом ВЕРХ хроматографічний час утримання ( $T_r$ ), методом тонкошарової хроматографії – значення величини утримання ( $R_f$ ) в системах розчинників хлороформ–ацетон (4:1) та метанол–бутанол (3:2) (табл. 1). Для похідних барбітурової кислоти експериментально визначено хроматографічний час утримання ( $T_r$ ) та значення величини утримання ( $R_f$ ) в системі розчинників метанол–бутанол (3:2) (табл. 2). Визначення хроматографічного часу утримання проводили методом рідинної хроматографії на двока

Таблиця 1 – Фізико-хімічні параметри протисудомних лікарських засобів

Лікарський засіб	Log P	$R_f$ метанол– бутанол (3:2)	$R_f$ хлороформ– ацетон (4:1)	$T_r$
Клоназепам	2,41	0,45	0,72	4,6
Етосукцимід	0,4	0,53	0,70	2,3
Етотоїн	1,0	0,54	0,88	3,7
Мефенітоїн	1,7	0,58	0,86	3,7
Фенітоїн	2,5	0,55	0,87	3,7
Метилфенобарбітал	1,8	0,67	0,88	4,6
Гексамідин	0,9	0,23	0,80	2,1
Фенобарбітал	3	0,65	0,72	1,5
Метсукцимід	1,4	0,76	0,70	4,8
Фенацемід	0,9	0,75	0,40	4,7
Фенсукцимід	1,0	0,75	0,59	4,7
Кислота вальпроєва	2,8	0,52	0,72	4,6
Карбамазепін	2,45	0,62	0,70	4,7

Таблиця 2 – Фізико-хімічні параметри лікарських засобів похідних барбітурової кислоти

Лікарський засіб	Log P	R <sub>f</sub>	Tr
Барбітал	0,7	0,67	2,2
Амобарбітал	1,6	0,67	4,0
Апробарбітал	1,2	0,67	2,8
Бралобарбітал	1,4	0,68	3,0
Бутобарбітал	1,73	0,65	3,2
Буталбітал	1,9	0,67	3,4
Циклобарбітал	1,77	0,64	3,2
Гексобарбітал	2,0	0,65	4,3
Пентобарбітал	1,9	0,66	4,1
Метилфенобарбітал	1,8	0,67	4,6
Вінілбітал	1,9	0,64	4,1
Фенобарбітал	1,5	0,65	3,0
Секобарбітал	2,0	0,68	4,7

нальній градієнтній системі ProStar фірми "Varian" (США).

Близько 50 мг (точна наважка) субстанції поміщали у мірну колбу на 50 мл, розчиняли у 30 мл ацетонітрилу Р, доводили об'єм розчину тим самим розчинником до позначки і перемішували (розчин 1). 2,0 мл розчину 1 поміщали у мірну колбу на 10 мл, доводили об'єм розчину ацетонітрилом Р до позначки і перемішували (концентрація близько 0,2 мг/мл).

Розчин використовували свіжоприготовленим. По 20 мкл випробуваного розчину хроматографували на рідинному хроматографі з УФ-детектором, отримуючи не менше 5 хроматограм для кожного розчину за таких умов:

- колонка Microsorb 100 C<sub>18</sub>, 5 μm, розміром 250x4,6 мм;
- рухома фаза: ацетонітрил Р – вода Р (75:25), %;
- швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв;
- детектування за довжиною хвилі 270 нм;
- температура колонки – 30 °С.

Хроматографічну систему вважали придатною, якщо виконувалися такі умови:

- ефективність хроматографічної колонки, розрахована за основним піком на хроматограмі розчину порівняння, не менше 4000 теоретичних тарілок;
- відносне стандартне відхилення, розраховане за площею основного піку на хроматограмі розчину порівняння, не більше 2,0 %;
- коефіцієнт симетрії піку, розрахований за основним піком на хроматограмі розчину порівняння, не більше 1,5.

Значення R<sub>f</sub> визначали на пластинках "Silicagel" в різних системах розчинників (хлороформ–ацетон (4:1), метанол–бутанол (3:2)), проявляли в УФ-світлі при довжині хвилі

254 нм. Речовини наносили на пластинки для хроматографування у вигляді 0,1 % розчину в етанолі в кількості 2 мг/мл.

Залежність хроматографічного часу утримання та величини утримання в системах розчинників хлороформ–ацетон (4:1) і метанол–бутанол (3:2) від коефіцієнтів розподілу для протисудомних препаратів та барбітуратів було розраховано за допомогою програми STATISTIKA [1, 2].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** При статистичній обробці результатів медико-біологічних досліджень під час аналізу вибірки довжиною у 13-14 випадків статистично достовірними вважають показники коефіцієнта кореляції, більші 0,426 (p<0,05) [2]. На жаль, серед протисудомних препаратів не виявлено кореляції коефіцієнта розподілу з жодним показником. Такий результат, однак, є досить очікуваним з огляду на те, що в статистичну вибірку включено речовини з різних хімічних груп, які значно відрізняються між собою за фізико-хімічними властивостями.

Кореляційний аналіз залежності параметрів ліпофільності від часу утримання та величини утримання в ряді похідних барбітурової кислоти, навпаки, показав досить високий рівень кореляції. Аналіз даних статистичної обробки результатів свідчить про те, що хроматографічний час утримання (Tr) добре корелює з ліпофільністю (коефіцієнт кореляції становить 0,8199 при p=0,050) (рис. 1).

Кореляція ліпофільності з величиною утримання (R<sub>f</sub>) є значно меншою (коефіцієнт кореляції становить 0,4842 при p=0,050) (рис. 2). Усі співвідношення є статистично значущими [1].

Таким чином, в результаті проведеної роботи встановлено математичні залежності між

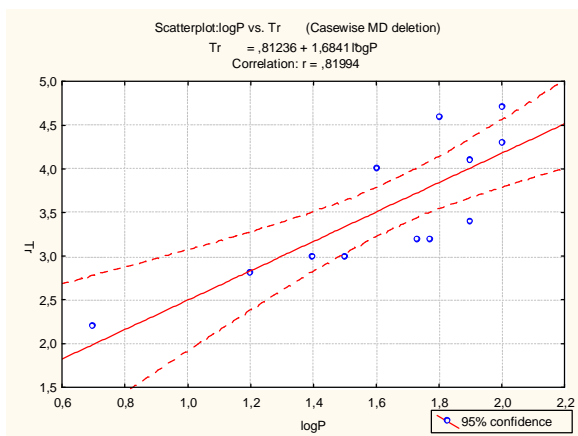


Рис. 1. Залежність коефіцієнта розподілу від часу утримання  $T_r$  в ряді похідних барбітурової кислоти.

параметрами ліпофільності та хроматографічним часом утримання в групі сполук певної спільної структури. Ці результати дозволять в майбутньому для ефективного молекулярного дизайну нових антиконвульсантів використовувати хроматографічний час утримання як молекулярний дескриптор, що корелює з показником ліпофільності.

**ВИСНОВКИ.** 1. Проведено визначення коефіцієнта розподілу для протисудомних препаратів та похідних барбітурової кислоти розрахунковим комп'ютерним методом за допомогою програми ACD/Labs.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Боровиков В.П. Популярное введение в программу STATISTICA. – М.: Комп'ютер-Пресс, 1998. – 267 с.
2. Боровиков В.П. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. – С.Пб.: Питер, 2001. – 656 с.
3. Лагунин А.А., Филимонов Д.А., Поройков В.В. Компьютерный прогноз биологической активности // Хим.-фарм. журн. – 2001. – **35**, № 7. – С. 28-34.
4. Поройков В.В., Филимонов Д.А. Компьютерный прогноз биологической активности химических соединений как основа для поиска и оптимизации базовых структур новых лекарств // Азотистые гетероциклы и алкалоиды. – М.: Иридиум-пресс, 2001. – **1**. – С. 123-129.
5. Bello-Ramirez A.M., Carren-Garabito B.Y., Nava-Ocampo A.A. Do structural properties explain the anticonvulsant activity of valproate metabolites? A QSAR analysis // Epilepsia. – 2002. – **43**, № 5. – P. 475-481.
6. Bikker J.A., Kubanek J., Weaver D.F. Quantum pharmacologic studies applicable to the design of anticonvulsants: theoretical conformational analysis and structure-activity studies of barbiturates // Epilepsia. – 1994. – **35**, № 2. – P. 411-425.

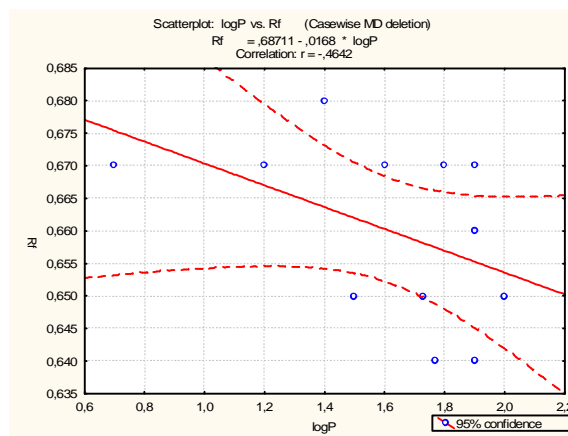


Рис. 2. Залежність коефіцієнта розподілу від величини утримання  $R_f$  в ряді похідних барбітурової кислоти.

2. Експериментально визначено для них методом ВЕРХ та тонкошарової хроматографії хроматографічний час утримання ( $T_r$ ) і значення  $R_f$ .

3. Проведено кореляційний аналіз для вибірки з 14 протисудомних препаратів та 13 похідних барбітурової кислоти з метою виявлення залежності ліпофільності від хроматографічного часу утримання і величини утримання.

4. Встановлено, що величина ліпофільності добре корелює з хроматографічним часом утримання та величиною утримання тільки в ряді сполук певної спільної структури – похідних барбітурової кислоти.

7. Debnath A.K. Quantitative structure-activity relationship (QSAR) paradigm-Hansch era to new millennium // Mini Rev. Med. Chem. – 2001. – **1**, № 2. – P. 187-195.
8. Eros D., Kelvesdi I., Orfi L. et al. Reliability of logP predictions based on calculated molecular descriptors: a critical review // Curr. Med. Chem. – 2002. – **9**, № 20. – P. 1819-1829.
9. Estrada E.E., Pena A.A. In silico studies for the rational discovery of anticonvulsant compounds // Bioorg. and Med. Chem. – 2000. – **8**, № 12. – P. 2755-2770.
10. Gupta S.P. QSAR studies on drugs acting at the central nervous system // Chem. Rev. – 1989. – **89**, № 6. – P. 1765-1800.
11. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings // J. Adv. Drug Delivery Rev. – 1997. – **23**, № 1. – P. 3-25.
12. Oprea T.I., Davis A.M., Teague S.J. Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective // J. Chem. Int. Comput. Sci. – 2001. – **41**, № 11. – P. 1308-1315.

13. Raevsky O.A. Molecular lipophilicity calculations of chemically heterogeneous chemicals and drugs on the basis of structural similarity and physicochemical parameters // SAR QSAR Environ. Res. – 2001. – **12**, № 4. – P. 367-381.

14. Rishon G.M. Nonleadlikeness and leadlikeness in biochemical screening // Drug Disc. Today. – 2003. – **8**, № 2. – P. 86-96.

15. Terrett N.K., Gardner M., Gordon D.W. et al. Combinatorial synthesis – the design of compound libraries and their application to drug discovery // Tetrahedron. – 1995. – **51**, № 30. – P. 8135-8173.

16. Thompson L.A., Ellman J.A. Synthesis and applications of small molecule libraries // Chem. Rev. – 1996. – **96**, № 1. – P. 555-600.

## ЗАВИСИМОСТЬ ПРОТИВОСУДОРОЖНОЙ АКТИВНОСТИ ОТ МОЛЕКУЛЯРНОГО СТРОЕНИЯ

**В.А. Георгиянц, Л.А. Перехода, А.В. Глущенко**  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

### Резюме

*Рассчитаны коэффициенты распределения для известных противосудорожных препаратов и производных барбитуровой кислоты, а также экспериментально определены для них хроматографическое время удерживания и значение величины удерживания. Установлено, что величина липофильности хорошо коррелирует с хроматографическим временем удерживания и величиной удерживания в ряду соединений общей структуры – производных барбитуровой кислоты.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** липофильность, хроматографическое время удерживания, корреляция, величина удерживания, противосудорожная активность, производные барбитуровой кислоты.

## ANTICONVULSIVE ACTIVITY AND ITS DEPENDENCE ON MOLECULAR STRUCTURE

**V.A. Georgiyants, L.O. Perekhoda, A.V. Hlushchenko**  
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

### Summary

*The logarithm of octanol-water partition coefficient (distribution coefficient) for the most popular anticonvulsant and for derivatives of barbituric acid have been calculated. The size of retainment and chromatographic time of retainment for this substances have been carried out. There are correlations between distribution coefficient, size of retainment and chromatographic time of retainment for compounds of the similar structure – derivatives of barbituric acid.*

**KEY WORDS:** lipophilicity, chromatographic time of retainment, correlation, size of retainment, anticonvulsive activity, derivatives of barbituric acid.

Отримано 18.12.2008 р.

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



## ВПЛИВ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ТА ВИСОКОЖИРОВОЇ ДІЄТИ НА ЕЛІМІНАЦІЮ МОДЕЛЬНИХ КСЕНОБІОТИКІВ У ЩУРІВ

О.Х. Герич

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ М.І. ПИРОГОВА

*Високожирова дієта і цукровий діабет посилюють реакції біотрансформації толуолу, бромбензолу, амідопірину та ацетаніліду, каталізовані цитохромами P4502E1, 3A та УДФ-глюкуронозилтрансферазою, але пригнічують процеси кон'югації ксенобіотиків із сульфатом та залежні від цитохрому P4502C реакції утворення крезольних метаболітів толуолу. Ацетилювання 4-аміноантипірину сповільнюється під впливом цукрового діабету, але прискорюється при перевантаженні жирами.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** цукровий діабет, високожирова дієта, метаболізм ксенобіотиків, амідопірин, бромбензол, толуол, ацетанілід.

**ВСТУП.** Розвиток ускладнень з боку життєво важливих органів, які супроводжують цукровий діабет, ожиріння, метаболічний синдром, потребує призначення численних лікарських засобів. Ці патологічні стани викликають суттєві зміни активності ферментних систем метаболізму ксенобіотиків [1, 2, 6]. Однак питання, як впливають дані патологічні стани на процеси елімінації лікарських засобів та промислових ксенобіотиків, залишаються відкритими. Ми оцінили вплив цукрового діабету та високожирової дієти на процеси елімінації толуолу, бромбензолу, амідопірину та ацетаніліду, метаболізм яких охоплює основні окиснювальні та кон'югаційні перетворення цих речовин. Метаболіти даних тест-препаратів практично повністю елімінуються із сечею, що дозволяє адекватно оцінити їх біотрансформацію в цілісному організмі.

Метою роботи було оцінити вплив цукрового діабету і високожирової дієти на процеси біотрансформації толуолу, бромбензолу, амідопірину та ацетаніліду в щурів.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди проведені на 65 білих щурах-самцях масою 145-210 г. Під час експериментів тварини отримували напівсинтетичний раціон, який містив усі необхідні макро- і мікронутрієнти [1]. Раціон контрольних тварин складався (з розрахунку на 1 кг) з 200 г казеїну, 650 г кукурудзяного крохмалю та 100 г жирів (50 г свинячого сала та 50 г соняшникової олії), 10 г суміші вітамінів, приготовленої на крохмалі, 30 г суміші солей і 10 г целюлози.

© О.Х. Герич, 2009.

Енергетична цінність 1 кг раціону становила 4740 ккал (вклад білків, вуглеводів та жирів, відповідно, 24, 56 та 20 %). Високожирову дієту створювали за рахунок збільшення частки жирів до 50 % загального калоражу при зменшенні частки вуглеводів до 26 %. Тварини отримували таку дієту протягом чотирьох тижнів. Цукровий діабет з вираженим кетоацидозом та без нього викликали шляхом внутрішньоочеревинного введення, відповідно, 70 та 45 мг/кг стрептозотоцину [8]. Для дослідження брали тих щурів, у яких рівень глюкози в крові на другому тижні досліду перевищував 12 ммоль/л.

Тваринам після водного навантаження (2 мл води на 100 г маси) вводили тест-препарати, і збирали сечу протягом 12-18 год. Амідопірин вводили внутрішньоочеревинно в дозі 12,8 мкмоль/100 г маси щура, вміст його метаболітів визначали, як описано в одній з робіт [5]. Ацетанілід вводили внутрішньоочеревинно в дозі 74 мкмоль/100 г маси, толуол та бромбензол – перорально, відповідно, в дозах 109 та 127 мкмоль/100 г маси. Вміст метаболітів у сечі визначали методами, описаними в попередніх роботах [1, 4].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Встановлено, що цукровий діабет викликав у щурів, залежно від тяжкості, посилення процесів біотрансформації бромбензолу та толуолу (табл. 1). Якщо у тварин з легкою формою цукрового діабету (45 мг/кг стрептозотоцину) екскреція із сечею всіх метаболітів бромбензолу та толуолу зростала, відповідно, на 23 та 47 %, то у щурів з тяжкою формою (70 мг/кг стрептозотоцину) – на 51 та 86,1 %. Екскреція меркап-

Таблиця 1 – Вплив цукрового діабету на екскрецію із сечею щурів метаболітів тест-препаратів (M±m)

Екскреція метаболітів із сечею, мкмоль/100 г маси	Контроль, n=10	Стрептозотонин	
		45 мг/кг, n=11	70 мг/кг, n=11
Бромбензол ввели щурам в дозі 127 мкмоль/100 г маси			
Всі метаболіти бромбензолу	62,1±3,77	76,4±2,69*	93,6±3,31*
Меркаптурати	38,1±2,05	50,0±2,54*	63,5±2,96*
Загальні бромфеноли	18,4±1,98	19,5±1,19	20,7±1,05
Вільні бромфеноли	4,35±0,39	3,68±0,30	3,63±0,27
Кон'юговані бромфеноли	14,0±1,77	15,8±0,98	17,1±0,92
Загальні катехоли	5,60±0,33	6,90±0,43*	9,38±0,40*
Толуол ввели щурам в дозі 109 мкмоль/100 г маси			
Всі метаболіти толуолу	51,8±3,17	76,2±3,38*	96,4±4,18*
Гіпурова кислота	51,1±3,14	75,7±3,39*	95,9±4,16*
Крезолі	0,66±0,04	0,55±0,03	0,53±0,03*
Амідопірин ввели в дозі 12,8 мкмоль/100 г маси			
Ацетильований 4-аміноантипірин	3,50±0,29	3,53±0,12	3,54±0,28
Загальний 4-аміноантипірин	4,55±0,32	5,38±0,16*	5,82±0,31*
Ацетильований 4-аміноантипірин, % до загального	76,1±1,59	65,8±1,59*	60,2±2,23*
Ацетанлід ввели в дозі 74 мкмоль/100 маси			
Всі метаболіти ацетанліду	57,2±1,38	60,0±2,02	61,5±2,23
Всі амінофенольні метаболіти	40,6±1,41	36,4±1,18*	35,4±1,47*
Сума ацетанліду та аніліну	16,5±0,60	23,6±1,30*	26,1±1,06*
Глюкуроніди амінофенолів	21,9±0,92	24,7±0,95*	25,2±1,01*
Сульфати амінофенолів	15,4±1,13	10,1±0,55*	9,22±0,58*
Меркаптурові кислоти	1,42±0,21	5,82±0,49*	8,50±0,84*

Примітка. Тут і в наступній таблиці: \* – вірогідні відмінності щодо групи "контроль".

турових кислот (кінцеві метаболіти бромбензолу) за цих умов збільшувалась, відповідно, на 31 та 67 %, загальних катехолів – на 23 та 68 %. Екскреція вільних та кон'югованих бромфенолів у тварин із цукровим діабетом вірогідно не змінювалась. Екскреція гіпурової кислоти (кінцевий метаболіт толуолу) в щурів з легкою формою цукрового діабету зростала на 48 %, а у тварин з тяжкою формою – на 88 %. За цих умов екскреція крезольних метаболітів толуолу знижувалась на 17 та 20 % відповідно.

У тварин з легкою і тяжкою формами цукрового діабету зростала екскреція загального 4-аміноантипірину (на 18 та 28 %) за відсутності вірогідних змін екскреції ацетильованого 4-аміноантипірину. При цьому частка ацетильованого 4-аміноантипірину вірогідно зменшувалась (на 14 та 21 % відповідно).

Цукровий діабет не викликав значимих змін в екскреції сумарної кількості метаболітів ацетанліду, проте спричинив перерозподіл спектра його метаболітів. Зокрема, у тварин з легкою формою цукрового діабету екскреція амінофенольних (гідроксильованих) мета-

болітів знижувалась на 10 % при одночасному зростанні на 43 % елімінації анілідних (негідроксильованих) метаболітів. У щурів з тяжкою формою цукрового діабету екскреція амінофенольних метаболітів зменшувалась на 13 %, а виведення анілідних метаболітів збільшилось на 58 %. Цукровий діабет посилював процеси глюкуронідації метаболітів ацетанліду при пригніченні утворення його сульфатних метаболітів. Зокрема, у щурів з легкою і тяжкою формами цукрового діабету екскреція глюкуронідів зростала, відповідно, на 13 та 15 %, а елімінація сульфатів знижувалась на 34 та 40 %. Звертало на себе увагу значне посилення утворення реакційноздатних метаболітів ацетанліду, які еліминувались у вигляді меркаптурових кислот. У щурів з легкою формою цукрового діабету елімінація меркаптуратів зростала в 4,1 раза, а у тварин з тяжкою формою – в 6,0 разів.

Високожирова дієта викликала подібні за спрямованістю зміни в елімінації тест-препаратів (табл. 2), яких було тим більше, чим триваліше навантаження жирами. У щурів, які

перебували на високожировому раціоні протягом двох та чотирьох тижнів, екскреція всіх метаболітів бромбензолу зростала на 25 та 41 % відповідно, а меркаптурових кислот – на 26 та 44 %. Виведення загальних бромфенолів у цих тварин збільшувалось на 22 та 35 %, кон'югованих бромфенолів – на 29 та 48 %, катехолів – на 25 та 41 % відповідно.

У щурів, які отримували протягом двох та чотирьох тижнів високожирову дієту, екскреція всіх метаболітів толуолу підвищувалась на 24 та 32 %, гіпурової кислоти – на 25 та 32 % відповідно. Елімінація крезольних метаболітів мало змінювалась при двотижневому пере-

вантаженні жирами, але вірогідно знижувалась (на 26 %) при чотиритижневому.

У щурів, які отримували високожировий раціон протягом двох та чотирьох тижнів, елімінація ацетильованого 4-аміноантипірину зростала на 20 та 37 %, загального 4-аміноантипірину – на 13 та 25 % відповідно. В обидва строки реєструвалося вірогідне збільшення частки ацетильованого 4-аміноантипірину.

У тварин, які отримували високожирову дієту протягом двох тижнів, зареєстровано тенденцію до зростання елімінації всіх метаболітів і амінофенольних метаболітів ацетаніліду та вірогідне посилення утворення глюкуронідних

Таблиця 2 – Вплив високожирової дієти на екскрецію із сечею щурів метаболітів тест-препаратів ( $M \pm m$ )

Екскреція метаболітів з сечею, мкмоль/100 г маси	Контроль, n=11	Високожирова дієта	
		Через 2 тижні, n=11	Через 4 тижні, n=11
Бромбензол ввели щурам в дозі 127 мкмоль/100 г маси			
Всі метаболіти бромбензолу	52,4±3,81	65,4±3,80*	74,0±2,61*
Меркаптурати	30,2±2,50	38,2±2,23*	43,6±2,19*
Загальні бромфеноли	16,5±1,27	20,1±1,39	22,3±0,66*
Вільні бромфеноли	3,82±0,31	3,77±0,30	3,45±0,25
Кон'юговані бромфеноли	12,7±1,08	16,4±1,22*	18,8±0,72*
Загальні катехоли	5,72±0,36	7,15±0,49*	8,05±0,37*
Толуол ввели щурам в дозі 109 мкмоль/100 г маси			
Всі метаболіти толуолу	54,8±2,60	68,1±4,67*	72,1±1,81*
Гіпурова кислота	54,2±2,57	67,5±4,64*	71,6±1,81*
Крезולי	0,69±0,04	0,62±0,03	0,51±0,03*
Амідопірін ввели в дозі 12,8 мкмоль/100 г маси			
Ацетильований 4-аміноантипірін	3,64±0,18	4,37±0,19*	5,00±0,14*
Загальний 4-аміноантипірін	4,71±0,16	5,30±0,18*	5,87±0,14*
Ацетильований 4-аміноантипірін, % до загального	77,0±1,35	82,0±0,99*	85,2±0,66*
Ацетанілід ввели в дозі 74 мкмоль/100 маси			
Всі метаболіти ацетаніліду	57,2±1,38	59,0±1,24	61,3±1,17*
Всі амінофенольні метаболіти	40,6±1,41	43,4±1,20	46,5±1,53*
Сума ацетаніліду та аніліну	16,5±0,60	15,5±0,95	14,9±0,82
Глюкуроніди амінофенолів	21,9±0,92	25,7±0,51*	29,6±0,77*
Сульфати амінофенолів	15,4±1,13	13,1±0,53	11,9±0,56*
Меркаптурові кислоти	1,42±0,21	3,35±0,22*	4,68±0,25*

і меркаптуратних метаболітів на 17 та 136 % відповідно. Масштабніші зміни реєстрували при чотиритижневому згодовуванні високожирової дієти. Вірогідно зростала екскреція амінофенольних метаболітів ацетаніліду, збільшувалось виведення глюкуронідних метаболітів – на 35 %, меркаптуратів – на 230 %. При цьому на 23 % пригнічувалось утворення сульфатних метаболітів ацетаніліду.

Отримані нами дані свідчать про те, що цукровий діабет та перевантаження раціону жирами викликають суттєві зміни в екскреції із сечею метаболітів толуолу, бромбензолу, ацетаніліду, амідопірину. Характер даних змін вказує на те, що цукровий діабет та перевантаження жирами супроводжуються суттєвим посиленням реакцій, каталізованих цитохромом P4502E1. Про це свідчить зростання екскреції

із сечею меркаптурових кислот, які є кінцевими продуктами перетворення реакційноздатних інтермедіатів бромбензолу та ацетаніліду, й екскреції гіпурової кислоти – кінцевого метаболіту біотрансформації толуолу. Відомо, що окиснення бромбензолу з участю цитохрому P4502E1 призводить до утворення його епоксидів – 2,3- та 3,4-оксидів [3], які через низку реакцій трансформуються до бромфенолів, катехолів та меркаптурових кислот. В обміні ацетаніліду також бере участь цитохром P4502E1, який каталізує перетворення парацетамолу (головного метаболіту ацетаніліду) в реакційноздатний інтермедіат N-ацетил-п-бензохінонімін. Останній після кон'югації з глутатионом трансформується в меркаптурові кислоти [7]. Реакція метилгідроксилювання толуолу також каталізується цитохромом P4502E1 [9] і є першою в низці ферментативних перетворень толуолу в гіпурову кислоту.

Вплив цукрового діабету та високожирової дієти не обмежується лише активацією залежних від цитохрому P4502E1 шляхів біотрансформації ксенобіотиків, але і призводить до посилення реакції деметилювання амідопіріну, яка каталізується цитохромом P4503A [10] та зумовлює утворення 4-аміноантипірину. Однак цукровий діабет та перевантаження жирами гальмують реакції метаболізму, залежні від цитохрому P4502C. Про це свідчить зниження екскреції крезольних метаболітів толуолу, утворення яких каталізується цитохромом P4502C [9].

Отримані нами дані щодо індукованих цукровим діабетом та високожировою дієтою змін реакцій метаболізму ксенобіотиків на рівні цілісного організму цілком кореспондуються з виявленим нами раніше зростанням в мікросомальній фракції печінки пара-нітрофенолу та анілінгідроксилазних активностей цитохрому P4502E1, амідопірин-N- та еритроміцин-N-деметилазних активностей цитохрому P4503A і зниженням індометацин-О-деметилазної активності цитохрому P4502C [1, 6]. Не викликає сумнівів, що індуковане цукровим діабетом та високожировою дієтою підвищення активності цитохрому P4502E1 буде супроводжуватись посиленням токсичності тих ксенобіотиків, які в процесі біотрансформації з участю цитохрому P450 утворюють реакційноздатні інтермедіати (парацетамол, фторотан, бензол, бромбензол, толуол, нітрозалкіламіни).

Зростання активності цитохрому P4503A може призвести до зниження фармакологічної активності лікарських засобів, які інактивуються з його участю (макроліди, статини, бензодіазепіни, блокатори кальцієвих каналів).

Натомість пригнічення цитохрому P4502C може стати причиною посилення токсичності нестероїдних протизапальних препаратів, які під впливом саме цього ферменту перетворюються в біологічно неактивні метаболіти.

Вказані патологічні стани викликають зміни процесів кон'югації ксенобіотиків. Посилюється елімінація глюкуронідних метаболітів ацетаніліду при одночасному зменшенні екскреції сульфатних метаболітів. Це збігається зі встановленим нами раніше підвищенням активності УДФ-глюкуронозилтрансферази і зниженням активності фенолсульфотрансферази в печінці щурів із цукровим діабетом та перевантаженнями жирами [1, 2]. Тому слід очікувати послаблення дії тих речовин, елімінація яких переважно визначається процесами глюкуронідації, та посилення дії речовин, метаболізм яких залежить від процесів сульфатації.

Вплив цукрового діабету та високожирової дієти на процеси ацетилювання ксенобіотиків є різноспрямованим. При цукровому діабеті елімінація ацетилюваних метаболітів амідопіріну пригнічується, а при перевантаженні жирами, навпаки, посилюється. Це відповідає змінам активності N-ацетилтрансферази, яка в печінці тварин із цукровим діабетом знижується, а в щурів, які перебували на високожировій дієті, навпаки, зростає [1, 2]. Цілком очевидно, що цукровий діабет буде супроводжуватись посиленням, а перевантаження жирами – послабленням токсичності тих лікарських засобів, для яких ацетилювання є головним шляхом їх інактивації (сульфаніламідні препарати, ізоніазид та ін.).

**ВИСНОВКИ.** 1. Цукровий діабет та перевантаження жирами викликають зміни окиснювальних і кон'югаційних реакцій метаболізму ксенобіотиків, ступінь яких визначається тяжкістю цукрового діабету та тривалістю навантаження жирами.

2. При цукровому діабеті та перевантаженні жирами відбуваються посилення залежних від цитохрому P4502E1 реакцій метаболізму бромбензолу та ацетаніліду (утворення меркаптурових кислот), толуолу (утворення гіпурової кислоти), активація каталізованої цитохромом P4503A реакції деметилювання амідопіріну при пригніченні залежної від цитохрому P4502C реакції утворення крезольних метаболітів толуолу.

3. Цукровий діабет та високожировою дієтою посилюють глюкуронідацію ксенобіотиків, але послаблюють процес їх сульфатації. При цукровому діабеті елімінація ксенобіотиків шляхом ацетилювання сповільнюється, а при перевантаженні жирами зростає.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Герич О.Х., Пентюк О.О. Вплив перевантаження раціону жирами на ензиматичні системи метаболізму у щурів // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 1. – С. 73-82.
2. Герич О.Х., Пентюк О.О. Вплив цукрового діабету на активність ферментів кон'югаційної фази метаболізму ксенобіотиків у щурів // Мед. хімія. – 2008. – **10**, № 2. – С. 23-26.
3. Качула С.А., Пентюк А.А., Тертышная Е.В., Вовк О.Г. Изучение взаимосвязи гепатотоксического действия бромбензола и маркерных активностей цитохрома P450 и ферментов конъюгации // Современные проблемы токсикологии. – 2002. – № 2. – С. 40-44.
4. Качула С.О., Пентюк О.О. Вплив голодування на ферментні системи метаболізму ксенобіотиків у щурів, біотрансформацію та токсичність ксенобіотиків субстратів СУР2Е1 // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 1. – С. 114-122.
5. Попов Т.А., Леоненко О.Б. Метод оценки активности оксидаз печени // Гигиена и санитария. – 1977. – № 9. – С. 23-26.
6. Юрченко П.О., Герич О.Х. Монооксигеназні активності печінки щурів в умовах гіперглікемії та гіперкетонемії, індукованих уведенням стрептозо-тоцину та дексаметазону // Буков. мед. вісн. – 2005. – **9**, № 2. – С. 55-56.
7. Bessems J.G., Vermeulen N.P. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches // Crit. Rev. Toxicol. – 2001. – **31**, № 1. – P. 55-138.
8. Hicks K.K., Seifen E., Stimers J.R., Kennedy R.H. Diabetes with and without ketoacidosis on right atrial pacemaker rate and autonomic responsiveness // Am. J. Physiol. – 1997. – **273**, № 4 (Pt 2). – P. 1888-1893.
9. Nakajima T. Cytochrome P450 Isoforms and the Metabolism of Volatile Hydrocarbons of Low Relative Molecular Mass // J. Occup. Health. – 1997. – **39**, № 2. – P. 83-91.
10. Ramana K.V., Kohli K.K. Purification and characterization of the hepatic CYP2C and 3A isozymes from phenobarbitone pretreated rhesus monkey // Mol. Cell. Biochem. – 1999. – **198**, № 1-2. – P. 79-88.

## ВЛИЯНИЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА И ВЫСОКОЖИРОВОЙ ДИЕТЫ НА ЭЛИМИНАЦИЮ МОДЕЛЬНЫХ КСЕНОБИОТИКОВ У КРЫС

Е.Ф. Герич

ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА

### Резюме

Высокожировая диета и сахарный диабет усиливают реакции биотрансформации толуола, бромбензола, амидопирин и ацетанилида, катализируемые цитохромами P450E1, 3A, УДФ-глюкуронозилтрансферазой, но угнетают процессы конъюгации ксенобиотиков с сульфатом и зависимые от цитохрома P450C реакции образования крезольных метаболитов толуола. Ацетилирование 4-аминоантипирин замедляется при сахарном диабете, но ускоряется при жировой нагрузке.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сахарный диабет, высокожировая диета, метаболизм ксенобиотиков, амидопирин, бромбензол, толуол, ацетанилид.

## INFLUENCE OF DIABETES MELLITUS AND HIGH-FATTY DIET ON ELIMINATION OF MODEL XENOBIOTICS AT RATS

O.Kh. Herych

VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY M.I. PYROHOV

### Summary

High-fatty diet and diabetes mellitus enhance the reactions of biotransformation of toluene, bromobenzene, amidopyrine and acetanilide, which are catalyzed by cytochromes P450E1, 3A and UDP-glucuronosyl transferase, but inhibit the processes of xenobiotics conjugation with sulphate and the reactions of formation cresol metabolites of toluene which are dependent on cytochrome P450C. Acetylation of 4-aminoantipyrine is reduced at diabetes mellitus, but it is increased at fatty overload.

KEY WORDS: diabetes mellitus, high-fatty diet, metabolism of xenobiotics, amidopyrine, bromobenzene, toluene, acetanilide.

Отримано 17.02.2009 р.

Адреса для листування: О.Х. Герич, вул. Зарічанська, 22/3, кв. 112, Хмельницький, 29017, Україна.

## АНАЛЬГЕТИЧНА АКТИВНІСТЬ КОМБІНАЦІЙ ГЛЮКОЗАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ З ПАРАЦЕТАМОЛОМ

**В.О. Туляков**

ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ ХРЕБТА ТА СУГЛОБІВ ІМЕНІ ПРОФ. М.І. СИТЕНКА АМН УКРАЇНИ, ХАРКІВ

*У статті наведена інформація про результати порівняльного дослідження анальгетичної активності глюкозаміну гідрохлориду, парацетамолу та їх комбінацій у співвідношеннях від 1:1 до 8:1.*

*Комбінації глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом в експерименті на моделях оцтовокислих корчів та контакт-теплового подразнення продемонстрували анальгетичну активність, яка підвищувалася зі збільшенням частки парацетамолу в комбінації. У досліджених умовах спостерігався ефект потенціювання глюкозаміном анальгетичної активності парацетамолу приблизно в 1,2 рази відносно очікуваної величини. Найбільшу активність, як і терапевтичний індекс з анальгетичної дії, продемонстрували комбінації зі співвідношенням глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом в інтервалі 2:1-4:1. Вихід за межі вказаного інтервалу призвів до істотного зниження оцінюваного ефекту.*

*В анальгетичній активності глюкозаміну гідрохлориду переважали периферичні механізми, тоді як анальгетична активність парацетамолу більшим чином пов'язана з його центральною дією на опіодні рецептори. Складання комбінацій глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом не змінює співвідношення центрального і периферичного механізмів анальгетичної дії.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** глюкозамін, парацетамол, анальгетична активність.

ВСТУП. На цей час значна частина населення розвинених країн має ознаки остеоартрозу. Оскільки не відома причина розвитку остеоартрозу, його лікування направлене на зниження болю, збільшення рухливості, що сприяє підвищенню якості життя пацієнтів [6]. Недавні рекомендації Американської колегії ревматологів (ACR) і EULAR класифікують всі лікарські засоби для лікування остеоартрозів або як такі, що впливають на симптоми хвороби, або як структурномодифікуючі препарати, які здатні змінювати перебіг хвороби [9]. Основу першої групи препаратів складають нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП). Більшість НПЗП, разом із протизапальною дією, мають значний анальгетичний ефект [4]. Поряд із тим, відмічено, що багато НПЗП при тривалому застосуванні можуть викликати негативну дію на хрящ суглобів, а також на інші системи організму. З цієї та інших причин все частіше препаратом першого призначення при остеоартрозах стає парацетамол [11].

З ряду структурномодифікуючих засобів найбільш широко використовують глюкозамін [10], який, зокрема, має властивості знижувати активність матриксних металопротеаз та інших ферментів дегградації хрящової тканини [7]. У зв'язку з цим, з метою розробки но-

вих ефективних комбінованих протиаартрозних препаратів з поєднанням хондропротекторного, анальгетичного та протизапального ефектів було визнано доцільним вивчити анальгетичну дію композицій глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Експеримент виконано на 114 білих щурах-самцях лінії Вістар 3-місячного віку масою 180-200 г. Моделювання оцтовокислих корчів проводили шляхом внутрішньочеревного введення білим щурам оцтової кислоти в дозі 300 мг/кг, яке викликало у піддослідних тварин мимовільні скорочення черевних м'язів, що супроводжуються витягуванням задніх кінцівок і прогинанням спини (так звані корчі) [1]. Комбінації, які вивчали, вводили внутрішньошлунково за 1 год до введення оцтової кислоти. В кожній групі тварин було по 6 щурів. Кількість корчів оцінювали протягом 20 хв. За різницею їх кількості в дослідних і контрольній групах розраховували анальгетичну активність.

Як другу модель для вивчення анальгетичної активності нами було вибрано контакт-теплове подразнення у білих щурів [1]. У тварин реєстрували час відсмикування хвоста з ємності з водою з температурою 60 °С до і через 1 год після внутрішньошлункового введення досліджуваних субстанцій і комбінацій.

© В.О. Туляков, 2009.

В кожній групі було по 6 щурів із паралельним досліджуванням контрольної групи. Поріг больової чутливості визначали за різницею часу рефрактерності до і після введення з'єднань, які вивчали.

Для з'ясування ступеня впливу досліджуваних субстанцій і комбінацій на сприйнятливність опіоїдних рецепторів до больових відчуттів було проведено дослідження дії субстанцій і комбінацій на поріг больової чутливості під впливом контактнo-теплого подразнення з антагоністом опіоїдних рецепторів налоксоном, який вводили в дозі 0,1 мг/кг внутрішньочеревно, паралельно з речовинами, які вивчали після реєстрації первинних результатів і за 1 год до початку дослідження, в дозах, вказаних раніше [2, 8]. Кожна субстанція або комбінація також була досліджена на 6 тваринах.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Результати дослідження анальгетичної активності комбінації глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом на моделі оцтовокислих корчів у білих щурів показали, що всі комбінації мали виражений анальгетичний ефект (табл. 1). При цьому характерно, що ефект комбінацій був

більшим суми ефектів складових частин у перерахунку на відповідні компоненти в середньому в 1,2 раза, тобто спостерігався ефект потенціювання глюкозаміну гідрохлоридом анальгетичної активності парацетамолу. Той факт, що глюкозаміну гідрохлорид має потенціюючий ефект на антиексудативну дію НПЗП при одночасному прийманні, зафіксований в дослідженнях І.А. Зупанця та ін. [3]. Дана обставина дозволяє використовувати менші дози препаратів для досягнення бажаного анальгетичного ефекту, що особливо важливо для тривалого застосування препаратів, яким притаманна індукція побічних ефектів (нефро-, гепатотоксичного та ін.), у значних дозах. Зокрема, це стосується парацетамолу, який при передозуванні може негативно впливати на функцію печінки і нирок.

Одним з механізмів анальгетичної активності глюкозаміну гідрохлориду, а також комбінацій на його основі, може бути блокада іонів кальцію. Доказом цього є препарат гепарин, що зв'язує іони кальцію та містить у своїй структурі глюкозамін [5].

На моделі оцтовокислих корчів у білих щурів  $DE_{50}$  глюкозаміну гідрохлориду з анальгетичної активності склала 112,4 мг/кг, що

Таблиця 1 – Анальгетична активність і широта терапевтичної дії композицій глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом на моделі оцтових корчів (n=6)

Умови досліджу	$DE_{50}$ з анальгетичної активності, мг/кг	$DL_{50}$ , мг/кг	Терапевтичний індекс $DL_{50}/DE_{50}$	Відносний терапевтичний індекс по парацетамолу
Глюкозаміну гідрохлорид, 50 мг/кг	112,4	>10000	>8,9	>0,11
Парацетамол, 50 мг/кг	20,1	5220	80,3	1,00
Глюкозаміну гідрохлорид: парацетамол 1:1, 50 мг/кг	28,4	>10000	>352,1	4,38
Глюкозаміну гідрохлорид: парацетамол 2:1, 50 мг/кг	31,3	>10000	>319,5	3,38
Глюкозаміну гідрохлорид: парацетамол 4:1, 50 мг/кг	36,0	>10000	>277,8	3,46
Глюкозаміну гідрохлорид: парацетамол 8:1, 50 мг/кг	48,4	>10000	>206,7	2,57

свідчить про недостатню анальгетичну активність даного з'єднання. Це підтверджується і порівняно невисоким терапевтичним індексом глюкозаміну гідрохлориду з анальгетичної активності, який приблизно може бути оцінений як такий, що перевищує 8,9. Відносний терапевтичний індекс глюкозаміну по парацетамолу склав 0,11.

Анальгетична активність парацетамолу значно перевищувала таку глюкозаміну гідрохлориду.  $DE_{50}$  парацетамолу склала

20,1 мг/кг при терапевтичному індексі 80,3. Дані результати свідчать про бажаність розширення терапевтичної дії парацетамолу з анальгетичної активності й доцільність проведення при створюванні протиартрозного препарату з його участю заходів щодо підвищення терапевтичного індексу. Зокрема, цього можна досягти засобами комбінування парацетамолу із з'єднаннями, здатними потенціювати анальгетичну активність з відповідним зниженням необхідної дози і токсичності.

Оскільки  $DL_{50}$  всіх вивчених подвійних систем на основі глюкозаміну гідрохлориду і парацетамолу, як було зазначено раніше, визначити не вдалося і вони приблизно були оцінені як такі, що перевищують 10 000 мг/кг, терапевтичні індекси вказаних комбінацій з анальгетичної активності залежали, головним чином, від величини їх  $DE_{50}$ .  $DE_{50}$  подвійних систем глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом знижувалася пропорційно збільшенню частки глюкозаміну гідрохлориду і зменшенню частки парацетамолу. При цьому, хоча  $DE_{50}$  кожної системи перевищувала таку в парацетамолу за рахунок великих  $DE_{50}$ , терапевтичний індекс вказаних комбінацій перевершував такий в парацетамолу в 3,5-4 рази. Таким чином, з огляду на забезпечення анальгетичної активності при дослідженні на моделі оцтовокислих корчів найбільш перспективними можуть бути визнані комбінації глюкозаміну з парацетамолом у співвідношеннях 1:1 і 2:1.

Результати дослідження впливу комбінацій глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом на поріг больової чутливості при контактнотепловому подразненні, зокрема при дії налоксону, наведені у таблиці 2, а також на рисунку 1. У контрольній групі тварин відзначена відсутність змін первинної тривалості резистентності дослідних щурів, зокрема після введення налоксону. Анальгетична активність глюкозаміну гідрохлориду в дозі 50 мг/кг була помірною за вираженням, але практично повністю не залежала від дії налоксону, що свідчить про пере-

важання периферичних механізмів анальгетичної активності глюкозаміну гідрохлориду.

Значна частка анальгетичної активності парацетамолу пов'язана з його центральною дією на опіодні рецептори, що підтверджується зниженням на 44 % його анальгетичної активності за присутності налоксону.

Частка анальгетичного ефекту подвійних комбінацій, яка залишалася за умов застосування налоксону, в цілому відповідала розрахунковій, якщо брати до уваги частки компонентів і їх початкові ефекти при введенні налоксону. Це вказує на те, що складання комбінацій глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом не змінювало співвідношення центрального і периферичного механізмів анальгетичної дії. Враховуючи високу анальгетичну активність комбінацій глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом на даній моделі, можна припустити, що вони, найімовірніше, є анальгетиками змішаної (центрально-периферичної) дії, механізм якої, мабуть, пов'язаний зі зменшенням виділення простагландинів, активності калікреїн-кінінової системи, а також гальмуванням больового центру в головному мозку.

**ВИСНОВКИ.** 1. Комбінації глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом в експерименті на моделях оцтовокислих корчів та контактнотеплового подразнення продемонстрували анальгетичну активність.

2. У досліджених умовах спостерігався ефект потенціювання глюкозаміном аналь-

Таблиця 2 – Анальгетична активність композицій глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом на моделі контактнотеплового подразнення у білих щурів (n=6)

Умови досліджу	Анальгетичний ефект, %	Анальгетичний ефект з налоксоном, %	Частка анальгетичного ефекту з налоксоном від загального ефекту, %	Частка налоксонезалежного анальгетичного ефекту, %	$DE_{50}$ з анальгетичної активності, мг/кг	$DL_{50}$ , мг/кг	Терапевтичний індекс $DL_{50}/DE_{50}$	Відносний терапевтичний індекс по парацетамолу
Глюкозаміну гідрохлорид, 50 мг/кг	21,0	19,0	9,5	90,5	119,0	>10000	84,0	0,44
Парацетамол, 50 мг/кг	49,6	40,9	44,4	55,6	27,2	586	191,2	1,00
Глюкозаміну гідрохлорид: парацетамол 1:1, 50 мг/кг	42,9	31,0	72,5	27,5	23,2	>10000	>431,0	>2,85
Глюкозаміну гідрохлорид: парацетамол 2:1, 50 мг/кг	33,3	23,8	71,5	28,5	34,5	>10000	>289,9	>1,52
Глюкозаміну гідрохлорид: парацетамол 4:1, 50 мг/кг	25,6	20,9	21,6	18,4	49,9	>10000	>200,4	>1,05
Глюкозаміну гідрохлорид: парацетамол 8:1, 50 мг/кг	22,8	18,2	79,8	20,2	>10000	>184,2	>0,96	>10000



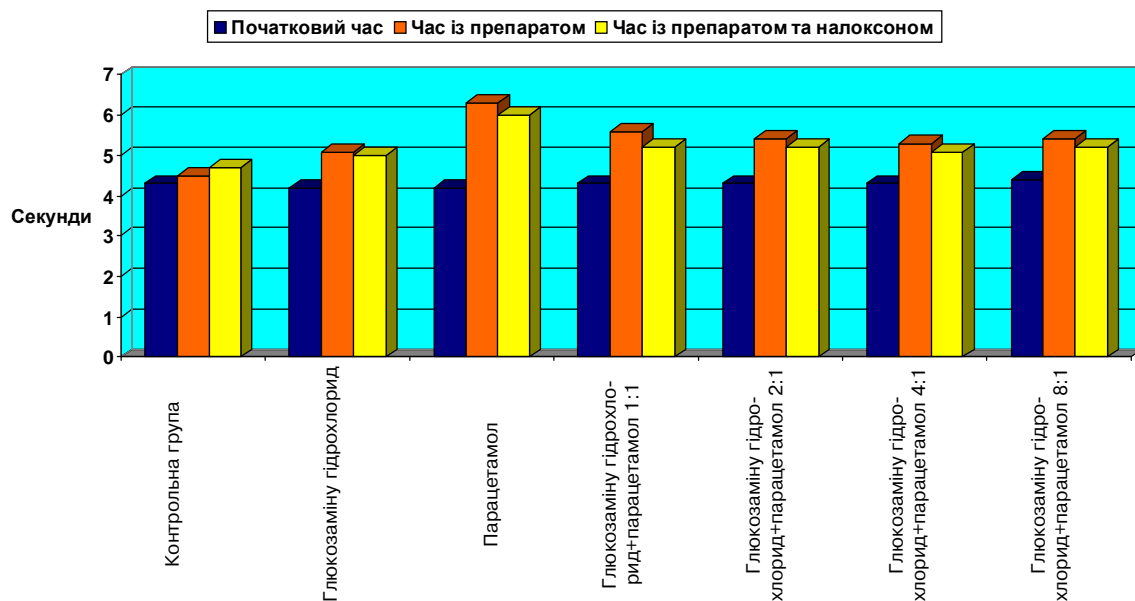


Рис. 1. Зміни часу реакції на тепловий подразник 60 °С експериментальних білих щурів під впливом досліджуваних субстанцій і комбінацій парацетамолу та глюкозаміну гідрохлориду, в тому числі за умов дії налоксона, с (n=6).

гетичної активності парацетамолу приблизно в 1,2 раза відносно очікуваної величини.

3. Найбільшу активність, як і терапевтичний індекс з анальгетичної дії, продемонстрували комбінації зі співвідношенням глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом в інтервалі 2:1-4:1. Вихід за межі вказаного інтервалу призводив до істотного зниження оцінюваного ефекту.

4. Анальгетична активність глюкозаміну гідрохлориду в дозі 50 мг/кг була помірною за вираженням і мало залежала від дії налоксона, що свідчить про переважання периферичних механізмів анальгетичної активності глюкозаміну гідрохлориду.

5. Значна частка анальгетичної активності парацетамолу пов'язана з його центральною дією на опіодні рецептори, що підтвердилося зниженням на 44,4 % його анальгетичної активності за присутності налоксона.

6. Складання комбінацій глюкозаміну гідрохлориду з парацетамолом не змінювало співвідношення центрального і периферичного механізмів анальгетичної дії. Комбінації проявляли змішану (центрально-периферичну) дію, механізм якої, можливо, пов'язаний зі зменшенням виділення простагландинів, активності калікреїн-кінінової системи, а також гальмуванням больового центру в головному мозку.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
2. Зайцев А.А., Игнатов Ю.Д. Нейрохимический анализ роли адренергических процессов в регуляции боли // Нейропсихофармакология болеутоляющих средств. – Л., 1986. – С. 40.
3. Зупанец И.А., Дрогвоз С.М., Бездетко Н.В. и др. Влияние глюкозамина на антиэкссудативный эффект нестероидных противовоспалительных средств // Фармакология и токсикология. – 1991. – **54**, № 2. – С. 61-63.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: Новая волна, 2005. – 495 с.
5. Панов В.П., Овсепян А.М. Физико-химическое изучение гепарина (обзор) // Хим.-фармац. журн. – 1979. – **13**, № 12. – С. 72-86.
6. Brandt K.D. The role of analgesics in the management of osteoarthritis pain // Am. J. Ther. – 2000. – **7**, № 2. – P.75-90.
7. Fenton J.I., Chlebek-Brown K.A., Peters T.L. et al. Glucosamine HCl reduces equine articular cartilage degradation in explant culture // Osteoarthritis Cartilage. – 2000. – **8**, № 4. – P. 258-265.
8. Hill R.G. Endogenous opioids and pain: a review // J. R. Soc. Med. – 1981. – **74**, № 6. – P. 448-450.
9. Jordan K.M., Arden N.K., Doherty M. et al. EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of osteoarthritis: Report of a task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCSIT) // Ann. Rheum. Dis. – 2003. – № 3. – P. 1-13.
10. Largo R., Alvarez-Soria M.A., Diez-Ortego I. et al. Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NF-kappa-B activation in human osteoarthritic chondrocytes // Osteoarthritis Cartilage. – 2003. – **11**, № 4. – P. 290-298.
11. Poole A.R. Early changes in cartilage matrix turnover in osteoarthritis // XIV European League Against Rheumatism Congress. Speakers Theses. – Glasgow, 1999. – P. 14.

# АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМБИНАЦИЙ ГЛЮКОЗАМИНА ГИДРОХЛОРИДА С ПАРАЦЕТАМОЛОМ

**В.А. Туляков**

ИНСТИТУТ ПАТОЛОГИИ ПОЗВОНОЧНИКА И СУСТАВОВ  
ИМЕНИ ПРОФ. М.И. СИТЕНКО АМН УКРАИНЫ, ХАРЬКОВ

## Резюме

В статье приведена информация о результатах сравнительного исследования анальгетической активности глюкозамина гидрохлорида, парацетамола, а также их комбинаций в соотношениях от 1:1 до 8:1.

Комбинации глюкозамина гидрохлорида с парацетамолом в эксперименте на моделях уксуснокислых корчей и контактно-теплого раздражения продемонстрировали анальгетическую активность, которая повышалась с увеличением доли парацетамола в комбинации. В исследованных условиях наблюдался эффект потенцирования глюкозамином анальгетической активности парацетамола приблизительно в 1,2 раза по отношению к ожидаемой величине. Наибольшую активность, равно как и терапевтический индекс по анальгетическому действию, продемонстрировали комбинации с соотношением глюкозамина гидрохлорида с парацетамолом в интервале 2:1-4:1. Выход за пределы указанного интервала привёл к существенному снижению оцениваемого эффекта.

В анальгетической активности глюкозамина гидрохлорида преобладали периферические механизмы, в то время как анальгетическая активность парацетамола в большей степени связана с его центральным действием на опиоидные рецепторы. Составление комбинаций глюкозамина гидрохлорида с парацетамолом не меняет соотношения центрального и периферического механизмов анальгетического действия.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** глюкозамин, парацетамол, анальгетическая активность.

# ANALGESIC ACTION OF GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE WITH PARACETAMOL COMBINATIONS

**V.O. Tulyakov**

INSTITUTE OF SPINE AND JOINT PATHOLOGY BY PROF. M.I. SYTENKO OF AMS OF UKRAINE, KHARKIV

## Summary

The information on the results of comparative research of analgesic action of glucosamine hydrochloride, paracetamol and their combinations in relations from 1:1 to 8:1 is adduced in the article.

Combinations of glucosamine hydrochloride with paracetamol in the experiment on the models of acetate acid irritation and pin-thermal irritation showed analgesic activity which increased with increasing the part of paracetamol in combination. In investigational terms was observed the effect of potentiation of analgesic activity of paracetamol by glucosamine approximately in 1,2 times in relation to the expected index. The largest activity as well as therapeutic index of analgesic action showed combinations with correlation of glucosamine hydrochloride with paracetamol in an interval 2:1-4:1. Exceeding the limits of mentioned interval resulted in substantial decline of the estimated effect.

Peripheral mechanisms prevailed in analgesic activity of glucosamine hydrochloride, while analgesic activity of paracetamol in a great degree is related to its central action on opiate receptors. Drafting the combinations of glucosamine hydrochloride with paracetamol does not change correlation of central and peripheral mechanisms of analgesic action.

**KEY WORDS:** glucosamine, paracetamol, analgesic action.

Отримано 19.11.2008 р.

Адреса для листування: В.О. Туляков, вул. Полтавський шлях, 119, кв. 149, Харків, 61064, Україна.

## ВПЛИВ ТІОЛАКТОНУ ГОМОЦИСТЕЇНУ, ЦИСТЕЇНУ ТА ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗУ КРОЛІВ

Н.В. Заїчко

УКРАЇНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ НДІ РЕАБІЛІТАЦІЇ ІНВАЛІДІВ, ВІННИЦЯ

*Досліджено вплив одноразового внутрішньовенного введення тіолактону гомоцистеїну (100 мг/кг), цистеїну (200 мг/кг) та гідроген сульфїду (3 мг/кг) на систему гемостазу кролів. Дисбаланс в обміні сірковмісних амінокислот, індукований введенням тіолактону гомоцистеїну або цистеїну, викликає активацію системи гемостазу. За умов гострої гіпергомоцистеїнемії відбувається активація тромбоцитів, посилюються процеси коагуляції, знижується активність антитромбіну III та плазміногену. При гострій гіперцистеїнемії активується лише тромбоцитарна ланка. Введення екзогенного гідроген сульфїду не викликає змін в обміні сірковмісних амінокислот та системі гемостазу.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** гомоцистеїн, тіолактон гомоцистеїну, цистеїн, гідроген сульфід, гемостаз, тромбоцити.

ВСТУП. Сьогодні з'являється все більше підтверджень того, що порушення обміну сірковмісних амінокислот сприяють формуванню розладів у системі гемостазу. При цьому основна увага зосереджена на дослідженні механізмів протромбогенної дії гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ), а вплив на систему гемостазу інших сірковмісних сполук, зокрема цистеїну та гідроген сульфїду ( $H_2S$ ), метаболізм яких асоційований з обміном гомоцистеїну (ГЦ), залишається невідомим. В попередніх дослідженнях ми продемонстрували вплив різних тіолових сполук та їх похідних на агрегацію тромбоцитів *in vitro*. ГЦ та його тіолактон проявляли пряму активуючу дію на тромбоцити і дозозалежно посилювали їх агрегацію, індуковану ADP та колагеном, у діапазоні концентрацій 10-1000 мкМ. Вплив цистеїну на агрегацію тромбоцитів проявлявся лише у високих концентраціях (1000 мкМ), а його спрямованість значною мірою залежала від виду індуктора – ADP-індукована агрегація посилювалась, а колагеніндукована, навпаки, пригнічувалась [2]. Нещодавно було показано, що  $H_2S$  – вазоактивна молекула, яка утворюється при утилізації ГЦ та цистеїну шляхом транссульфування, проявляє *in vitro* властивості антиагреганта [15]. Разом із тим, виникають питання, як реалізується дія зазначених сірковмісних сполук на систему гемостазу в цілісному організмі, яка ланка системи гемостазу першою реагує на порушення їх обміну і чи відповідає вплив ГЦ, цистеїну та  $H_2S$

на тромбоцити *in vivo* їх ефекту *in vitro*. Тому метою дослідження було з'ясувати вплив гострої тіолактонової ГГЦ, гострої гіперцистеїнемії та гострого підвищення рівня  $H_2S$  на систему гемостазу кролів.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Дослідження проведено на 15 безпородних кролях-самцях з індивідуальною масою 3,5-3,6 кг, які перебували на стандартному раціоні віварію з водним режимом *ad libitum* та 12-годинним світловим режимом день/ніч. Досліди виконували згідно з правилами гуманного ставлення до експериментальних тварин, затвердженими комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова, а також відповідно до рекомендацій Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Hemostasis [9].

Кролів було поділено на три групи по 5 тварин. Кролям 1-ї групи вводили розчин тіолактону DL-гомоцистеїну ("Fluka", Німеччина) в дозі 100 мг/кг, 2-ї – розчин L-цистеїну ("Sigma", США) в дозі 200 мг/кг, 3-ї – донор  $H_2S$   $NaHS$  у вигляді розчину  $Na_2S \cdot 9H_2O$  ("Sigma", США) в дозі 3 мг/кг. Розчини речовин готували *ex tempore* на 5 % розчині глюкози і вводили внутрішньовенно з розрахунку 2 мл/кг маси тіла. Кров для досліджень набирали з вушної вени за допомогою вайкутанерів у стерильні пластикові пробірки, а для оцінки показників гемостазу – в стерильні пластикові пробірки з 3,8 % розчином цитрату натрію у співвідношенні 9:1. Забір

крові у тварин проводили до та через 60 хв після введення речовин (другий раз кров отримували з вен іншого вуха). Дози та шляхи введення тіолактону ГЦ, цистеїну та  $H_2S$  були обрані згідно з даними літератури і не викликали загибелі кролів [6, 11, 14].

Для дослідження агрегації тромбоцитів збагачену тромбоцитами плазму (ПЗТ) отримували шляхом центрифугування стабілізованої крові при 300 g упродовж 5 хв при 18-22 °С. Бідну тромбоцитами плазму (ПБТ) одержували шляхом центрифугування ПЗТ при 1500 g упродовж 20 хв. Агрегатометрію виконували в перші три години після забору крові на фотооптичному агрегометрі AP2110 ("Солар", Білорусь). Використовували індуктори агрегації 5 мкМ ADP чи 2 мг/мл колагену ("Технологія-Стандарт", Росія) в кінцевих концентраціях згідно з інструкціями фірми-виробника. Оцінювали ступінь, швидкість та час агрегації, тривалість лаг-періоду.

Проведено комплексний аналіз стану системи гемостазу: для характеристики внутрішнього та зовнішнього шляхів згортання крові визначали активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ) та протромбіновий час (ПЧ); для характеристики кінцевого етапу системи згортання крові – тромбіновий час (ТЧ). В амідолітичних тестах оцінювали активність фізіологічних інгібіторів згортання крові антитромбіну III (АТ III) та протеїну С, визначали вміст плазміногену. В роботі використано набори "Техпластин-тест", "АПТВ-ЕІ-тест", "Тромботест", "ХромомТех-Плазміноген", "ХромомТех-Антитромбин" (Технологія-Стандарт, Росія) та "Реахром-Протеин С" (НПО Ренам, Росія).

Сироватку отримували шляхом центрифугування крові при 1500 g упродовж 15 хв. Для оцінки рівня ГЦ, цистеїну та SH-груп білків відбирали аліквоти сироватки і зберігали до

проведення дослідження при – 20 °С. Загальний рівень ГЦ (вільного та протеїнів'язаного) в сироватці крові визначали імуноферментним методом з використанням комерційного набору фірми "Axis-Shield" (Англія). Загальний вміст цистеїну визначали за методом Gaitonde [8]. Кількість вільних SH-груп в білках визначали колориметричним методом за реакцією з реактивом Елмана [3]. Для визначення рівня  $H_2S$  аліквоту сироватки крові відразу після отримання додавали до 1 % розчину ацетату цинку у співвідношенні 1:5. Вміст  $H_2S$  в сироватці крові визначали спектрофотометричним методом [4, 5].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою стандартних статистичних програм "MS Excel XP". Оцінювали середнє значення, стандартні помилки, достовірність відмінностей за t-критерієм Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Введення тіолактону ГЦ, цистеїну і, меншою мірою, NaHS викликало дисбаланс в тіолово-дисульфідному обміні, що проявлялось змінами вмісту сірковмісних сполук у крові (табл. 1). Так, через 60 хв після введення тіолактону ГЦ реєстрували зростання (в 2,2 та 1,95 раза) рівнів ГЦ і  $H_2S$  в сироватці крові та зниження (на 44,6 і 38,4 %) рівнів цистеїну та SH-груп білків. За умов гострої ГГЦ з'являвся обернений кореляційний зв'язок рівня ГЦ з рівнем цистеїну ( $r=-0,74$ ), рівень цистеїну прямо корелював з вмістом SH-груп ( $r=0,73$ ) та обернено – з рівнем  $H_2S$  ( $r=-0,48$ ).

Введення цистеїну не вплинуло на вміст ГЦ в сироватці крові, проте зумовило зростання вмісту цистеїну (в 2,3 раза) та  $H_2S$  (в 1,8 раза) і зниження вмісту SH-груп (в 2,4 раза). За умов гострої гіперцистеїнемії рівень цистеїну прямо корелював з рівнем  $H_2S$  ( $r=-0,63$ ) та обернено –

Таблиця 1 – Вміст сірковмісних сполук в сироватці крові до та через 60 хв після внутрішньовенного введення тіолактону ГЦ (100 мг/кг), цистеїну (200 мг/кг) та гідроген сульфідну (3 мг/кг) ( $M \pm m$ )

Показники	Стан	Тіолактон ГЦ, 100 мг/кг (n=5)	Цистеїн, 200 мг/кг (n=5)	NaHS, 3 мг/кг (n=5)
Гомоцистеїн, мкмоль/л	До введення	5,72±0,31	4,76±0,31	5,08±0,41
	Після введення	12,6±1,09**	5,40±0,26	5,18±0,36
$H_2S$ , мкмоль/л	До введення	67,1±1,56	60,4±4,56	69,2±2,42
	Після введення	131,3±5,07**	109,8±14,3**	86,4±3,06**
Цистеїн, мкмоль/л	До введення	290,6±10,5	272,7±0,51	228,9±5,03
	Після введення	160,9±25,6***	628,9±26,7***	245,3±12,56
SH-групи, ммоль/л	До введення	9,31±0,83	11,7±0,43	10,7±0,40
	Після введення	5,73±0,15***	4,83±0,36***	11,9±0,78

Примітка. Тут і в наступних таблицях: \* – достовірні відмінності відносно стану "до введення препарату" (\* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$ ).

з рівнем SH-груп ( $r=-0,68$ ). Введення NaHS викликало помірне підвищення рівня  $H_2S$  (на 25 %), не змінювало вміст ГЦ, цистеїну та SH-груп білків у сироватці крові. Кореляцій рівнів сірко-вмісних сполук за цих умов не виявлено.

Гостре підвищення вмісту ГЦ в сироватці крові викликало активацію тромбоцитів (табл. 2, рис. 1, 2). Через 60 хв після введення тіолактону ГЦ ступінь агрегації тромбоцитів, індукованої ADP, збільшився на 86,2 %, швидкість – на 74 %. Досить вираженими були зміни колагеніндукованої агрегації тромбоцитів: ступінь та швидкість зросли на 86,8 та 114 %, лаг-пе-

ріод скоротився на 34,6 %. В інтактних кролів вміст ГЦ в сироватці крові корелював зі ступенем та швидкістю ADP-індукованої агрегації тромбоцитів ( $r=0,51$  та  $0,85$ ) і за ГЦ кореляційний зв'язок посилювався ( $r=0,83$  та  $0,95$ ). Рівень ГЦ обернено корелював із тривалістю лаг-періоду ( $r=-0,63$ ) колагеніндукованої агрегації тромбоцитів, а вміст  $H_2S$  – з її ступенем та швидкістю ( $r=-0,89$ ).

Гіперцистеїнемія супроводжувалась зростанням ступеня, швидкості та часу ADP-індукованої агрегації (на 72,5, 36,5 та 36,3 % відповідно), тоді як суттєвих змін колагеніндукова-

Таблиця 2 – Показники агрегації тромбоцитів до та через 60 хв після внутрішньовенного введення тіолактону ГЦ (100 мг/кг), цистеїну (200 мг/кг) та гідроген сульфід (3 мг/кг) ( $M \pm m$ )

Показники агрегації тромбоцитів	Стан	Тіолактон ГЦ, 100 мг/кг (n=5)	Цистеїн, 200 мг/кг (n=5)	NaHS, 3 мг/кг (n=5)
Індуктор – ADP 2,5 мкМ				
Ступінь, %	До введення	20,4±5,18	16,4±2,38	21,6±2,37
	Після введення	38,0±8,06	28,3±3,04*	17,2±7,13
Швидкість, % за 1 хв	До введення	31,2±7,33	25,5±3,10	40,1±3,82
	Після введення	54,4±7,92*	34,8±2,84*	29,1±6,43
Час, с	До введення	77,2±10,3	74,2±6,81	69,6±4,97
	Після введення	84,0±7,18	101,2±8,53*	83,2±23,7
Індуктор – колаген 2 мг/мл				
Ступінь, %	До введення	42,5±9,74	47,4±2,67	52,9±7,16
	Після введення	74,9±10,4*	56,9±5,57	49,4±2,81
Швидкість, % за 1 хв	До введення	27,8±6,41	36,6±4,45	36,3±2,79
	Після введення	59,6±11,7*	41,1±6,51	38,9±3,06
Час, с	До введення	177,6±33,5	268,6±16,5	235,6±15,9
	Після введення	232,8±12,1	255,0±16,1	226,6±7,54
Лаг-фаза, с	До введення	52,0±5,83	52,0±3,74	42,0±7,84
	Після введення	34,0±4,85*	46,0±4,30	48,0±4,95

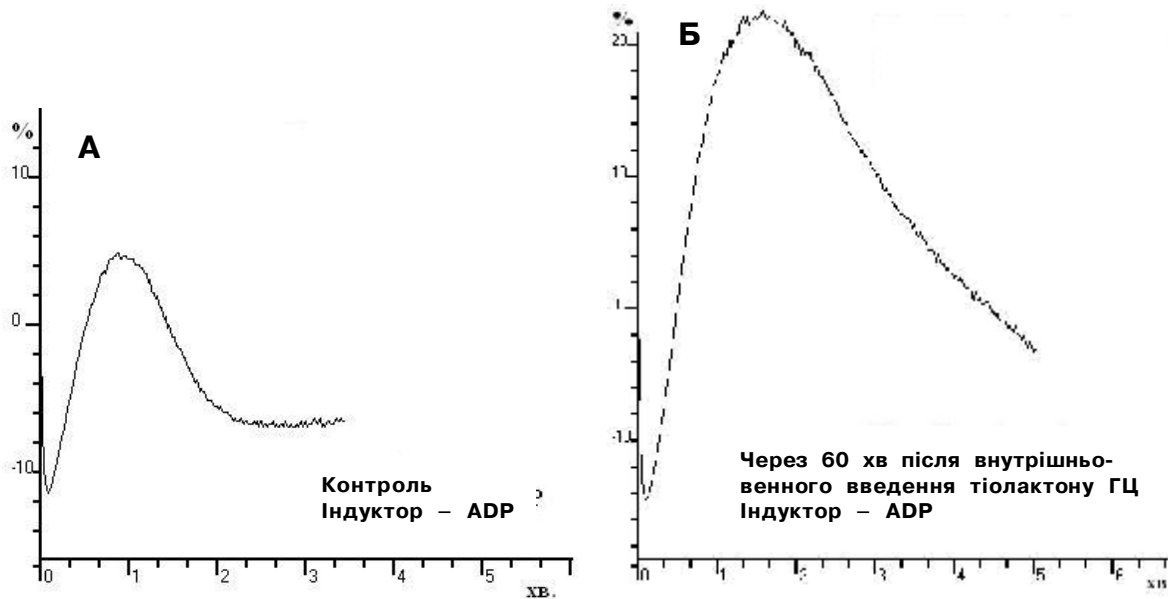


Рис. 1. Вплив тіолактону ГЦ на агрегацію тромбоцитів кроля, індувану ADP 2,5 мкМ: А – стан до введення тіолактону ГЦ (контроль); Б – через 60 хв після внутрішньовенного введення тіолактону ГЦ (100 мг/кг).

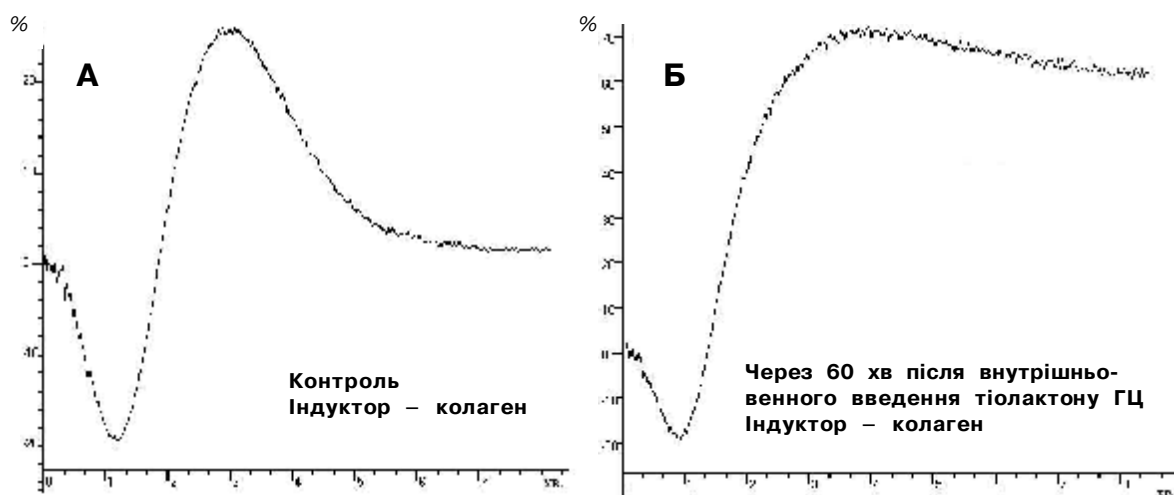


Рис. 2. Вплив тіолактону ГЦ на агрегацію тромбоцитів кроля, індуковану колагеном 2 мг/мл: А – стан до введення тіолактону ГЦ (контроль); Б – через 60 хв після внутрішньовенного введення тіолактону ГЦ (100 мг/кг).

ної агрегації не відбувалось. Рівень цистеїну корелював лише зі ступенем ADP-індукованої агрегації ( $r=-0,69$ ) і не корелював з іншими показниками. Введення NaHS не викликало достовірних змін агрегації тромбоцитів, хоча і відмічалась тенденція до зменшення ступеня та швидкості ADP-індукованої агрегації. Таким чином, навіть при нетривалому підвищенні вмісту ГЦ і, меншою мірою, цистеїну в тромбоцитах відбуваються активаційні процеси. Закономірності щодо характеру змін показників агрегації тромбоцитів за умов *in vivo* при ГГЦ та гіперцистеїнемії в цілому підтвердили закономірності, виявлені нами в попередніх дослідженнях *in vitro* [2].

Як показав комплексний аналіз системи гемостазу, гостра ГГЦ порушувала баланс між гемокоагуляційною, антитромбіновою та фібринолітичною ланками (табл. 3). Активаційні процеси стосувались в основному факторів

внутрішнього шляху згортання крові – про це свідчить скорочення АЧТЧ (на 13,6 %), тоді як ПЧ, що характеризує активність факторів зовнішнього шляху згортання крові, практично не змінювався. Також прискорювалось перетворення фібриногену в фібрин, що проявлялось скороченням часу згортання крові в тесті ТЧ (на 22,3 %). Антикоагулянтний та фібринолітичний потенціали за умов ГГЦ істотно зменшилися – знизилась активність фізіологічного антикоагулянту АТ III (на 20,8 %) та інгібітора згортання крові протеїну С (тенденція), зменшився вміст плазміногену (на 32,6 %) – попередника плазміну, ключового ферменту фібринолізу. Разом із тим, гостра гіперцистеїнемія та введення NaHS не викликали суттєвих змін показників згортання крові та фібринолізу. При ГГЦ між рівнем ГЦ та вмістом плазміногену виникав обернений кореляційний зв'язок ( $r=-0,73$ ).

Таблиця 3 – Стан системи гемостазу кролів до та через 60 хв після внутрішньовенного введення тіолактону ГЦ (100 мг/кг), цистеїну (200 мг/кг) та гідроген сульфід (3 мг/кг) ( $M \pm m$ )

Показники	Стан	Тіолактон ГЦ, 100 мг/кг (n=5)	Цистеїн, 200 мг/кг (n=5)	NaHS, 3 мг/кг (n=5)
ПЧ, с	До введення	14,6±0,40	14,2±0,37	15,0±0,32
	Після введення	13,4±0,51	13,6±0,51	14,4±0,68
АЧТЧ, с	До введення	29,4±1,17	29,6±1,63	26,8±0,97
	Після введення	25,4±0,68*	28,4±1,69	28,8±0,66
ТЧ, с	До введення	9,40±0,24	9,00±0,35	9,70±0,20
	Після введення	7,30±0,20***	8,80±0,12	9,50±0,22
АТ III, %	До введення	132,4±1,40	125,8±4,91	123,4±4,66
	Після введення	104,8±4,33*	126,6±2,59	127,9±4,91
Протеїн С, %	До введення	72,0±4,43	69,4±4,12	72,6±3,82
	Після введення	61,8±2,91	68,2±3,14	71,0±3,42
Плазміноген, %	До введення	82,8±3,14	96,2±7,53	94,2±6,39
	Після введення	55,8±8,28**	90,6±8,48	91,8±3,84

Таким чином, нами вперше було продемонстровано, що гостра ГГЦ, індукована одноразовим внутрішньовенним введенням тіолактону ГЦ, призводила до зростання вмісту  $H_2S$  та зменшення вмісту цистеїну в сироватці крові. Як відомо,  $H_2S$  є одним із найважливіших біологічно активних метаболітів, який утворюється при утилізації ГЦ шляхом транссульфування з участю двох піридоксальзалежних ферментів – цистатіонін-бета-синтетази (КФ 4.2.1.22) та цистатіонін-гамма-ліази (КФ 4.4.1.1). В судинній стінці експресується цистатіонін-гамма-ліаза, головним субстратом для якої в реакціях десульфування є цистеїн [12]. Очевидно, у відповідь на гостру тіолактонову ГГЦ посилюється споживання цистеїну й активується синтез  $H_2S$ . Підвищення рівня  $H_2S$  в судинному руслі, можливо, є одним із засобів захисту судинної стінки від несприятливої дії високих рівнів ГЦ, оскільки ця газова молекула – потужний вазодилататор. Існують повідомлення, що введення  $NaHS$  як донора  $H_2S$  при моделюванні інфаркту міокарда у щурів достовірно зменшувало розміри ішемізованої ділянки, а введення інгібітора цистатіонін-гамма-ліази пропаргілгліцину, навпаки, значно збільшувало вогнище ураження [14].

При гострій гіперцистеїнемії посилення утилізації цистеїну шляхом десульфування обумовило зростання вмісту  $H_2S$  в сироватці крові. Застосування цистеїну як донора  $H_2S$  описано і в літературі [12]. Рівень  $H_2S$  в сироватці крові через 1 год після введення  $NaHS$  був нижчим, ніж після тіолактону ГЦ чи цистеїну. Підвищення рівня ендогенного  $H_2S$  за рахунок ферментативної продукції виявилось більш ефективним, ніж використання його екзогенного аналога.

Дисбаланс в обміні сірковмісних амінокислот індукував розлади в системі гемостазу, що перш за все проявлялось активацією тромбоцитарної ланки. Відомо, що тіолово-дисульфідний обмін є одним із важелів у регуляції функціонального стану тромбоцитів, оскільки більшість їх білків, зокрема білків-рецепторів, є редокс-чутливими [7]. В одній з робіт ми показали, що за різних концентрацій  $GSH$  у плазмі крові в тромбоцитах можуть відбуватись як активаційні, так і гальмівні процеси [1]. Очевидно, за умов гострої ГГЦ і гіперцистеїнемії створюється таке редокс-оточення для рецепторів тромбоцитів, яке полегшує їх активацію агоністами. Крім того, ГЦ і тіолактон ГЦ здатні модифікувати білки шляхом S- та N-гомоцистеїнування з утворенням S-нітрозотіолів та змішаних дисульфідів [11, 13]. Властивості таких модифікованих білків кардинально змінюються. Наприклад, згорткок, що містить N-ГЦ-

фібрин, більш повільно руйнується плазміном [13]. Здатність утворювати змішані дисульфідні притаманна і цистеїну. При ГГЦ та гіперцистеїнемії ми спостерігали суттєве зниження вмісту білкових SH-груп в сироватці крові. Зменшення активності АТ III та плазміногену при гострій ГГЦ може реалізуватись за даним механізмом. Це узгоджується з фактом про втрату активності АТ III залежно від дози та часу інкубації з тіолактоном ГЦ *in vitro* [10].

Таким чином, навіть тимчасове порушення обміну ГЦ та цистеїну створює умови для активації системи гемостазу. Найбільш чутливою до дисбалансу в обміні сірковмісних амінокислот виявилась тромбоцитарна ланка, тоді як активність плазмових факторів змінювалась меншою мірою і лише у відповідь на ГГЦ. Один із шляхів адаптації організму до гострої ГГЦ та гіперцистеїнемії ґрунтується на активації продукції вазодилататора та антиагреганту  $H_2S$ . Перспективи подальших досліджень полягають в розкритті механізмів, через які реалізується вплив високих рівнів ГЦ та цистеїну на рецепторні білки і ферментні системи тромбоцитів, а також на фактори згортання крові, що дозволить поглибити розуміння шляхів формування тромбофілії, асоційованих з порушеннями обміну сірковмісних амінокислот.

**ВИСНОВКИ.** 1. Гостра ГГЦ активує систему гемостазу, що проявляється посиленням агрегаційних властивостей тромбоцитів, скороченням часу згортання крові в тестах АЧТЧ та ТЧ, зменшенням активності АТ III та плазміногену. Гостре підвищення рівня цистеїну помірно активує тромбоцити і практично не викликає змін показників гемокоагуляційної, антитромбінової та фібринолітичної ланок системи гемостазу.

2. Активація системи гемостазу виникає на тлі дисбалансу в обміні сірковмісних сполук, який є найбільш вираженим при ГГЦ. Введення тіолактону ГЦ індукує підвищення рівня ГЦ та  $H_2S$ , зниження вмісту цистеїну та SH-груп білків у сироватці крові. Введення цистеїну викликає значне зростання в сироватці крові рівня цистеїну та  $H_2S$ , зменшення вмісту білкових SH-груп і не впливає на рівень ГЦ.

3. Введення екзогенного  $H_2S$  викликає незначне підвищення його рівня в крові (на 25 %), не впливає на вміст ГЦ, цистеїну та SH-груп, не спричиняє активаційних процесів у системі гемостазу. Зростання рівня  $H_2S$  за рахунок його ферментативної продукції є більш ефективним, ніж введення екзогенного аналога, і може виявитись адаптаційним механізмом при ГГЦ та гіперцистеїнемії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Заїчко Н.В. Вплив глутатіону та його дисульфідну на стан тромбоцитарної ланки системи гемостазу // Мед. хімія. – 2008. – **10**, № 1. – С. 97-101.
2. Заїчко Н.В., Пентюк О.О., Карбовський В.Л. Вплив гомоцистеїну, цистеїну та їхніх похідних на тромбоцитарну ланку системи гемостазу // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 5. – С. 122-132.
3. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича – М.: Медицина, 1977. – 392 с.
4. Уильямс У.Дж. Определение анионов: Справочник: Пер. с англ. – М.: Химия, 1982. – 624 с.
5. Dombkowski R., Russell M., Olson K. Hydrogen sulfide as an endogenous regulator of vascular smooth muscle tone in trout // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. – 2004. – **286**. – P. 678-685.
6. Donahue S., Struman J.A., Gaull G. Arteriosclerosis due to homocysteinemia. Failure to reproduce the model in weanling rabbits // Am. J. Pathol. – 1974. – **77**, № 2. – P. 167-173.
7. Essex D.W. The role of thiols and disulfides in platelet function // Antioxid. Redox Signal. – 2004. – **6**, № 4. – P. 736-746.
8. Gaitonde M.K. A spectrophotometric method for direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acid // Biochem. J. – 1967. – **104**, №2. – P. 627-633.
9. Giles A.R. Guidelines for the use of animals in biomedical research // Thromb. Haemost. – 1987. – **58**. – P. 1078-1084.
10. Gugliucci A. Antithrombin activity is inhibited by acrolein and homocysteine thiolactone: Protection by cysteine // Life Sci. – 2008. – **82**, № 7-8. – P. 413-418.
11. Jakubowski H. Pathophysiological Consequences of Homocysteine Excess // J. Nutr. – 2006. – **136**, suppl. – P. 1741-1749.
12. Lowicka E., Beltowski J. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) – the third gas of interest for pharmacologists // Pharmacological Reports. – 2007. – **59**. – P. 4-24.
13. Sauls D.L., Wolberg A.S., Hoffman M. Elevated plasma homocysteine leads to alterations in fibrin clot structure and stability: implications for the mechanism of thrombosis in hyperhomocysteinemia // J. Thromb. Haemost. – 2003. – **1**, № 2. – P. 300-306.
14. Sivarajah A., McDonald M.C., Thiernemann C. The production of hydrogen sulfide limits myocardial ischemia and reperfusion injury and contributes to the cardioprotective effects of preconditioning with endotoxin, but not ischemia in the rat // Shock. – 2006. – **26**, № 2. – P. 154-161.
15. Zagli G., Patacchini R., Trevisani M. et al. Hydrogen sulfide inhibits human platelet aggregation // Eur. J. Pharmacol. – 2007. – **559**, № 1. – P. 65-68.

## ВЛИЯНИЕ ТИОЛАКТОНА ГОМОЦИСТЕИНА, ЦИСТЕИНА И ГИДРОГЕН СУЛЬФИДА НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА КРОЛИКОВ

Н.В. Заїчко

УКРАИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НИИ РЕАБИЛИТАЦИИ ИНВАЛИДОВ, ВИННИЦА

### Резюме

Исследовано влияние однократного внутривенного введения тиолактона гомоцистеина (100 мг/кг), цистеина (200 мг/кг) и гидроген сульфида (3 мг/кг) на систему гемостаза кроликов. Дисбаланс в обмене серосодержащих аминокислот, индуцированный введением тиолактона гомоцистеина или цистеина, вызывает активацию системы гемостаза. В условиях острой гипергомоцистеинемии происходит активация тромбоцитов, усиливаются процессы коагуляции, снижается активность антитромбина III и плазминогена. При острой гиперцистеинемии активируется только тромбоцитарное звено. Введение экзогенного гидроген сульфида не приводит к изменениям в обмене серосодержащих аминокислот и системе гемостаза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гомоцистеин, тиолактон гомоцистеина, гидроген сульфид, гемостаз, тромбоциты.

## INFLUENCE OF HOMOCYSTEINE THIOLACTONE, CYSTEINE, HYDROGEN SULFIDE ON HEMOSTASIS SYSTEM OF RABBITS

N.V. Zaichko

UKRAINIAN STATE SCIENTIFIC RESEARCH INSTITUTE OF INVALID REHABILITATION, VINNYTSIA

### Summary

The influence of one-time intravenous administration of thiolactone homocysteine (100 mg/kg), cysteine (200 mg/kg) and hydrogen sulfide (3 mg/kg) on hemostasis system of rabbits was investigated. Activation of hemostasis system was caused by imbalance of sulfur amino acid metabolism induced by administration of thiolactone homocysteine or cysteine. Acute hyperhomocysteinemia resulted in platelet activation, coagulation enhancement, decrease of antithrombin III and plasminogen activity. Acute hypercysteinemia evoked platelet activation only. Administration of exogenous hydrogen sulfide didn't influence upon sulfur amino acid metabolism or hemostasis system.

KEY WORDS: homocysteine, homocysteine thiolactone, cysteine, hydrogen sulfide, hemostasis, platelets.

Отримано 8.10.2008 р.

Адреса для листування: Н.В. Заїчко, Український державний НДІ реабілітації інвалідів, Хмельницьке шосе, 104, Вінниця, 21100, Україна.



## ВИВЧЕННЯ ПРОТИГЕРПЕСНОЇ АКТИВНОСТІ 2-ДІЕТИЛАМІНОЕТИЛАМІДУ 2-ГІДРОКСИ-9-МЕТИЛ-4-ОКСО-4Н-ПІРИДО- [1,2-А]-ПІРИМІДИН-3-КАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ В ДОСЛІДАХ IN VIVO

Н.Л. Березнякова, І.В. Українець, І.А. Тугайбей, О.В. Горохова  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

*Експериментально підтверджена висока активність 2-діетиламіноетиламіду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2-а]-піримідин-3-карбонОВОЇ кислоти відносно вірусу простого герпесу I типу в дослідях in vivo, що відкриває перспективи створення на основі означеної сполуки нового засобу, придатного для боротьби з герпесними інфекціями.*

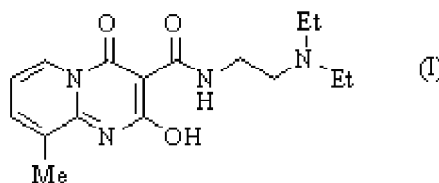
**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** аміди, герпес, 2-гідрокси-4-оксо-4Н-піридо-[1,2-а]-піримідини, протівірусна активність.

**ВСТУП.** Герпесвірусні інфекції (ГВІ) за останні роки ХХ і на початку ХХІ століття набули епідемічного розповсюдження у всіх країнах світу, викликаючи різноманітну патологію з ураженням багатьох органів та систем організму людини. Згідно з даними ВООЗ, за рівнем смертності (15,8 %) герпес поступається лише грипу (35,8 %) [1]. У більшості випадків висока летальність зумовлена вірусом простого герпесу I типу (ВПГ-1), який викликає ураження головного мозку з розвитком гострого енцефаліту або менінгоенцефаліту [6]. Поряд із тяжкими формами ГВІ, медичну спільноту світу гостро турбує також і дуже висока – до 99 % – інфікованість герпесвірусами населення земної кулі. Латентне (приховане) вірусноносійство часто призводить до розвитку клінічних ознак захворювання, причому пусковими механізмами рецидивів можуть бути найрізноманітніші фактори зовнішнього середовища, які викликають зниження імунореактивності організму.

З огляду на це, боротьба з герпесвірусними захворюваннями є одним із найважливіших завдань сучасної фармацевтичної науки. І хоча перелік хіміопрепаратів, які здатні тією чи іншою мірою впливати на репродукцію герпесвірусів, досить широкий, їх лікувальна ефективність далеко не завжди задовольняє систему практичної охорони здоров'я, оскільки вірус герпесу здатний дуже швидко виробляти до них стійку резистентність. Внаслідок

цього епідемічне розповсюдження ГВІ у світі невпинно зростає і в багатьох випадках класичне лікування вже не допомагає хворим. З такої причини пошук нових малотоксичних антигерпетичних засобів з різноманітними механізмами дії не втрачає своєї актуальності.

Нещодавно нами синтезована велика серія діалкіламіноалкіламідів 2-гідрокси-4-оксо-4Н-піридо-[1,2-а]-піримідин-3-карбонОВОЇ кислоти, інтерес до яких викликаний перш за все тим, що згідно з попередньо проведеним за програмою PASS [4] математичним прогнозуванням саме такі сполуки повинні були продемонструвати протигерпесні властивості з досить високим (60 %) рівнем імовірності. Виконані нами експерименти [5] повністю підтвердили дані комп'ютерного прогнозу, і в результаті для подальшого дослідження була відібрана одна сполука – 2-діетиламіноетиламід 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2-а]-піримідин-3-карбонОВОЇ кислоти (I):



Амід I показав не тільки високу активність відносно ВПГ-1, а й низьку цитотоксичність, що дуже важливо для протівірусних препаратів, оскільки вони не повинні впливати на проце-

си життєдіяльності клітин організму-хазяїна. Разом із тим, цілком зрозуміло, що результати, одержані в дослідях *in vitro*, якими б обнадійливими вони не були, не гарантують аналогічних показників при проведенні випробовувань на макроорганізмах. З цієї причини типова схема розробки нового потенційного хіміотерапевтичного засобу передбачає обов'язкове тестування специфічної активності в дослідях *in vivo*. Саме таким дослідженням і є наше повідомлення, мета якого – перевірка придатності амідів I для лікування уражених ВПГ-1 тварин.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Відомо, що ВПГ-1 має кератотропні властивості й при потрапленні на рогівку ока викликає офтальмовірусну патологію (офтальмогерпес). Дослідження герпесвірусного захворювання *in vivo* проводять на кроликах, які в експериментальних випробовуваннях давно вважаються зручною та інформативною моделлю, оскільки на них легко відтворюється патологія, дуже близька до клінічної картини захворювання у людини.

Вивчення протівірусної активності амідів I та препарату порівняння (ним став пара-кабетоксіфенілаконітимід [3] у дозі 6 мг/кг як більш ефективний протигерпесний засіб, ніж відомі лікарські препарати бонафтон і оксолін [2]) проводили на моделі герпетичного кератокон'юнктивіту молодих кроликів породи "Шиншила" масою тіла 2-2,5 кг, враховуючи те, що їх рогівка чутлива до ураження ВПГ-1. Усього в дослідях було використано 15 тварин. Після відтвореного під дикаїновою анестезією офтальмогерпесу 10 з них склали дві піддослідні групи по 5 кроликів для вивчення активності амідів I та препарату порівняння, а останні 5 кроликів – контрольну групу. Спостереження за розвитком клінічної картини герпесвірусного кератиту проводили щоденно, розглядаючи око крізь лупу.

Перші ознаки герпесвірусного захворювання очей в інфікованих тварин спостерігалися вже через добу (поява дрібних пухирців на рогівці). В деяких місцях пухирці зливалися, і ураження нагадувало гілочки (деревоподібний кератит). Таке ураження рогівки є характерним для клінічної картини кератиту. Герпетичну природу експериментального кератиту підтверджували шляхом виявлення в слізній рідині антигену ВПГ за допомогою імуноферментного аналізу. Для цього інфекційний матеріал – слізну рідину і вміст пухирців на рогівці (0,2-2,0 мл) – збирали в стерильні флакони невеликої ємності, в які для попе-

редження росту бактеріальної флори додавали антибіотик (пеніцилін або канаміцин) в концентрації 0,1 %. При цьому використовували діагностичну тест-систему Герпес-Скрин ЗАТ "НИАРМЕДИК ПЛЮС" (Москва, Росія). Облік результатів імуноферментного аналізу реєстрували за допомогою імуноферментного аналізатора АИФ-Ц-01С шляхом вимірювання оптичної густини (ОГ), яку визначали в оптичних одиницях (о.о.) при довжині хвилі 492 нм. Усього в кожній піддослідній групі тварин за першу добу захворювання було вивчено по 6 проб: слізної рідини – 3 і вмісту пухирців – 3. В усіх пробах виявлено герпесвірусний антиген. На 2-гу добу захворювання на фоні посилення клінічної картини кератиту – збільшення набряку, слезовиділення та розширення площі ураження рогівки ока – відмічено також і значне зростання показників ОГ в зразках інфекційного матеріалу до 0,482-0,491 о.о. (у неінфікованих тварин цей показник складає в середньому 0,241 о.о.).

Для лікування експериментального офтальмогерпесу в піддослідних групах кроликів, починаючи з 2-го дня після інфікування, використовували амід I у вигляді 0,25 % стерильного водного розчину шляхом закапування в око по 2-3 краплі 4-5 разів на день. Препарат порівняння пара-кабетоксіфенілаконітимід, враховуючи його низьку розчинність у воді, застосовували у вигляді стерильної стабілізованої твіном-80 6 % водної суспензії. Контрольній групі тварин закапували фізіологічний розчин за аналогічною схемою.

Клінічними критеріями ефективності лікування піддослідних тварин слугували ступінь ураження площі рогівки ока, тривалість запальних явищ та зникнення пухирців, а також початок епітелізації рогівки ока. Крім того, враховували виживаність інфікованих кроликів та наявність приєднаної вторинної (бактеріальної) інфекції.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Як видно з наведених у таблиці 1 експериментальних даних, лікування інфікованих кроликів 0,25 % водним розчином амідів I суттєво вплинуло на ступінь ураження площі рогівки ока, яка у двох тварин склала 25 % і у трьох – 50 %. На відміну від групи, де застосовували препарат порівняння, та контрольної групи, серед цих тварин не було помічено значного (до 75 %) та тотального (100 %) ураження рогівки ока, що свідчить про тяжчий перебіг захворювання при лікуванні пара-кабетоксіфенілаконітимідом і, тим більше, за відсутності лікування. У 2 з 5 кроликів, які не одержували лікування (в

Таблиця 1 – Дія амідю I та препарату порівняння на ВПГ-1 (штам УС) у дослідах in vivo

Сполука	Кількість тварин	Кількість тварин зі ступенем ураження площі рогівки ока				Вижило тварин	Тривалість хвороби, дні	Приєднання бактеріальної інфекції, кількість тварин
		25 %	50 %	75 %	100 %			
Амід I	5	2	3	0	0	5	9-10	1 з 5-ти
Препарат порівняння	5	1	2	2	0	5	12-13	3 з 5-ти
Контрольна група (без лікування)	5	0	1	3	1	3	14-15	2 з 3-х, які вижили

одного – на 3-тю, а у другого – на 5-ту добу захворювання), розвинувся менінгоенцефаліт, який призвів до загибелі тварин.

Стихання клінічної симптоматики і початок епітелізації рогівки при лікуванні амідом I наставали на 2-3 дні раніше, ніж у випадку паракабетоксіфенілаконітиміду, і на 4-5 днів раніше, ніж у контрольній групі. Крім того, у двох останніх групах частіше розвивалась вторинна (бактеріальна) інфекція, що уразила 3 з 5

тварин у групі з використанням препарату порівняння і 2 з 3 кроликів, які вижили в контролі. У групі, де лікування проводили амідом I, вторинну інфекцію у вигляді серозно-гнійних виділень з ока було зафіксовано лише в 1 з 5 кроликів.

Результати лабораторного дослідження інфекційного матеріалу в піддослідних групах тварин у динаміці розвитку захворювання наведено в таблиці 2.

Таблиця 2 – Результати імуноферментного дослідження інфекційного матеріалу піддослідних груп кроликів з офтальмогерпесом в динаміці захворювання (в показниках ОГ)

Варіанти досліду	Оптична густина (ОГ) інфекційного матеріалу в динаміці по днях після інфікування							
	1	2	3	5	8	10	12	14
Амід I	0,308	0,482	0,491	0,393	0,303	0,243	0,242	0,242
Препарат порівняння	0,310	0,489	0,506	0,508	0,428	0,335	0,266	0,249
Контрольна група (без лікування)	0,311	0,491	0,515	0,538	0,487	0,442	0,382	0,270

Примітки:

1. ОГ неінфікованих тварин = 0,241 о.о.
2. Наведені середні показники ОГ.

Аналіз наведених у таблиці 2 даних показав, що в усіх трьох групах тварин на 2-гу і 3-тю доби захворювання показники виявлення герпесвірусного антигену, зокрема ОГ інфекційного матеріалу, продовжували зростати, що збігалось з наростанням клінічної симптоматики (збільшення набряку, сльозовиділення, розширення площі ураження рогівки ока). В групі піддослідних тварин, яких лікували 0,25 % водним розчином амідю I, вже на 4-5-й день захворювання на фоні стихання клінічних симптомів відмічено помітне зниження лабораторних показників (ОГ) виявлення ВПГ-антигену. На 10-й день захворювання показник ОГ в цій групі знизився до 0,243 о.о. і практично зрівнявся із середніми даними ОГ у неінфікованих тварин (0,241), що свідчить про лабораторну нормалізацію інфекційного процесу.

При застосуванні 6 % суспензії паракабетоксіфенілаконітиміду тільки на 6-7-й день

захворювання з'являється тенденція до зниження лабораторних показників виявлення ВПГ-антигену, а їх повна нормалізація настає на 2-3 доби пізніше, ніж у випадку амідю I.

В контрольній групі кількість ВПГ-антигену в інфекційному матеріалі збільшувалась до високих цифр протягом 7 днів, перевищуючи середній показник ОГ неінфікованих тварин більше ніж у 2 рази. На 10-12-й дні лабораторні показники почали нормалізуватися, хоча все ще значно перевищували норму, до якої вдалося повернутися тільки на 15-й день після початку захворювання.

Таким чином, використання з лікувальною метою 0,25 % водного розчину 2-дітиламіноетиламіду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-пирідо-[1,2-а]-пиримідин-3-карбонової кислоти (I) показало суттєвий позитивний ефект на клінічні показники експериментального офтальмогерпесу. Даний засіб проявляє вира-

жену протівірусну активність і в значно меншій дозі суттєво перевищує препарат порівняння пара-кабетоксіфенілаконітимід, що дозволяє значно скоротити термін лікування викликаних ВПГ-1 інфекцій.

**ВИСНОВКИ.** 1. З метою визначення перспектив подальшого практичного застосування

проведено тестування протівірусних властивостей 2-діетиламіноетиламіду 2-гідрокси-9-метил-4-оксо-4Н-піридо-[1,2-а]-піримідин-3-карбонової кислоти на моделі герпетичного кератокон'юнктивіту кроликів.

2. Встановлено значний лікувальний ефект досліджуваної сполуки, на підставі чого її рекомендовано як потенційний протигерпесний засіб.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Белозеров Е.С., Буланьков Ю.И. Болезни герпесвирусной группы. – Элиста: АПП Джангар, 2005. – С. 64.

2. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – Харьков: Торсинг, 1997. – 2. – С. 354-355.

3. Пат. 22189 А Україна, МКВ А61К31/165, С08F22/38. п-Карбетоксіфенілаконітимід, який виявляє активність відносно вірусу везикулярного стоматиту та вірусу простого герпесу / А.В. Мартинов, М.В. Смелянська, О.О. Пархоменко та ін. – Опубл. 30.06.1998. – Бюл. № 3.

4. <http://www.ibmc.msk.ru/PASS/> або <http://ibmc.p450.ru/PASS/>

5. Ukrainets I.V., Bereznyakova N.L., Tugaibei I.A. 4-Hydroxy-2-quinolones. 143. Synthesis, structure and antiviral activity of 2-hydroxy-4-oxo-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidine-3-carboxylic acid N-R-amides // Chem. Heterocycl. Comp. – 2008. – 44, № 1. – P. 50-63.

6. Whitley R.J., Kimberlin D.W. Herpes simplex encephalitis: children and adolescents // Semin. Pediatr. Infect. Dis. – 2005. – 16, № 1. – P. 17-23.

## ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОГЕРПЕСНОЙ АКТИВНОСТИ 2-ДИЭТИЛАМИНОЭТИЛАМИДА 2-ГИДРОКСИ-9-МЕТИЛ-4-ОКСО-4Н-ПИРИДО-[1,2-А]-ПИРИМИДИН-3-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ОПЫТАХ IN VIVO

Н.Л. Березнякова, И.В. Украинец, И.А. Тугайбей, О.В. Горохова  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

#### Резюме

Экспериментально подтверждена высокая активность 2-диэтиламиноэтиламида 2-гидрокси-9-метил-4-оксо-4Н-пиридо-[1,2-а]-пиримидин-3-карбоновой кислоты по отношению к вирусу простого герпеса I типа в опытах *in vivo*, что открывает перспективы создания на основе указанного соединения нового средства, пригодного для борьбы с герпесными инфекциями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амиды, герпес, 2-гидрокси-4-оксо-4Н-пиридо-[1,2-а]-пиримидины, протівовірусна активність.

## STUDY OF ANTHERPES ACTIVITY OF 2-DIETHYLAMINOETHYLAMIDE OF 2-HYDROXY-9-METHYL-4-OXO-4H-PYRIDO-[1,2-A]-PYRIMIDINE-3-CARBOXYLIC ACID IN EXPERIMENTS IN VIVO

N.L. Bereznyakova, I.V. Ukrainets, I.A. Tugaibei, O.V. Gorokhova  
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

#### Summary

High of 2-diethylaminoethylamide effectiveness of 2-hydroxy-9-methyl-4-oxo-4H-pyrido-[1,2-a]pyrimidine-3-carboxylic acid in relation to herpes virus of type I in the experiments *in vivo* has been proven experimentally. It opens the perspectives of creating a new drug on the basis of the given compound, which is suitable for treating herpes infections.

KEY WORDS: amides, herpes, 2-hydroxy-4-oxo-4H-pyrido-[1,2-a]pyrimidines, antiviral activity.

Отримано 26.01.2009 р.

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

## ЗМІНА ПОКАЗНИКІВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В РОТОВІЙ РІДИНІ ПРАЦІВНИКІВ ЦЕМЕНТНОГО ВИРОБНИЦТВА, ХВОРИХ НА ГЕНЕРАЛІЗОВАНИЙ ПАРОДОНТИТ

Ю.М. Федевич, Н.Н. Бандрівська

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

*У зв'язку з несприятливою дією ксенобіотиків цементного виробництва на органи ротової порожнини, були вивчені показники перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і рівень активності ензимів системи антиоксидантного захисту (АОЗ) в ротовій рідині робітників. Виявлено підвищення процесів ПОЛ і активності ензимів – супероксиддисмутази і каталази у працівників цементного виробництва. Із зростанням ступеня тяжкості генералізованого пародонтиту відмічено зниження рівня активності ензимів системи АОЗ, що свідчить про їх вищу чутливість до впливу патологічного процесу в пародонті й, очевидно, пошкоджувальної дії чинників виробничого середовища.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** генералізований пародонтит, перекисне окиснення ліпідів, система антиоксидантного захисту.

ВСТУП. На сьогодні чисельними дослідженнями встановлено, що порушення перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) є пусковим механізмом у виникненні багатьох дистрофічно-запальних процесів, у тому числі захворювань пародонта [1, 2, 6].

У звичайних умовах процеси вільнорадикального окиснення ліпідів регулюються системою антиоксидантного захисту (АОЗ). При її порушенні у тканинах лавиноподібно збільшується нагромадження продуктів ПОЛ. При цьому розвивається синдром пероксидації, який лежить в основі пошкодження клітинних мембран. Зростання вмісту в організмі людини продуктів ПОЛ спостерігається при різних станах, а також під впливом патогенних екзогенних чинників [1, 2, 4, 8]. З огляду на участь вільнорадикальних механізмів у генезі виникнення пародонтиту, метою наших досліджень було вивчення системи ПОЛ–АОЗ у пацієнтів з генералізованим пародонтитом (ГП), які працюють в умовах цементного виробництва (ЦВ).

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Для досліджень брали зразки ротової рідини 120 осіб віком 20-50 років, стаж роботи яких на цементному виробництві складав 5-15 років. Обстежених осіб поділили на дві групи: 1-ша (контрольна) – 51 особа, що не контактувала зі шкідливими

чинниками (ШЧ) ЦВ, з яких 20 осіб мали інтактний пародонт, 31 особа була хвора на ГП початкового, I, II, III ступенів тяжкості; 2-га (основна) – 69 працівників технологічних ділянок цементного заводу, хворих на ГП початкового, I, II, III ступенів тяжкості.

Ротову рідину для біологічного дослідження брали вранці натщесерце. Пробу центрифугували при 3000 об./хв упродовж 15 хв. Для досліджень використовували супернатант, інтенсивність ПОЛ оцінювали за вмістом дієнових кон'югатів (ДК) та малонового діальдегіду (МДА), ланку системи АОЗ досліджували за зміною активності ензимів – супероксиддисмутази і каталази. Вміст первинних продуктів ПОЛ визначали: ДК – за методом В.Б. Гаврилова та М.І. Мишкорудної [3] на СФ 46, МДА – за реакцією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК), активність каталази (КА) – за методом М.А. Королюка [5], супероксиддисмутази (СОД) – за методом В.А. Костюка [7].

Клінічне обстеження було загальноприйнятим. При встановленні діагнозу використовували класифікацію захворювань пародонта за М.Ф. Данилевським (1994).

Статистичну обробку отриманих результатів дослідження проводили на комп'ютері Pentium III MMX з використанням програми Microsoft-Excel 7,0 для Windows 98, вона включала визначення середніх значень параметрів (М), похибки середньої ( $\pm m$ ), коефіцієнта достовірності різниць (Р).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Проведені дослідження свідчать про те, що в осіб основної групи, які контактували з цементним пилом, у ротовій рідині зростає вміст продуктів ПОЛ – МДА та ДК стосовно контрольної групи (табл. 1).

У результаті порівняльного аналізу вмісту МДА в ротовій рідині хворих основної групи з ГП I-III ступенів тяжкості та показника осіб із здоровим пародонтом з'ясовано, що вміст ТБК-активних продуктів вищий у хворих і дорівнював при ГП початкового ступеня (26,95±1,32) мкмоль/мл; при ГП I ступеня – (34,40±1,18) мкмоль/мл; при ГП II ступеня – (39,16±1,18) мкмоль/мл; ГП III ступеня – (45,10±1,32)

мкмоль/мл. В осіб контрольної групи з інтактним пародонтом показник ТБК-активних продуктів становив (20,31±1,13) мкмоль /мл. Аналогічні зміни вмісту МДА в ротовій рідині спостерігались у хворих на ГП контрольної групи: при ГП початкового ступеня – (22,70±1,25) мкмоль/мл; при ГП I ступеня – (25,38±1,33) мкмоль/мл; при ГП II ступеня – (29,02±1,28) мкмоль/мл; при ГП III ступеня – (35,64±1,54) мкмоль/мл. Вміст МДА в ротовій рідині хворих основної групи з ГП I-III ступенів тяжкості статистично вірогідно переважав над відповідним показником пацієнтів контрольної групи ( $p < 0,05$ ).

Таблиця 1 – Показники ПОЛ та АОЗ у ротовій рідині працівників ЦВ, хворих на генералізований пародонтит ( $M \pm m$ )

Групи обстежених	Стан пародонта	Кількість досліджень	Показники			
			ДК (од. $E_{233}$ /мл)	ТБК-активні продукти (мкмоль МДА/мл)	Супероксид-дисмутаза (од. акт./мл·хв)	Каталаза (нмоль $H_2O_2$ /мл·год)
Контрольна група (не контактують з ШЧ ЦВ)	Інтактний пародонт	20	0,308±1,13	20,31±1,13	6,65±0,21	65,02±2,81
	ГП початкового ступеня	9	0,355±0,020	22,70±1,25	6,92±0,23	68,98±3,48
	ГП I ступеня	8	0,432±0,030	25,38±1,33	7,25±0,24	71,81±2,86
	ГП II ступеня	7	0,450±0,022	29,02±1,28	6,62±0,24	64,89±2,54
	ГП III ступеня	7	0,511±0,019	35,64±1,54	5,86±0,21	50,97±1,81
Основна група (працівники ЦВ)	ГП початкового ступеня	16	0,396±0,018 $p < 0,3$ ; $p_1 < 0,05$	26,95±1,32 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,7$	6,64±0,16 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,05$	61,22±3,12 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,05$
	ГП I ступеня	18	0,497±0,021 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,01$	34,40±1,18 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,01$	7,68±0,24 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,001$	67,21±2,48 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,1$
	ГП II ступеня	17	0,598±0,013 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,001$	39,16±1,18 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,001$	7,43±0,24 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,05$	40,01±2,13 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,001$
	ГП III ступеня	18	0,622±0,022 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,001$	45,10±1,32 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,001$	5,31±0,12 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,01$	35,02±1,68 $p < 0,05$ ; $p_1 < 0,001$

Примітка.  $p$  – достовірність різниці між показниками основної та контрольної груп (інтактний пародонт);  $p_1$  – достовірність різниці між показниками хворих на генералізований пародонтит основної групи і групи контролю з ГП.

Концентрація ДК у ротовій рідині хворих основної групи була вищою ((0,396±0,018) од  $E_{233}$ /мл), ніж в осіб з інтактним пародонтом ((0,309±1,13) од  $E_{233}$ /мл), вже при ГП початкового ступеня тяжкості. Найбільш виражене зростання вмісту ДК зафіксовано у пацієнтів з ГП III ступеня тяжкості – (0,622±0,022) од  $E_{233}$ /мл.

Аналогічними були зміни концентрації ДК у ротовій рідині хворих на ГП контрольної групи.

Максимальні значення вмісту ДК виявлено у пацієнтів з ГП III ступеня тяжкості – (0,511±0,019) од  $E_{233}$ /мл. Концентрація ДК у хворих основної групи з ГП I-III ступенів тяжкості була вірогідно вищою від аналогічного показника пацієнтів контрольної групи ( $p < 0,05$ ).

Таким чином, отримані дані вказують на підвищення вмісту продуктів ПОЛ у ротовій рідині зі збільшенням ступеня тяжкості запаль-

ного процесу в пародонті обстежених осіб, хворих на ГП. При цьому вміст продуктів ПОЛ у хворих основної групи був вірогідно більшим, ніж у хворих контрольної групи, що свідчить про глибше ураження тканин пародонта на тлі негативного впливу шкідливих чинників виробництва [3, 4, 9].

На відміну від змін показників інтенсивності ПОЛ у хворих на ГП різного ступеня тяжкості, відхилення активності досліджуваних ферментів АОЗ у них виявлялися неоднотипно (див. табл. 1). У пацієнтів основної групи з ГП констатовано зростання активності СОД-ферменту, що лімітує утворення супероксид-радикала – однієї з первинних активних форм кисню (АФК). Відповідно, активність СОД у ротовій рідині хворих основної групи з ГП перевищувала аналогічний показник осіб групи з інтактним пародонтом: при ГП I ступеня –  $(7,68 \pm 0,24)$  од.акт./мл·хв, при ГП II ступеня –  $(7,43 \pm 0,24)$  од.акт./мл·хв. У хворих основної групи з ГП III ступеня тяжкості активність СОД була нижчою ( $(5,31 \pm 0,12)$  од.акт./мл·хв), ніж в осіб з інтактним пародонтом ( $(6,65 \pm 0,21)$  од.акт./мл·хв,  $p < 0,05$ ).

У хворих контрольної групи виявлено аналогічні зміни активності СОД: підвищення при ГП початкового-II ступенів і зниження при ГП III ступеня тяжкості порівняно з показниками осіб з інтактним пародонтом.

Збільшення активності СОД у ротовій рідині хворих на ГП є відображенням мобілізації фізіологічних компенсаторних систем організму у відповідь на надмірне продукування супероксид-аніона як первинної ланки в ланцюгу вільнорадикальних перетворень. При ГП початкового та I ступенів тяжкості міра мобілізації СОД у відсотковому відношенні відповідає ступеню ініціації вільнорадикальних пероксидних реакцій. Зважаючи на роль фізіологічних концентрацій активних форм кисню, органічних пероксидів та пероксидних реакцій у підтримці захисних гомеостатичних реакцій, інтенсивність системи ПОЛ–АОЗ і співвідношення у ній на цих стадіях ГП можна вважати мобілізаційними та збалансованими. Однак у хворих основної групи підвищення активності СОД при ГП початкового-II ступенів тяжкості було помірнішим, ніж у пацієнтів контрольної групи ( $p < 0,05$ ), а зниження при ГП III ступеня тяжкості – більш вираженим ( $p < 0,05$ ).

Активність каталази було виявлено лише в основній групі хворих на ГП I ступеня тяжкості –  $(67,21 \pm 2,48)$  нмоль  $H_2O_2$ /мл·год по-

рівняно з показниками осіб контрольної групи з інтактним пародонтом –  $(65,02 \pm 2,81)$  нмоль  $H_2O_2$ /мл·год. Із зростанням ступеня тяжкості ГП у хворих обох груп констатували прогресуюче зниження активності цього ферменту, яке корелювало зі збільшенням вираження дистрофічно-запального процесу в пародонті. При цьому у хворих основної групи зниження активності каталази було більш вираженим, ніж в осіб контрольної групи; при ГП I ступеня тяжкості активність каталази становила  $(67,21 \pm 3,12)$  нмоль  $H_2O_2$ /мл·год ( $p < 0,05$ ); ГП II ступеня –  $(40,01 \pm 2,13)$  нмоль  $H_2O_2$ /мл·год ( $p < 0,05$ ); ГП III ступеня –  $(35,02 \pm 1,68)$  нмоль  $H_2O_2$ /мл·год ( $p < 0,05$ ).

Таким чином, у наших дослідженнях показано, що каталаза чутливіша до уражувального впливу патологічного процесу в пародонті та, ймовірно, до впливу екзогенних чинників. Даний фермент за фізіологічних умов може не лише проявляти специфічну каталазну активність, а й вступати в пероксидазну реакцію, підтримуючи цим пул фізіологічних антиокиснювальних захисних ферментативних систем. Ферментативний захист при розвитку дистрофічно-запальних змін у пародонті великою мірою реалізується СОД, яка, елімінуючи  $O_2$  (супероксид-радикал), може не тільки обмежувати інтенсивність вільнорадикальних та пероксидних перетворень, а й оптимізувати використання кисню в оксидазних та оксигеназних реакціях [8, 9]. Останнє створює умови для аеробного енергозабезпечення, яке визначає перебіг відновних регенераторних процесів у тканині пародонта.

**ВИСНОВКИ.** 1. Отримані результати свідчать про необхідність проведення систематичних профілактичних обстежень працівників цементного виробництва та враховування при цьому зростання індексів ПОЛ.

2. Посилення процесів ПОЛ у ротовій рідині хворих на ГП корелює зі ступенем тяжкості запального процесу.

3. При ГП антиоксидантна система (переважно СОД) реагує на інтенсифікацію вільнорадикальних процесів двофазно: активацією при початкових патологічних змінах у пародонті та зниженням активності при прогресуванні захворювання.

4. За умов ГП на тлі впливу шкідливих виробничих чинників виявляють суттєвіші зміни у співвідношенні ПОЛ–АОЗ, що необхідно брати до уваги під час планування лікувально-профілактичних заходів.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Белолицкая Г.Ф. Возможности антиоксидантной коррекции перекисного окисления липидов при заболеваниях пародонта разной тяжести // Современная стоматология. – 2000. – № 1. – С. 38-40.
2. Воскресенский О.П., Левицкий А.П. Роль перекисного окисления в патогенезе пародонтита // Стоматология. – 1991. – № 4. – С. 5-10.
3. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33-35.
4. Деньга О.В., Жук Д.Д., Макаренко О.А. Клинико-лабораторная оценка эффективности комплекса адаптогенов и физиологических факторов на биохимические параметры ротовой жидкости у больных хроническим катаральным гингивитом // Вісник стоматології. – 2004. – № 4. – С. 62-66.
5. Королюк М.А. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1998. – № 1. – С. 16-19.
6. Косенко К.Н., Седлецкая А.А., Терешина Т.П. Показатели свободнорадикального окисления липидов и антиоксидантной защиты в ротовой жидкости больных генерализованным пародонтитом разных возрастных групп // Вісник стоматології. – 2004. – № 4. – С. 27-30.
7. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопр. мед. химии. – 1990. – № 2. – С. 88-91.
8. Скляр О.Я., Журомський В.С. Роль вітамінів Е та С в антиоксидантних процесах органів травної системи // Мед. хімія. – 2006. – 8, № 3. – С. 115-117.
9. Yokalp O., Yulle K., Sulat O. The effects of methidathion on liver: role of vitamins E and C // Toxicol Ind. Health. – 2003. – 19, № 2-6. – P. 63-67.

## ИЗМЕНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ РАБОТНИКОВ ЦЕМЕНТНОГО ПРОИЗВОДСТВА, БОЛЬНЫХ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ

Ю.М. Федевич, Н.Н. Бандривская

ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО

#### Резюме

В связи с неблагоприятным воздействием ксенобиотиков цементного производства на органы ротовой полости, были изучены показатели перекисного окисления липидов (ПОЛ) и уровень активности энзимов системы антиоксидантной защиты (АОЗ) в ротовой жидкости рабочих. Выявлено повышение процессов ПОЛ и активности энзимов – супероксиддисмутазы и каталазы у работников цементного производства. С возрастанием степени тяжести генерализованного пародонтита отмечено снижение уровня активности энзимов системы АОЗ, что свидетельствует об их более высокой чувствительности к влиянию патологического процесса в пародонте и, очевидно, повреждающему воздействию факторов производственной среды.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: генерализованный пародонтит, перекисное окисление липидов, система антиоксидантной защиты.

## CHANGE OF INDEXES OF LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANT DEFENCE IN THE ORAL LIQUID OF WORKERS OF CEMENT PRODUCTION, SUFFERING FROM GENERALIZED PARODONTITIS

Yu.M. Fedevych, N.N. Bandrivska

LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY DANYLO HALYTSKY

#### Summary

In connection with the unfavorable effect of xenobiotics of cement production on organs of oral cavity the indexes of lipid peroxidation (PLO) and level of activity of enzymes of the system of antioxidant defence (AOD) were studied in the oral liquid of workers. The increase of PLO processes and activity of enzymes – malondialdehyde and superoxiddismutase and catalase at the workers of cement production was revealed. With growth of severity degree of generalized parodontitis the decline of level of enzyme activity was marked, that testifies to their higher sensitiveness to influence of pathological process in parodontium and, obviously, to damaging influence of production environment factors.

KEY WORDS: generalized parodontitis, lipid peroxidation, antioxidant defence system.

Отримано 17.11.2008 р.

Адреса для листування: Н.Н. Бандрівська, вул. Дністерська, 16 а, кв. 17, Львів, 79010, Україна.



## ВПЛИВ КАРНІТИНУ ХЛОРИДУ НА ПОКАЗНИКИ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ У ТВАРИН З ГОСТРИМ АЛКОГОЛЬНИМ ОТРУЄННЯМ НА ТЛІ ТРИВАЛОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ КАДМІЮ ХЛОРИДОМ ТА СВИНЦЮ АЦЕТАТОМ

**І.Р. Бекус**

*ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО*

*Досліджено вплив карнітину хлориду на показники ліпідного обміну за комбінованої дії етанолу і солей кадмію та свинцю. Показано, що інтоксикація етанолом на тлі тривалого введення кадмію хлориду і свинцю ацетату супроводжується порушенням ліпідного спектра плазми крові та печінки, активацією процесів ліпідної пероксидації. Застосування карнітину хлориду сприяло нормалізації концентрації загальних ліпідів, фосфоліпідів та відновленню коефіцієнтів ліпід/білок і фосфоліпід/загальні ліпіди. Позитивних змін зазнавали також показники ліпопероксидації – гідропероксиди ліпідів, дієнові кон'югати, ТБК-активні продукти, основи Шифа. Зроблено висновок про позитивний вплив карнітину хлориду на показники ліпідного обміну за гострого отруєння етанолом на фоні тривалого введення кадмію хлориду і свинцю ацетату.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** гостре алкогольне отруєння, хронічна інтоксикація солями кадмію і свинцю, загальні ліпіди, фосфоліпіди, ТБК-активні продукти, основи Шифа, дієнові кон'югати.

ВСТУП. Зловживання алкоголем – одна з найсерйозніших проблем сучасності, що загрожуює безпеці особи, суспільства і держави [4, 10]. Гостра або хронічна дія етилового спирту супроводжується порушеннями функціонування органів і тканин та є однією з причин скорочення тривалості життя [14]. За даними ВООЗ, алкоголізм як причина смерті займає у світі за частотою третє місце, поступаючись тільки злякисним новоутворенням і захворюванням серцево-судинної системи [4].

Для виявлення особливостей перебігу гострого алкогольного ураження велике значення мають дослідження впливу етилового спирту в комбінації з іншими токсичними агентами. Серед останніх провідна роль належить важким металам, особливо солям кадмію та свинцю. Ці метали належать до другого класу небезпечності й характеризуються не лише великою міграційною здатністю (у системі ґрунт-рослина, тварина-людина), а й високою кумулятивністю. Реальна загроза алкогольного отруєння на фоні тривалого надходження в організм важких металів надає вивченню їх комбінованої дії особливої актуальності [5, 6, 8, 12, 16].

Поряд із великою кількістю досліджень, що стосуються механізмів біологічної дії алкоголю та солей важких металів, у доступній нам літературі практично немає робіт, в яких би вивчались порушення обміну ліпідів, що виника-

ють при отруєнні етиловим спиртом за умов тривалої дії солей кадмію і свинцю. Це значно ускладнює цілісне сприйняття проблеми, необхідно для аналізу метаболічних змін, що лежать в основі клінічних проявів алкогольної інтоксикації, оскільки ліпіди займають центральне місце у процесах життєдіяльності організму, входячи до складу клітинних та міжклітинних структур. Крім того, виконуючи ряд унікальних функцій, ліпіди визначають не лише мікро- і макроструктуру окремих субклітинних утворів, специфіку клітин та органів, але й динамічний стан між організмом і навколишнім середовищем [1, 3, 7].

За дії цих шкідливих чинників в організмі інтенсифікуються окиснювальні процеси, порушується збалансованість антиоксидантної та прооксидантної систем, що спричиняє розвиток так званого оксидативного стресу. Посилення вільнорадикальних процесів є однією з патогенетичних ланок токсичних уражень, перебіг яких супроводжується зниженням активності компонентів антиоксидантної системи [2, 9, 17].

З огляду на вищесказане та дані літератури про провідну роль активації вільнорадикального окиснення в перебігу токсичних уражень ксенобіотиками, важливого значення набуває пошук нових середників з антиоксидантними та мембраностабілізуювальними властивостями [12, 13, 15]. Саме це спонукало нас до проведення досліджень. Серед низки таких середників ми звернули увагу на карні-

тин, який, за фармакологічною класифікацією, віднесений до засобів, що стимулюють метаболічні процеси. Його роль зумовлена тим, що він акцептує ацильні групи від позамітохондріального ацил-КоА з утворенням ацилкарнітину, який проникає через внутрішню мітохондріальну мембрану, де передає ацильну групу на внутрішньомітохондріальний КоА з подальшим її окисненням. Взаємодія карнітину з клітинним пулом коензиму А нормалізує метаболізм і функцію клітин в умовах накопичення вільних жирних кислот, що має місце за різних патологічних станів, у тому числі екзогенних інтоксикацій. Таким чином, коригувальна дія карнітину хлориду реалізується на декількох напрямках – він може безпосередньо взаємодіяти з вільнорадикальними продуктами та гідропероксидами, активувати окиснення поліненасичених жирних кислот, знижуючи тим самим концентрацію субстратів вільнорадикальних реакцій, покращувати транспорт ліпідів через клітинну мембрану, активувати енергетичні процеси в клітині та стимулювати біосинтез білка [13, 15].

Зважаючи на це, метою наших досліджень стало встановлення коригувального впливу карнітину хлориду на показники ліпідного обміну за комбінованої дії етилового спирту, свинцю ацетату і кадмію хлориду.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди проводили на білих безпородних щурах-самцях масою 170-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. У роботі використовували солі важких металів – свинцю ацетат в дозі 11 мг/кг і кадмію хлорид в дозі 3,3 мг/кг маси тіла, що становить, відповідно, 0,05 LD<sub>50</sub> [6], які вводили внутрішньошлунково щоденно протягом 30 днів. Після останнього введення (на 31 день) тваринам одноразово внутрішньошлунково вводили етанол, який попередньо розводили в 0,9 % розчині натрію хлориду, з розрахунку 12,5 мл 40 % розчину етанолу на 1 кг маси тіла щура [8]. Як коригувальний чинник нами використано 2 % водний розчин карнітину хлориду, який вводили внутрішньочеревно з розрахунку 50 мг/кг маси протягом усього експерименту [6, 13].

Піддослідні тварини були поділені на 4 групи: 1-ша – інтактні, 2-га – уражені етанолом, 3-тя – уражені етанолом на фоні 30-денного введення кадмію хлориду і свинцю ацетату, 4-та – уражені етанолом на фоні 30-денного введення кадмію хлориду і свинцю ацетату, яким проводили корекцію карнітину хлоридом. Щурів декапітували під тіопенталовим наркозом на 3-тю, 5-ту і 7-му доби після введення

етанолу. Як контроль використовували інтактних статевозрілих тварин. Для дослідження брали плазму крові й гомогенат печінки.

Для вивчення ліпідного обміну використовували такі методи: концентрацію загальних ліпідів визначали за допомогою набору Лахема, фосфоліпідів – за утворенням гідрофобного комплексу з феротіоціанатом амонію [4]. Вираховували також співвідношення ліпід/білок, фосфоліпід/загальні ліпід та коефіцієнт атерогенності. Про активність процесів пероксидного окиснення ліпідів на проміжних етапах судили за вмістом гідропероксидів ліпідів у плазмі крові й тканині печінки [7], про стан прикінцевих та кінцевих етапів ланцюга ліпопероксидації свідчив вміст у тканинах малонового діальдегіду [4] та основ Шифа [13]. Отримані цифрові дані обробляли методом варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Встановлено, що за умов гострого отруєння етанолом на фоні 30-денного введення кадмію хлориду і свинцю ацетату значно змінювався ліпідний спектр плазми крові та печінки досліджуваних щурів (табл. 1). Це проявлялося достовірним підвищенням концентрації загальних ліпідів, зменшенням фракції фосфоліпідів, що спричинило зниження коефіцієнта фосфоліпід/загальні ліпід у плазмі й печінці уражених тварин. Достовірно зростає показник співвідношення ліпід/білок у плазмі крові та печінці.

Введення карнітину хлориду призвело до достовірного зниження вмісту загальних ліпідів порівняно з ураженими щурами. Як видно з таблиці 1, у плазмі крові на 3-тю і 5-ту доби цей показник становив 90 % від рівня уражених тварин, а на 7-му – 92 %.

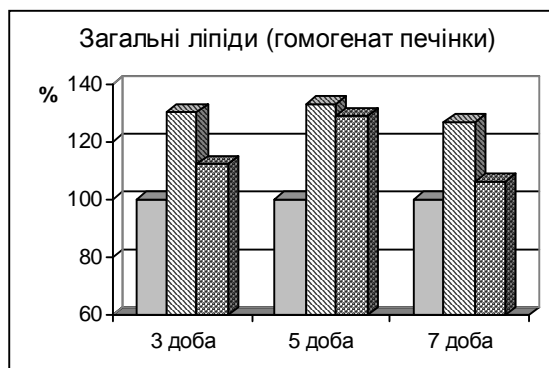
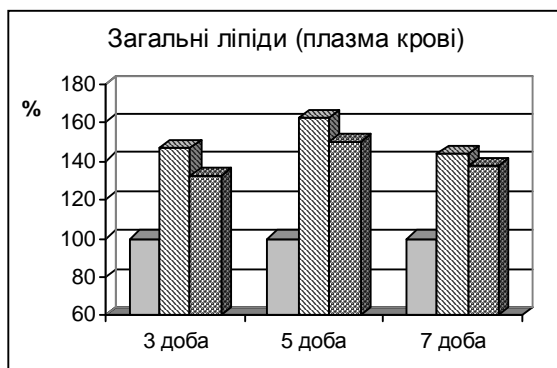
Таку ж залежність ми спостерігали і в печінці. Порівняно з показниками уражених тварин вміст загальних ліпідів у щурів, яким вводили карнітину хлорид, на 3-тю, 5-ту і 7-му доби був меншим в 1,2 та 1,3 раза відповідно (рис. 1).

Особливої уваги заслуговує обчислення співвідношення ліпід/білок. У печінці на 3-тю добу експерименту цей показник був достовірно меншим від рівня уражених тварин і становив 84 %, на 5-ту – 67 %, а на 7-му – 85 %.

Карнітину хлорид проявив позитивний вплив на вміст фосфоліпідів у плазмі крові й печінці щурів. Так, на 3-тю добу показник становив 106 %, на 5-ту і 7-му – 105 та 103 % порівняно з аналогічним показником у групі уражених тварин. Деяку іншу закономірність ми спостерігали у печінці. На 3-тю добу вміст фос

фоліпідів зменшився і, порівняно з ураженими щурами, складав 96 %, на 5-ту – 88 %, а на

7-му зріс і досягнув 125 % від рівня уражених тварин, наближаючись до норми.



■ – інтактні тварини  
 ▨ – уражені солями кадмію, свинцю та етанолом  
 ▩ – уражені солями кадмію, свинцю та етанолом за корекції карнітину хлоридом

Рис. 1. Вміст загальних ліпідів в уражених тварин та за корекції карнітину хлоридом.

Таблиця 1 – Показники ліпідного обміну в крові та печінці щурів з гострим алкогольним отруєнням на фоні тривалого введення кадмію хлориду та свинцю ацетату (M±m)

Інтактні тварини	Група тварин					
	Уражені етанолом, кадмію хлоридом та свинцю ацетатом			Корекція карнітину хлоридом		
	3 доба n=6	5 доба n=6	7 доба n=6	3 доба n=6	5 доба n=6	7 доба n=6
Загальні ліпіди, плазма крові, г/л						
5,22±1,03	7,68±0,61 p <sub>1</sub> <0,001	8,44±0,08 p <sub>1</sub> <0,001	7,71±0,69 p <sub>1</sub> <0,001	6,94±0,87 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	7,62±1,06 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,01	7,13±1,03 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,01
Загальні ліпіди, печінка, г/кг						
64,3±0,1	78,5±0,2 p <sub>1</sub> <0,001	85,1±0,4 p <sub>1</sub> <0,001	65,4±0,3 p <sub>1</sub> <0,001	72,7±1,45 p <sub>1</sub> <0,01 p <sub>2</sub> <0,01	73,5±1,44 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001	71,0±0,33 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
Загальний білок, печінка, г/кг						
155,9±7,6	111,3±6,1 p <sub>1</sub> <0,01	103,5±5,3 p <sub>1</sub> <0,01	118,4±7,6 p <sub>1</sub> <0,01	123,7±6,9 p <sub>1</sub> <0,01 p <sub>2</sub> <0,01	135,4±7,1 p <sub>1</sub> <0,01 p <sub>2</sub> <0,01	151,3±7,3 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,01
Фосфоліпіди, плазма крові, г/л						
1,68±0,08	1,48±0,17 p <sub>1</sub> >0,05	1,51±0,10 p <sub>1</sub> >0,05	1,58±0,09 p <sub>1</sub> >0,05	1,57±0,02 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05	1,59±0,04 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,05	1,63±0,02 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05
Фосфоліпіди, печінка, г/кг						
47,8±0,7	51,6±0,3 p <sub>1</sub> >0,05	55,1±0,9 p <sub>1</sub> <0,05	36,0±0,9 p <sub>1</sub> <0,05	49,8±0,3 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> >0,05	48,6±0,4 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,01	44,9±0,2 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,01
Співвідношення фосфоліпіди/загальні ліпіди, плазма крові, %						
32,1±0,9	19,3±0,6 p <sub>1</sub> <0,001	17,9±0,5 p <sub>1</sub> <0,001	21,1±0,4 p <sub>1</sub> <0,001	22,6±0,05 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,05	19,8±0,04 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> >0,05	22,9±0,06 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> >0,05
Співвідношення фосфоліпіди/загальні ліпіди, печінка, %						
74,4±2,8	65,7±1,4 p <sub>1</sub> <0,05	64,7±1,6 p <sub>1</sub> <0,01	60,0±1,1 p <sub>1</sub> <0,001	68,5±2,1 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05	66,1±1,8 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05	63,2±1,2 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> >0,05
Співвідношення ліпід/білок, печінка, г/кг						
0,47±0,04	0,70±0,06 p <sub>1</sub> <0,001	0,82±0,07 p <sub>1</sub> <0,001	0,55±0,04 p <sub>1</sub> <0,01	0,59±0,05 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,01	0,55±0,04 p <sub>1</sub> <0,05 p <sub>2</sub> <0,01	0,47±0,03 p <sub>1</sub> >0,05 p <sub>2</sub> <0,05

Примітки:

1. p<sub>1</sub> – різниця достовірна порівняно з інтактними тваринами.
2. p<sub>2</sub> – різниця достовірна порівняно з ураженими тваринами.

При дослідженні співвідношення фосфоліпідів/загальні ліпіди нами відмічені такі результати: у печінці протягом усього терміну експерименту спостерігалась тенденція до зростання даного показника, однак зміни були недостовірними. У плазмі крові зафіксовано достовірне його підвищення на 3-тю добу, а в наступні терміни експерименту зростання було недостовірним.

Наступним етапом наших досліджень було вивчення впливу карнітину хлориду на інтенсивність процесів ліпідної пероксидації *in vivo*. З наведених у таблиці 2 результатів видно, що середник знижував інтенсивність переокиснення ліпідів, однак ефективність його була неоднаковою в плазмі крові й печінці у різні терміни дослідження. На 3-тю добу експерименту після введення карнітину хлориду

Таблиця 2 – Показники ліпідної пероксидації у плазмі крові та печінці щурів з гострим алкогольним отруєнням на тлі інтоксикації кадмію хлоридом та свинцю ацетатом і за корекції карнітину хлоридом ( $M \pm m$ )

Інтактні тварини	Група тварин					
	Уражені етанолом, кадмію хлоридом та свинцю ацетатом, 1-ша група			Корекція карнітину хлоридом, 2-га група		
	3 доба, n=6	5 доба, n=6	7 доба, n=6	3 доба, n=6	5 доба, n=6	7 доба, n=6
Гідропероксили ліпідів, плазма крові, $10^3$ ум.од./л						
2,01±0,01	5,39±0,08 $p_1 < 0,001$	4,86±0,07 $p_1 < 0,001$	4,69±0,03 $p_1 < 0,001$	4,58±0,24 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	4,05±0,22 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,02$	2,93±0,33 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$
Гідропероксили ліпідів, гомогенат печінки, $10^3$ ум.од./кг						
1,50±0,03	1,64±0,01 $p_1 < 0,01$	1,78±0,02 $p_1 < 0,01$	1,74±0,02 $p_1 < 0,01$	1,63±0,03 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$	1,57±0,08 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,01$	1,59±0,06 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,01$
Дієнові кон'югати, плазма крові, ум.од./мл						
1,06±0,04	1,57±0,003 $p_1 < 0,001$	1,84±0,09 $p_1 < 0,001$	1,47±0,005 $p_1 < 0,001$	1,22±0,19 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	1,36±0,14 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$	1,18±0,20 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$
Дієнові кон'югати, гомогенат печінки, ум.од./кг						
6,16±0,05	8,86±0,02 $p_1 < 0,001$	10,11±0,003 $p_1 < 0,001$	7,56±0,01 $p_1 < 0,001$	7,12±0,24 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	8,31±0,17 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$	6,93±0,44 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$
ТБК-активні продукти, плазма крові, мкмоль/л						
0,96±0,04	1,76±0,008 $p_1 < 0,001$	1,84±0,010 $p_1 < 0,001$	1,50±0,02 $p_1 < 0,001$	1,53±0,10 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$	1,58±0,05 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	1,38±0,18 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$
ТБК-активні продукти, гомогенат печінки, мкмоль/кг						
2,53 ± 0,17	4,65±0,01 $p_1 < 0,001$	4,76±0,005 $p_1 < 0,001$	4,05±0,007 $p_1 < 0,001$	3,80±0,18 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$	4,08±0,15 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	3,35±0,28 $p_1 < 0,02$ $p_2 > 0,05$
Основи Шифа, плазма крові, ум.од./л						
1,37±0,02	1,77±0,06 $p_1 < 0,001$	2,86±0,02 $p_1 < 0,001$	2,50±0,06 $p_1 < 0,001$	1,51±0,304 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,02$	2,17±0,245 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$	2,09±0,352 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
Основи Шифа, гомогенат печінки, ум.од./кг						
2,47±0,10	3,84±0,09 $p_1 < 0,001$	3,99±0,05 $p_1 < 0,001$	3,58±0,02 $p_1 < 0,001$	3,14±0,02 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,02$	3,21±0,03 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$	3,06±0,02 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

в плазмі крові щурів концентрація гідропероксидів ліпідів знизилась в 1,2 раза, а в печінці цей показник перебував майже на рівні уражених тварин. На 5-ту і 7-му доби спостерігалось більш виражене зниження гідропероксидів ліпідів: у плазмі крові – на 17 та 38 % відповідно, у печінці – на 11 і 9 %.

Застосування карнітину хлориду сприяло нормалізації вмісту проміжних продуктів ПОЛ – дієнових кон'югатів. Введення даного середника інгібувало інтенсивність їх нагромадження в печінці та плазмі уражених тварин протягом усіх діб експерименту. На 3-тю добу від початку введення карнітину хлориду вміст

дієнових кон'югатів у плазмі крові уражених тварин знизився на 23 %, на 5-ту – на 26 %, а на 7-му – на 20 % порівняно з тими щурами, яким корекцію не проводили. У печінці цей показник становив, відповідно, 76, 82 та 91 % від рівня уражених тварин.

Вміст ТБК-активних продуктів у плазмі крові також знижувався і становив, відповідно, 87, 85 і 92 % порівняно з щурами, яким корекцію не проводили. Аналогічної спрямованості змін зазнавав цей показник у печінці. На 3-тю добу вміст ТБК-активних продуктів був на 19 % ниж-

чим порівняно з ураженими тваринами, на 5-ту – на 14 %, на 7-му – на 17 %.

Достовірно знижувався також вміст основ Шифа – кінцевих продуктів ліпідної пероксидації.

**ВИСНОВОК.** Застосування карнітину хлориду призводило до нормалізації ліпідного спектра у плазмі й печінці, уражених етанолом на фоні 30-денного введення солей кадмію і свинцю, зниження інтенсивності процесів ліпопереокиснення, однак навіть 7-денне введення не дозволило добитись повного відновлення досліджуваних нами показників.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Абердан А., Каліман П.А., Загайко А.Л., Шаламов Л.В. Вплив хлориду кобальту на ліпідний склад деяких органів щурів // Вісн. пробл. біології і медицини. – 1998. – Вип. 16. – С. 17-23.

2. Абрагамович О.О., Грабовська О.І., Терлецька О.І. та ін. Процеси ліпідної пероксидації при хронічних ураженнях печінки // Мед. хімія. – 2000. – 2, № 1. – С. 5-8.

3. Амосова Е.Н., Лыховский О.И., Брюзгина Т.С. Анализ жирнокислотного состава липидов липопротеидов у больных хроническим гепатитом и циррозом печени // Лікар. справа. – 1999. – № 2. – С. 47-50.

4. Бондаренко В.В., Ханжин Р.В. Анализ структуры острых отравлений алкоголем в Харьковском регионе за последние 13 лет // Актуальні питання та перспективи розвитку судової медицини та криміналістики: Міжнар. наук.-практ. конф. судових медиків та криміналістів. – Х., 2005. – С. 80.

5. Герасименко Т.И., Домнин С.Г., Рослый О.Ф., Федорук А.А. Оценка комбинированного действия бинарных смесей свинец – медь и свинец – цинк // Медицина труда и промышленная экология. – 2001. – № 8. – С. 36-39.

6. Гонський Я.І., Головка Л.Л. Стан захисних систем організму за умов поєднаної дії солей кадмію та свинцю // Мед. хімія. – 2004. – 6, № 1. – С. 10-13.

7. Гонський Я.І., Кліщ І.М., Саюк Н.П. та ін. Вікові особливості ліпідного статусу печінки щурів за умов токсичного ураження печінки тетрахлорметаном // Здобутки клін. та експерим. медицини. – Тернопіль, 1997. – С. 539-542.

8. Демків І.Я., Гонський Я.І., Кліщ І.М. Стан захисних систем організму при комбінованому введенні спирту етилового та солей важких металів // Мед. хімія. – 2007. – 9, № 2. – С. 14-20.

9. Дудник Л.Б., Эрлете Д.Л., Горштейн Э.С. и др. Изменение липидного состава и интенсивности пероксидного окисления липидов митохондрий

и гомогенатов печени крыс при жировом гепатозе, вызванном солянокислым гидразином // Экспериментальное исследование патологических процессов. – Рига: Зинатне, 1988. – С. 19-25.

10. Дунаєв О.В. Особливості змін лівого передсердя у випадках смерті внаслідок хронічного отруєння етиловим алкоголем за результатами лазерної поляриметрії // Морфологія. – 2008. – 2, № 3. – С. 29-33.

11. Егоров Ю.Л., Кирилов В.Ф. Экологическая значимость и гигиеническая регламентация свинца и кадмия в различных средах (обзор) // Медицина труда и промышленная экология. – 1996. – № 10. – С. 18-25.

12. Кліщ І.М., Криницька І.Я., Бекус І.Р. Вплив карнітину хлориду на показники білкового обміну у щурів за умов гострого алкогольного отруєння на тлі інтоксикації солями кадмію та свинцю // Мед. хімія. – 2006. – 8, № 3. – С. 122-125.

13. Кривчик А.А., Муц Т.Н., Хаджюз А. и др. Влияние энтеросорбции на течение и исход острого токсического гепатита // Здравоохран. Беларуси. – 1992. – № 8. – С. 37-41.

14. Нужный В.П. Механизмы и клинические проявления токсического действия алкоголя. – М.: Мед-практика, 2002. – 345 с.

15. Рихтер Ф., Ситтнер В.Д., Рассоул Ф. и др. Влияние карнитина хлорида на экспериментальную гипертриглицеридемию у крыс // Фармакол и токсикол. – 1986. – № 4. – С. 74-75.

16. Русакова Н.В., Мухабетова Л.Х., Пиртахия Н.В. Оценка опасности промышленных отходов, содержащих тяжелые металлы // Гиг. и сан. – 1998. – № 4. – С. 27-30.

17. Panchenko L.F., Pirozhkov S.V., Popova S.V., Antonenkov V.D. Effect of chronic ethanol treatment on peroxisomal acyl-CoA oxidase activity and lipid peroxidation in rat liver and heart // Experientia. – 1987. – 43, № 5. – P. 580-581.

# ВЛИЯНИЕ КАРНИТИНА ХЛОРИДА НА ПОКАЗАТЕЛИ ЛИПИДНОГО ОБМЕНА У ЖИВОТНЫХ С ОСТРЫМ АЛКОГОЛЬНЫМ ОТРАВЛЕНИЕМ НА ФОНЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ КАДМИЯ ХЛОРИДОМ И СВИНЦА АЦЕТАТОМ

И.Р. Бекус

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

## Резюме

Изучено влияние карнитина хлорида на показатели липидного обмена при комбинированном действии этанола и солей кадмия и свинца. Показано, что интоксикация этими токсинами сопровождается нарушением липидного спектра плазмы крови и печени, активацией процессов липидной пероксидации. Применение карнитина хлорида способствовало нормализации концентрации общих липидов, фосфолипидов и восстановлению коэффициентов липид/белок и фосфолипиды/общие липиды. Положительные изменения были обнаружены при исследовании показателей липопероксидации – гидропероксидов липидов, диеновых конъюгатов, ТБК-активных продуктов, основ Шиффа. Сделан вывод о положительном влиянии карнитина хлорида на показатели липидного обмена при остром отравлении этанолом на фоне длительного введения кадмия хлорида и свинца ацетата.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** острое алкогольное отравление, хроническая интоксикация солями кадмия и свинца, общие липиды, фосфолипиды, ТБК-активные продукты, основы Шиффа, диеновые конъюгаты.

## THE INFLUENCE OF CARNITINE CHLORIDE ON THE RESULTS OF LIPID EXCHANGE IN ANIMALS WITH ACUTE ALCOHOLIC POISONING AGAINST A BACKGROUND OF PROLONGED INTOXICATION BY CADMIUM CHLORIDE AND PLUMBUM ACETATE

I.R. Bekus

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.Y. HORBACHEVSKY

## Summary

The influence of carnitine chloride on the results of lipid exchange with combined use of ethanol as well as cadmium and plumbum salts has been studied. It has been shown that the intoxication by ethanol against a background of prolonged period of cadmium chloride and plumbum acetate injection is accompanied with imbalanced lipid spectrum of blood plasma and liver, activating the processes of lipid peroxidation. The use of carnitine chloride has caused a normalization of concentration of general lipids, phospholipids, and regeneration of lipid/protein and the phospholipids/general lipids coefficients. Positive changes have also experienced lipid peroxidation indices –lipid hydroperoxides, TBK-active products and Shife bases. A conclusion has been made on the influence of carnitine chloride on the results of lipid exchange at acute ethanol poisoning against a background of prolonged cadmium chloride and plumbum acetate injection.

**KEY WORDS:** acute alcoholic poisoning, chronic intoxication by cadmium and plumbumb salts, general lipids, phospholipids, TBK-active products, Shife bases.

Отримано 18.05.2009 р.

Адреса для листування: І.Р. Бекус, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ПРОТИВИРАЗКОВОЇ ДІЇ СКЛАДНОЇ СУБСТАНЦІЇ “ФАМОБРОК”

Н.М. Щукіна, О.М. Гладченко, І.М. Владимірова  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

*Виразкова хвороба на сьогодні залишається досить розповсюдженим захворюванням, яке займає одне з провідних місць у загальній структурі патології людини. Обґрунтований інтерес викликає можливість застосування комбінованих препаратів, які мають ряд переваг перед синтетичними, це, зокрема, низька токсичність, м'яка дія, можливість тривалого використання без формування звикання та залежності. В результаті проведених досліджень з вивчення противиразкової активності складної субстанції під умовною назвою “Фамоброк” на моделях гострих стресових шлунково-кишкових виразок та спирто-преднізолонних виразок у щурів встановлено, що фамоброк проявляє значний антиульцерогенний ефект, що є підставою для його подальшого поглибленого вивчення як потенційного лікарського засобу рослинного походження для лікування виразкової хвороби шлунка.*

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **броколи, таблетки, противиразкова активність.**

ВСТУП. Виразкова хвороба шлунка – захворювання, яке характеризується виникненням виразкового дефекту в слизовій оболонці шлунка і/або дванадцятипалої кишки, в основі якого лежить запальний процес, зумовлений зниженням її захисних властивостей і/або підвищенням агресивності шлункового вмісту у зв'язку з персистенцією гелікобактерної інфекції, а також впливом багатьох інших внутрішніх і зовнішніх факторів.

Запалення є місцевою реакцією живої тканини на пошкодження, яке може проходити як хвороба з участю всіх систем організму.

Етіологія захворювання буває різноманітною: від впливу шкідливих мікроорганізмів до дії фізичних або хімічних факторів [1, 6, 7].

Провідною ланкою в патогенезі виразкової хвороби є дисбаланс між факторами агресії та захисту слизової оболонки. До факторів ендогенної агресії відносять соляну кислоту, пепсин, порушення моторно-евакуаторної функції гастродуоденальної зони, бактерії *Helicobacter pylori*. До групи екзогенних агресорів – нікотин, алкоголь, лікарські препарати тощо. Рівновага між факторами захисту та агресії встановлюється шляхом нейрогуморальної регуляції, яку забезпечують біологічно активні речовини (БАР) та пептидні гормони [13, 15].

Фармакологічне регулювання запально-го процесу, що відповідає за виникнення виразкового дефекту, належить до найбільш

важливих та складних проблем сучасної медицини. Розширення арсеналу противиразкових препаратів рослинного походження, що проявляють протизапальну, антимікробну, репаративну, антиоксидантну, мембраностабілізуювальну дію, є перспективним і робить питання розробки вітчизняних лікарських засобів актуальним [5, 7].

Основним класом препаратів, які застосовують як базисну терапію для пригнічення кислотності шлункового соку, є блокатори  $H_2$ -рецепторів. Циметидин та ранітидин, які не мають жодних переваг перед фамотидином, проявляють значно більшу кількість побічних ефектів.  $H_2$ -блокатори IV і V поколінь не переважають фамотидин у пригніченні кислотності.

Фамотидин є блокатором гістамінових  $H_2$ -рецепторів III покоління. Основною фармакологічною дією його є виражене пригнічення продукування соляної кислоти в шлунку, як базальної, так і стимульованої гістаміном, гастрином, ацетилхоліном, а також зниження активності пепсину [9, 15].

Фітохімічні дослідження трави капусти брокколі та сухого екстракту були проведені раніше, і встановлено вміст вітамінів С, РР, групи В, провітаміну А – каротиноїдів, фітонцидів, що мають фунгіцидні та бактерицидні властивості, а також багатий мінеральний склад (калій, натрій, залізо, кальцій, мідь, цинк тощо), що особливо важливо, тому що при виразковій хворобі ШКТ спостерігаються комплексні порушення мінерального обміну [2, 3, 5]. Крім того, надзвичайно важливим класом сполук,

який містять сировина та екстракт броколі, е глюкозинолати (сульфорафан і його похідні) та індольні сполуки (індол-3-карбінол), що мають антигелікобактерні, протипухлинні властивості (попереджують розвиток пухлин органів ШКТ та естрогензалежних новоутворень молочних залоз і жіночих статевих органів) [10-12, 14].

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Об'єктом нашого дослідження було вивчення противиразкової активності складної субстанції під умовною назвою "Фамоброк", що являє собою комплекс фамотидину та сухого екстракту (1:5 спиртового) з трави капусти броколі.

Противиразкову активність комбінованого засобу вивчали на моделі гострих стресових шлунково-кишкових виразок. При подразненні різних відділів центральної та периферичної нервової системи розвиваються системні ураження травного тракту з виразками. У результаті стресу слизова оболонка стає доступною для впливу травних ферментів і соляної кислоти, внаслідок чого на ній утворюються ерозії з подальшим некрозом і некробіозом епітеліальних клітин [4].

Дослідження проводили на білих безпородних щурах масою 175-200 г. Утворення виразок викликали іммобілізацією в розпластаному стані на верстаті. За 1 год до іммобілізації тварини отримували таблетки "Фамоброк" у дозі 30 мг/кг і плантаглюцид у дозі 500 мг/кг. Через добу щурів декапітували та підраховували кількість виразок, відсоток тварин з виразками та виразковий індекс. Виразковий індекс визначали за формулою О.М. Буркацької, В.Ф. Вейер та І.І. Дегтярьової (1995). Результати експерименту наведені в таблиці 1.

Противиразкову дію таблеток "Фамоброк" вивчали також на моделі ураження слизової оболонки шлунка сумішшю етилового спирту із преднізолоном. Під впливом кортикостероїду відбувається інгібування біосинтезу простагландинів у слизовій оболонці шлунка, внаслідок чого знижується вироблення мукоцинтами слизу, який захищає внутрішню поверхню шлунка від агресивного впливу травних ферментів і соляної кислоти. У результаті цього порушується трофіка слизової оболонки шлунка, зменшується енергетичне та пластичне забезпечення тканин і підсилюється вплив агресивних факторів шлункового соку. Під впливом преднізолону підсилюються шлункова секреція та процеси перекисного окиснення ліпідів. Етанол у концентрації 80 % призводить до денатурації білків слизової оболонки шлунка, що спричиняє некроз.

Складну субстанцію фамотидину та екстракту капусти броколі вводили щурам внутрішньошлунково. Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин. Препаратом порівняння був альтан в дозі 1 мг/кг. Через 24 год експериментальних тварин декапітували. Після лапаротомії витягали шлунок, промивали фізіологічним розчином і візуально оцінювали стан слизової оболонки шлунка. При цьому враховували площу виразок у балах (S), відсоток тварин з виразками (T), що дозволило розрахувати інтегральний показник противиразкової активності – виразковий індекс (BI).

Градацію виразкового ушкодження слизової оболонки шлунка проводили залежно від сумарної площі виразкових дефектів: відсутність ураження – 0 балів; 1-2 мм<sup>2</sup> – 1 бал; 3-5 мм<sup>2</sup> – 5 балів; 6-10 мм<sup>2</sup> – 10 балів. У разі загибелі тварин від перитоніту внаслідок прориву та перфорації шлунка інтенсивність виразки оцінювали в 15 балів.

Виразковий індекс визначали за формулою:

$$BI = \frac{S \cdot T}{100},$$

де S – середня площа виразкових ділянок у всіх тварин, бали;

T – кількість тварин з виразковими ураженнями, %.

Противиразкову активність (ПВА) розраховували за формулою:

$$ПВА = \frac{BI_{\kappa}}{BI_e},$$

де  $BI_{\kappa}$  – виразковий індекс у контрольній групі;

$BI_e$  – виразковий індекс в експериментальній групі.

Результати проведених досліджень наведені в таблиці 2.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Отримані результати експерименту свідчать про порівняно високу активність досліджуваних таблеток "Фамоброк" на наведених фармакологічних моделях.

При вивченні противиразкової активності на моделі гострої стресової виразки шлунка у щурів встановлено, що під дією таблеток "Фамоброк" кількість виразок шлунка у дослідних тварин зменшувалася в 7,5 раза порівняно з контролем, а після введення плантаглюциду – в 5 разів. Таким чином, таблетки "Фамоброк" при внутрішньошлунковому введенні в



Таблиця 1 – Противиразкова активність таблеток “Фамоброк” на моделі гострої стресової виразки шлунка у щурів (n=6)

Групи тварин	Кількість виразок	Тварини з виразками, %	Виразковий індекс
Контроль	30,0±2,2	100	30,0
Фамоброк, 30 мг/кг	4,0±0,28*	50	2,0
Плантаглюцид, 500 мг/кг	6,0±0,35*	50	3,0

Примітка. \* – p<0,01 порівняно з контролем.

дозі 30 мг/кг проявили виражений проти-виразковий ефект на моделі стресової виразки порівняно з контрольною групою та рос-линним препаратом з листя подорожника – плантаглюцидом. Доведено, що складна суб-станція в дозі 30 мг/кг на даній моделі стре-сової виразки має виражену противиразкову активність.

У результаті експерименту на другій моделі встановлено, що введення спирто-преднізо-лонової суміші тваринам призводило до по-гіршення загального їх стану. Після розтину щурів та огляду шлунків у групі контрольної па-тології у всіх тварин спостерігались здуття, блідість та набряк слизової оболонки шлунка, чисельні дрібні крововиливи, виразкові дефекти слизової оболонки. Введення таблеток “Фамоброк” призвело до поліпшення стану тварин. При макроскопічному розгляді

шлунків щурів цієї групи спостерігалась відсутність здуття, складчастість та колір сли-зової оболонки шлунка майже не відрізнялись від цих характеристик в групі інтактних тва-рин. При макроскопічному розгляді шлунків щурів, які отримували альтан, колір слизової оболонки шлунка також мало відрізнявся від слизової оболонки групи інтактних тварин, але все ж таки спостерігались точкові крововили-ви та виразкові дефекти, які не були крупни-ми і глибокими. У результаті експерименту встановлено, що на моделі спирто-преднізо-лонової виразки фамоброк проявив проти-виразкову активність, яка дорівнювала 91 % при середній площі виразок 1,39±0,32 та вираз-ковому індексі 0,70. Противиразкова активність препарату порівняння альтану на цій моделі складала 88 % при середній площі виразок 0,95±0,27 та виразковому індексі 0,55.

Таблиця 2 – Противиразкова активність таблеток “Фамоброк” на моделі гострої спирто-преднізолонової виразки шлунка у щурів (n=6)

Групи тварин	Середня площа виразок, мм	Тварини з виразками, %	Виразковий індекс	Противиразкова активність, %
Контроль	6,64±1,93	100	6,64	–
Фамоброк, 30 мг/кг	1,39±0,32*	50	0,70	88
Альтан, 1 мг/кг	0,95±0,27*	52	0,55	91

Примітка. \* – p≤0,05 порівняно з контролем.

**ВИСНОВКИ.** 1. Встановлено, що складна субстанція “Фамоброк” на моделі гострих стресових шлунково-кишкових виразок про-являє виражену противиразкову дію, переви-щуючи в 1,5 раза препарат порівняння (план-таглюцид) та в 7,5 раза контрольну групу.

2. На моделі спирто-преднізолонової ви-разки фамоброк проявляє противиразкову активність, яка дорівнює 91 %, що свідчить про

здатність досліджуваних таблеток чинити вира-жений антиульцеровгенний ефект та позитив-но впливати на перебіг виразкової хвороби.

3. Виражена антиульцеровгенна дія склад-ної субстанції під умовною назвою “Фамоброк” є підставою для її подальшого поглибленого вивчення як потенційного лікарського засо-бу рослинного походження для лікування ви-разкової хвороби шлунка.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Белоусов Ю.В. Педиатрическая гастроэнтерология: Новейший справочник. – М.: Изд-во Эксмо, 2006.
2. Владимірова І.М., Кисличенко В.С. Вивчен-ня амінокислотного та елементного складу капусти брокколи та її використання в медичній практиці //

Актуальні питання фармацевтичної та медичної на-уки та практики: Збірник наукових статей. – Вип. 15, Т. 1. – Запоріжжя: Вид-во ЗДМУ, 2006. – С. 186-191.

3. Владимірова І.М., Кисличенко В.С., Демьохін В.Б., Махотіна О.О. Фітохімічне вивчення листя капусти брокколи // Створення, виробництво, стандартиза-

ція, фармакоєкономічні дослідження лікарських засобів та біологічно активних добавок: Матеріали 2-ї Міжнародної науково-практичної конференції (12-13 жовтня 2006 р.). – Х.: Вид-во НФаУ, 2006. – С. 42-43.

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

5. Кисличенко В.С., Владимірова І.М. Капуста брокколи – *Brassica oleracea* L. var *italica* Plerck. Аналітичний обзор // Провизор. – 2007. – № 11. – С. 8-11.

6. Лапина Т.Л. Лечение эрозивно-язвенных поражений желудка и двенадцатиперстной кишки // РМЖ. – 2001. – 9 (13-14). – С. 602-607.

7. Потехин П.П., Пастухов В.С. Проблемы регенерации слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта при эрозивно-язвенных поражениях // Арх. патологии. – 1997. – 59, № 2. – С. 68-69.

8. Рябкова А.П., Шостак Н.И., Малярова Л.А. Желудочно-кишечные кровотечения, обусловленные приемом нестероидных противовоспалительных препаратов // Врач. – 2004. – № 4. – С. 26-27.

9. Burget D.W., Chiverton K.D., Hunt R.H. Is there an optimal degree of acid suppression for healing of duodenal ulcers? A model of the relationship between

ulcer healing and acid suppression // Gastroenterology. – 1999. – 99. – P. 345-351.

10. Dashwood R.H. Indole-3-carbinol: Anticancerogen or tumor promoter in brassica vegetables? // Chem. – Biol. Interact. – 1998. – 110, № 1-2. – P. 1-5.

11. Fahey J.W., Zalcmann A.T., Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants // Phytochemistry. – 2001. – 56, № 1. – P. 5-51.

12. Galan M.V., Kishan A.A., Silverman A.L. Oral broccoli sprouts for the treatment of Helicobacter pylori infection: a preliminary report // Dig. Dis. Sci. – 2004. – 49, № 7-8. – P. 1088-1090.

13. Graham D.Y., Opekun A.R., Wilingham F.F., Qureshi A.J. Visible small-intestinal mucosal injury in chronic NSAID ulcers // Clin. Gastroenterol. Hepatol. – 2005. – 3. – P. 55-59.

14. Kurilich A.C., Jeffery E.H., Juvik J.A. Broccoli extracts protect against reactive oxygen species in HepG2 cells // Journal of Nutraceuticals, Functional & Medical Foods. – 2003. – 4, № 2. – P. 5-15.

15. Soll A.H. Peptic ulcer and its complications // Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease. – Philadelphia–London–Toronto–Montreal–Sydney–Tokyo, 1998. – 1. – P. 620-678.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОЯЗВЕННОГО ДЕЙСТВИЯ СЛОЖНОЙ СУБСТАНЦИИ “ФАМОБРОК”

Н.Н. Щукина, О.М. Гладченко, И.Н. Владимірова  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

### Резюме

Язвенная болезнь на сегодня остается достаточно распространенным заболеванием, которое занимает одно из ведущих мест в общей структуре патологии человека. Обоснованный интерес вызывает возможность применения комбинированных препаратов, которые имеют ряд преимуществ перед синтетическими, это, в частности, низкая токсичность, мягкое действие, возможность длительного использования без формирования привыкания и зависимости. В результате проведенных исследований по изучению противоязвенной активности сложной субстанции под условным названием “Фамоброк” на моделях острых стрессовых желудочно-кишечных язв и спирто-преднизолоновых язв у крыс установлено, что фамоброк проявляет значительный антиязвенный эффект, что является основанием для его дальнейшего углубленного изучения в качестве потенциального лекарственного средства растительного происхождения для лечения язвенной болезни желудка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **брокколи, таблетки, противоязвенная активность.**

## THE STUDY OF ANTIULCER ACTION OF THE COMBINED SUBSTANCE “FAMOBROK”

N.M. Shchukina, O.M. Hladchenko, I.M. Vladymyrova  
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

### Summary

The stomach ulcer for today remains widespread enough disease which borrows one of the leading places in the general structure of human pathology. The proved interest causes an opportunity of application of combined preparations due to their low toxicity, soft action, opportunity of prolonged application without formation of habits and dependence. As a result carried out researches on studying antiulcer activity of a complex substance with the conditional name “Famobrok” on the models of acute stressful peptic ulcers and alcohol-prednisolon ulcers at rats during it was established, that “Famobrok” shows significant antiulcer effect that is the basis for its further profound studying as potential medical product of a phyto genesis for treatment of stomach ulcer.

KEY WORDS: **broccoli, pills, antiulcerous activity.**

Отримано 9.02.2009 р.

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

## СТАН ГЛУТАТІОНЗАЛЕЖНОЇ ФЕРМЕНТНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ ЗА УМОВ ІНФЕКЦІЙНОЇ ПНЕВМОНІЇ ІЗ СУПУТНІМ ЗАХВОРЮВАННЯМ

**В.М. Жадан, В.І. Коржов**

НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ФТИЗІАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ  
ІМЕНІ Ф.Г. ЯНОВСЬКОГО АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ, КИЇВ

*У досліджах на нелінійних щурах-самцях вивчили стан глутатіонзалежної ферментної системи еритроцитів залежно від виду експериментальної патології. Встановлено, що за умов інфекційної пневмонії із супутнім панкреатитом відбуваються найбільш виражені зміни показників даної системи, а саме: активності глутатіон-S-трансферази, глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази і вмісту загального та окисненого глутатіону, що призводять до дисбалансу в цій захисній системі організму.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** глутатіон-S-трансфераза, глутатіонредуктаза, глутатіонпероксидаза, відновлений, окиснений та загальний глутатіон, інфекційна пневмонія, панкреатит.

**ВСТУП.** В останні десятиріччя був встановлений зв'язок між багатьма захворюваннями та процесом вільнорадикального окиснення, в якому значну роль відіграють активні форми кисню (АФК). АФК утворюють активовані нейтрофіли, вони виникають при фагоцитозі, метаболізмі лейкотриєнів, функціонуванні антиоксидантних ферментів та ін. [6, 18]. АФК призводять до порушення окисно-відновних процесів енергетичного обміну, негативно впливають на біологічні структури через ініціацію та підтримку реакцій неконтрольованого перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що призводить до зміни структурної і функціональної організації клітинних мембран, їх проникності та іонного дисбалансу, що, в кінцевому результаті, знижує життєдіяльність клітин [5, 8]. На рівні систем організму це проявляється серцево-судинними, легенево-нервовими та іншими деструктивними синдромами [12, 17].

Гіпоксичні умови (основний синдром при бронхолегеневих захворюваннях) стимулюють утворення різноманітних активованих кисневих метаболітів, які є первинними месенджерами процесів пероксидації. Стійкість до гіпоксії значною мірою пов'язана з активацією антиоксидантних систем організму. Ланка антиоксидантних реакцій у механізмі захисних процесів є провідною і найбільш потужною, оскільки вона не тільки запобігає розвитку вільнорадикальних реакцій, але й забезпе-

чує ефективність елімінації кінцевих метаболітів перекисного окиснення. Глутатіонова система є однією з активних складових антиоксидантної системи захисту організму, яка відіграє велику роль у купіруванні патологічного процесу [4, 7, 13].

Враховуючи все вищезгадане, метою даної роботи було дослідження стану глутатіонової системи еритроцитів при експериментальній інфекційній пневмонії із супутнім панкреатитом.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Дослідження були проведені на 40 білих безпородних щурах-самцях масою 180-200 г, яких утримували на стандартній дієті віварію.

Тварин поділили на 4 групи: 1-ша – контроль (інтактні щури); 2-га – тварини з інфекційною пневмонією; 3-тя – тварини з експериментальним панкреатитом, 4-та – тварини з інфекційною пневмонією із супутнім панкреатитом.

Для відтворення експериментальної інфекційної пневмонії тваринам інтратрахеально вводили під легким ефірним наркозом добову культуру *Enterococcus faecalis* (1 млрд мікробних клітин в 0,5 мл фізіологічного розчину) [1].

Експериментальний панкреатит викликали шляхом внутрішньочеревного однократного введення клітинного гомогенату тканини всієї підшлункової залози, що була отримана після забою інших інтактних щурів і розведена стерильним фізіологічним розчином у співвідношенні 1:1 [3].

Об'єктом дослідження були еритроцити, які виділяли з крові, стабілізованої розчином гепарину (25 одиниць гепарину на 1 мл крові). За допомогою центрифугування еритроцити двічі відмивали від плазми холодним стерильним фізіологічним розчином. Гемолізат еритроцитів отримували шляхом додавання до промитих еритроцитів дистильованої води у співвідношенні 1:1. Забір матеріалу для досліджень здійснювали при суворому дотримуванні правил роботи з експериментальними тваринами [15].

Тварин декапітували під легким ефірним наркозом.

Загальну активність глутатіонредуктази (ГР) (КФ 1.6.4.2) вивчали за методом J. Carlberg у модифікації В.П. Верболович і Л.М. Подгорної [2]. Принцип методу полягає в реєстрації швидкості окиснення NADPH при  $\lambda=340$  нм. Активність глутатіон-S-трансферази (ГТ) (КФ 2.5.1.18) визначали за методом W.H. Habig [11], який ґрунтується на ферментативному зв'язуванні глутатіону з 1-хлор-2,4-динітробензолом і утворенні кон'югатів з максимумом поглинання при 340 нм, активність глутатіонпероксидази (ГП) (КФ 1.11.1.9) оцінювали за швидкістю окиснення відновленого глутатіону за присутності гідроперекису третбутилу. Пробу фотометрували при довжині хвилі 412 нм [10]. Концентрацію відновленого (GSH), окисненого (GSSG) та загального глутатіону визначали з використанням паладій-хлорпромазинового комплексу за методикою Lee Kum-Tatt у модифікації В.Г. Чернишова [16]. Концентрацію гемоглобіну в еритроцитах визначали ге-

моглобінціанідним методом [14]. Результати досліджень обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента [9].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Проведені дослідження показали, що інфекційна пневмонія, яка була змодельована на щурах, не призводить до вірогідних змін показників активності ключових глутатіонзалежних ферментів та кількості відновленого, окисненого й загального глутатіону в еритроцитах (табл. 1), тобто дана патологія не викликає метаболічних порушень у системі, яка забезпечує процеси детоксикації.

При вивченні біохімічних аспектів патогенезу панкреатиту встановлено зміни показників глутатінової системи. При даному патологічному стані відбувається підвищення на 35 % активності ГР – ферменту, який перетворює окисну форму глутатіону у відновлену. На основі глутатіонредуктази в клітині існує потужна ферментна система, яка підтримує співвідношення GSSG/GSH на низькому рівні, саме це співвідношення визначає інтенсивність пентозофосфатного циклу. В крові дослідних тварин з панкреатитом змінюється і вміст глутатіонів. Кількість відновленого глутатіону вірогідно знизилась, порівняно зі значеннями в інтактних тварин, на 64 %, кількість загального глутатіону зменшилась на 47 %, при цьому вміст окисненого майже не змінився. Рівень відновленого глутатіону, тобто його форми, яка здатна через власне окиснення відновлювати й нейтралізувати пероксид водню та органічні гідропероксида, є показником

Таблиця 1 – Показники глутатінової системи еритроцитів за умов експериментальної інфекційної пневмонії, панкреатиту та інфекційної пневмонії із супутнім панкреатитом ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Показники	Групи тварин			
	Контроль	Інфекційна пневмонія	Панкреатит	Інфекційна пневмонія + панкреатит
Глутатіон-S-трансфераза, мкмоль/хв·г Hb	1,72±0,24	1,69±0,10	1,89±0,18	2,81±0,23*
Глутатіонредуктаза, мкмоль/хв·г Hb	2,02±0,10	2,01±0,15	2,73±0,25*	2,61±0,25*
Глутатіонпероксидаза, мкмоль/хв·г Hb	251,20±20,54	262,55±24,67	248,44±25,60	380,88±38,71*
Відновлений глутатіон, ммоль/л Eг	1,66±0,10	1,46±0,08	1,07±0,18*	1,81±0,14
Окиснений глутатіон, ммоль/л Eг	0,32±0,05	0,32±0,03	0,24±0,03	0,72±0,07*
Загальний глутатіон, ммоль/л Eг	1,95±0,15	1,80±0,11	1,32±0,09*	2,52±0,18*

Примітка. \* – вірогідність різниці порівняно з показниками контрольної групи ( $p \leq 0,05$ ).

готовності організму використовувати антиоксидантну систему захисту при утворенні вторинних продуктів ПОЛ. Зниженням вмісту відновленої форми глутатіону організм відповідає на численні несприятливі фактори (вплив кисню, хронічного запалення та ін.). Порушення динамічної рівноваги між процесами біосинтезу, деградації, міжорганного розподілу, окисно-відновних перетворень негативно впливає на формування пулу глутатіону, який підтримує нормальну життєдіяльність клітини. Знижений рівень GSH може свідчити й про напруження компенсаторних механізмів антиоксидантної системи, зменшення швидкості репаративних процесів.

Дослідження показників глутатіонової системи при інфекційній пневмонії, яка була обтяжена експериментальним панкреатитом, виявили значні зміни активності ключових глутатіонзалежних ферментів та кількості окисненого й загального глутатіону. Як видно з отриманих даних (табл. 1), активність всіх трьох ферментів вірогідно зростає порівняно зі значеннями в інтактних тварин. Так, активність ГТ підвищується на 61 %, ГР – на 29 % та ГП – майже на 52 %. Підвищену активність фізіологічної антиоксидантної системи сьогодні розглядають як звичайний адаптаційно-компенсаторний процес при змінених умовах функціонування організму. Захист клітин і тканин від ушкоджувальної дії вільних радикалів, різноманітних пероксидів здебільшого забезпечується завдяки активному функціонуванню глутатіонзалежних ферментів, які знешкоджують велику кількість проміжних і кінцевих продуктів ПОЛ до оптимального рівня.

При інфекційній пневмонії із супутнім панкреатитом вірогідно змінюється в еритроцитах і

вміст окисненого й загального глутатіону. Так, кількість окисненого глутатіону зростає на 125 %, загального – на 29 %, вміст відновленого глутатіону має тенденцію до підвищення відносно інтактних тварин. Рівень загального глутатіону і співвідношення його фракцій відображають стан ряду компенсаторно-захисних механізмів, зміна у співвідношенні окисної і відновленої фракцій глутатіону вказує на порушення ферментних систем окисних процесів.

Таким чином, проведені дослідження показали, що в регулюванні компенсаторно-адаптаційних механізмів антиоксидантного захисту при вивчених патологічних станах значну роль відіграє редокс-система глутатіону. Попередження активації ПОЛ або пригнічення його інтенсивності здійснюється через регуляцію функціональних взаємозв'язків усередині каталітичної системи глутатіону.

**ВИСНОВКИ.** Залежно від моделей експериментальної патології, що були відтворені на білих щурах, спостерігається різний ступінь змін в глутатіонзалежній ферментній системі:

1) експериментальна інфекційна пневмонія суттєво не впливає на показники глутатіонової системи захисту в еритроцитах білих щурів;

2) експериментальний панкреатит призводить до порушення гомеостазу в глутатіонової системі, що проявляється вірогідним зростанням активності ферменту ГР та зниженням вмісту відновленого глутатіону;

3) за умов подвійної патології, тобто інфекційної пневмонії із супутнім панкреатитом, відбуваються вірогідне підвищення активності всіх трьох ключових глутатіонзалежних ферментів, підвищення вмісту окисненого і загального глутатіону.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Абкарлович Г.Ф., Акимченков Н.А. Энтерококковая экспериментальная пневмония у белых крыс // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1971. – № 9. – С. 137-139.
2. Верболович В.П., Подгорная Л.М. Определение активности глутатион-редуктазы и супероксиддисмутазы на биохимическом анализаторе // Лаб. дело. – 1987. – № 12. – С. 17-20.
3. Гуляев В.Ю., Терешин С.Ю., Оранский И.Е. Динамика показателей перекисного окисления липидов, минерального и липидного обмена при экспериментальном хроническом панкреатите // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 1992. – № 2. – С. 29-34.
4. Дзюблик А.Я. Место макролидов в лечении больных с внебольничной пневмонией // Укр.мед. вісник. – 2008. – № 3. – С. 76-79.

5. Казимирко В.К., Мальцев В.И. Антиоксидантная система и ее функционирование в организме человека // Здоров'я України. – 2004. – № 13. – С. 34-36.

6. Казимирко В.К., Мальцев В.И., Бутылин В.Ю. и др. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия. – К.: Морион, 2004. – 160 с.

7. Кондратова И.Ю., Сенаторова А.С. Клеточный энергетический обмен у детей при осложненных пневмониях // Врач. практика. – 2008. – № 1. – С. 80-84.

8. Костромина В.П., Яроцук Л.Б. Заболевания органов дыхания: гомотоксикология в лечении заболеваний дыхательной системы // Укр. терапевт. журн. – 2006. – № 1. – С. 71-74.

9. Лапач С.Н., Чубенко А.В. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с

использованием Excel. – 2-е изд., доп. – К.: Морион, 2001. – 407 с.

10. Моин В.М. Простой и специфический метод определения активности глутатион-пероксидазы в эритроцитах // Лаб. дело. – 1986. – № 8. – С. 724-722.

11. Переслягина И.А. Активность антиоксидантных ферментов здоровых людей // Лаб. дело. – 1989. – № 11. – С. 20-22.

12. Сазонова Т.Г., Архипенко Ю.В. Роль свободнорадикальных процессов и редокс-сигнализации в адаптации организма к изменению уровня кислорода // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2005. – **91**, № 6. – С. 636-655.

13. Соодаева С.К. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе ХОБЛ // Атмосфера. – 2002. – № 1 (4). – С. 24-25.

14. Унификация клинических лабораторных методов исследования: Сб. науч. тр. / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1988. – 124 с.

15. Червонская Г.П., Панкратова Г.П., Миронова Л.А. и др. Этика медико-биологического эксперимента в доклинических исследованиях // Токсикол. вестник. – 1998. – № 3. – С. 2-8.

16. Чернышов В.Г. Определение восстановленного и окисленного глутатиона в эритроцитах беременных женщин // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 31-33.

17. Durbin W.J. Christopher Stille Pneumonia // Pediatrics in Review. – 2008. – **29**. – P. 147-160.

18. Musher D.M. How Contagious Are Common Respiratory Tract Infection? // N. Engl. J. Med. – 2003. – **348**, № 13. – P. 1256-1266.

## СОСТОЯНИЕ ГЛУТАТИОНЗАВИСИМОЙ ФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ИНФЕКЦИОННОЙ ПНЕВМОНИИ С СОПУТСТВУЮЩИМ ЗАБОЛЕВАНИЕМ

**В.Н. Жадан, В.И. Коржов**

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ФТИЗИАТРИИ И ПУЛЬМОНОЛОГИИ ИМЕНИ Ф.Г. ЯНОВСКОГО АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК УКРАИНЫ, КИЕВ

### Резюме

*В исследованиях на нелинейных крысах-самцах изучили состояние глутатионзависимой ферментной системы эритроцитов в зависимости от вида экспериментальной патологии. Установлено, что в условиях инфекционной пневмонии с сопутствующим панкреатитом происходят наиболее выраженные изменения показателей данной системы, а именно: активности глутатион-S-трансферазы, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы и содержания общего и окисленного глутатиона, что приводят к дисбалансу в этой защитной системе организма.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** глутатион-S-трансфераза, глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза, восстановленный, окисленный и общий глутатион, инфекционная пневмония, панкреатит.

## STATE OF GLUTATHIONE-DEPENDENT ENZYME SYSTEM OF BLOOD UNDER CONDITIONS OF CONTAGIOUS PNEUMONIA WITH A CONCOMITANT DISEASE

**V.M. Zhadan, V.I. Korzhov**

NATIONAL INSTITUTE OF PHTHISIOLOGY AND PULMONOLOGY BY F.H. YANOVSKY OF ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES OF UKRAINE, KYIV

### Summary

*The state of glutathione-dependent enzyme system of erythrocytes was studied in nonlinear male rats in dependence on experimental pathology model. It was found that under conditions of a contagious pneumonia accompanied with concomitant pancreatitis there were the most pronounced changes of parameters of the given system, namely, the glutathione-S-transferase, glutathione-reductase and glutathione-peroxidase activities and the level of total and oxidized glutathione, resulting in the imbalance in this protective system of an organism.*

**KEY WORDS:** glutathione-S-transferase, glutathione-reductase, glutathione-peroxidase, reduced, oxidated and total glutathione, contagious pneumonia, pancreatitis.

Отримано 26.12.2008 р.

**Адреса для листування:** В.М. Жадан, Національний інститут фізіотрії і пульмонології імені Ф.Г. Яновського Академії медичних наук України, вул. М. Амосова, 10, Київ, 03680, Україна.

СПЕКТРАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА 5-R-4-R<sub>1</sub>-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТІОНІВ

А.Г. Каплаушенко, О.І. Панасенко, Є.Г. Книш, Т.В. Панасенко  
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

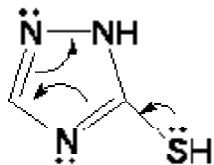
Вивчено УФ-спектри поглинання 5-R-4-R<sub>1</sub>-1,2,4-тріазол-3-тіонів у розчинниках різної полярності (вода, етанол, 0,1 М НСІ, 1 М Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 М NaOH, н-гексан). Встановлено, що УФ-спектри досліджуваних сполук у всіх випадках характеризуються трьома смугами поглинання, положення максимумів та їх спектральні характеристики залежать від використаних розчинників. Вивчено також тіон-тіольну таутомерію вищезазначених речовин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: 5-R-4-R<sub>1</sub>-1,2,4-тріазол-3-тіони, УФ-спектри, спектральна характеристика, тіон-тіольна таутомерія.

ВСТУП. Метою дослідження було вивчення характеру УФ-спектрів 4-феніл-1,2,4-тріазол-3-тіону (II), 4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (III), 4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (IV), 5-(4-піридил)-4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (V), 5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (VI) і 5-(4-нітрофеніл)-4-(феніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (VII) в розчинниках різної полярності (вода, етанол, 0,1 М НСІ, 1 М Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 М NaOH, н-гексан) для встановлення природи смуг поглинання, які спостерігаються, а також виявлення тіон-тіольної таутомерії сполук, які аналізують залежно від природи розчинника.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Вимірювання ультрафіолетових спектрів проводили за допомогою приладу SPECTORD 200-222U214 в кварцових кюветах з товщиною робочого шару 1 см. У всіх випадках використовували розчинники, які мали аналітичну кваліфікацію "хімічно чисті".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Молекула симетричного 1,2,4-тріазолу в 3-тіо-1,2,4-тріазоловому фрагменті досліджуваної речовини містить три атоми азоту, два з яких N<sub>1</sub> та N<sub>4</sub> мають піридиновий характер, що свідчить про наявність в них неподілених пар електронів, тобто ці атоми азоту є електронодонорами:



© А.Г. Каплаушенко, О.І. Панасенко, Є.Г. Книш, Т.В. Панасенко, 2009.

$\pi$ -надлишкова електронна густина атома сірки в -SH-угрупованні 3-тіо-1,2,4-тріазолового циклу вказує на негативний індуктивний та позитивний мезомерний ефекти.

Звичайно електронний спектр поглинання незаміщеного 1,2,4-тріазолу або тріазолового циклу в поєднанні з простими замісниками характеризується однією смугою поглинання середньої інтенсивності [3]. Характерною особливістю спектрів поглинання 1,2,4-тріазолу та його простих заміщених похідних є відсутність смуг, зумовлених переходом з орбіти неподілених електронів гетероатомів на  $\pi$ -орбіту кільця. В 1,2,4-тріазоловому циклі орбіта неподілених електронів гетероатомів володіє більшим S-характером порівняно з аналогічною орбітою в шестичленних циклах у зв'язку з меншими валентними кутами п'ятичленних гетероциклів [8]. Нижня вакантна  $\pi$ -орбіта 1,2,4-тріазолової системи не має у загальному випадку вузлової площини, яка проходить крізь гетероатоми, тому  $n \rightarrow \pi^*$ -смуги її відносно інтенсивніші з  $\epsilon_{\max}$  3300 при 187 нм [3].

Переходи типу  $n \rightarrow \pi^*$  включають приєднання електрона до  $\pi$ -системи, яка перебуває у збудженому стані, тому в 1,2,4-тріазоловому гетероциклі, що має дві вільні пари електронів (N<sub>1</sub> та N<sub>4</sub>) на один атом кільця, такі переходи володіють високою енергією і, можливо, перекриваються  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходами, якщо вони є у спряженій з тріазоловим циклом системі [9]. Наявність смуги з перенесенням заряду сприяє і найбільш вірогідному при заміщенні гіпсохромному зсуву самої смуги [1].

4-феніл-1,2,4-тріазол-3-тіон (сполука II) відрізняється за своєю структурою від 1,2,4-тріазол-3-тіону (I) – наявністю фенільного

радикала в положенні 4 молекули 1,2,4-тріазол-3-тіону.

З нашої точки зору, цікавим було провести розрахунки електронегативності атомів фенільного циклу, який сполучений із речовиною (I) по  $N_4$ -атому молекули 1,2,4-тріазол-3-тіону.

Розрахунки виконували з використанням програмного пакета MOPAC, а заряди окремих атомів визначали за Міллікеном методом MINDO/3 (табл. 1).

Таблиця 1 – Розрахунки загальної електронегативності в молекулі 4-феніл-1,2,4-тріазол-3-тіону

Незаміщений 1,2,4-тріазол-3-тіон		4-феніл-1,2,4-тріазол-3-тіон	
C <sub>5</sub>	0,06686	C <sub>5</sub>	0,13629
N <sub>4</sub>	-0,16221	N <sub>4</sub>	-0,19627
S	-0,65707	S	-1,09821
C <sub>3</sub>	0,61867	C <sub>3</sub>	0,80121
N <sub>2</sub>	-0,15716	N <sub>2</sub>	-0,015828
N <sub>1</sub>	-0,06392	N <sub>1</sub>	-0,05128
ЗЕН	-0,35483	ЗЕН	-0,56654

На підставі наведених розрахунків можна зробити висновок, що фенільний радикал є донором відносно молекули речовини (I), але деякою мірою стягує на себе певну частину її електронної густини (рис. 1).

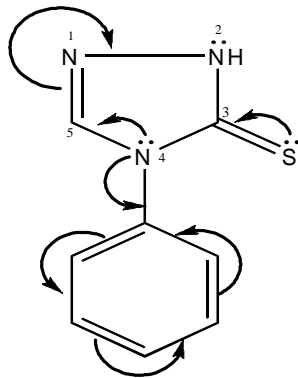


Рис. 1. Переходи електронної густини в молекулі 4-феніл-1,2,4-тріазол-3-тіону.

Ультрафіолетовий спектр сполуки (II) характеризується трьома смугами поглинання з максимумами, відповідно, при 207, 260 та 280 нм. У цьому випадку найбільш інтенсивною є друга смуга з максимумом при 260 нм. Положення та інтенсивність даних смуг, безумовно, залежать від будови сполуки, природи та полярності розчинників, а також рН середовища.

При інтерпретації природи смуг поглинання молекули речовини (II) треба враховувати внесок фенільного радикала.

Загальновідомо, що бензол має три смуги поглинання, які пов'язані з переходами  $\pi$ -електронів [12]. Найбільш короткохвильова смуга, що належить доведеному  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходу, має максимум при 180 нм ( $\epsilon=50000$ ). Наступна смуга ( $\lambda_{\text{макс}}$  200 нм) заборонена за симетрією, у зв'язку з чим її інтенсивність  $\epsilon \approx 7000$ . Найбільш характерним поглинанням бензолу є так звана смуга бензольного поглинання, яка розміщена в межах 230-270 нм. Вона заборонена за симетрією, має малу інтенсивність ( $\epsilon_{\text{макс}}=200$ ) та характерну коливальну структуру.

На рисунку 1 зазначено, а розрахунки (табл. 1) доводять, що фенільний цикл є донором відносно сполуки 1,2,4-тріазол-3-тіону (I), але при цьому фенільний цикл стягує на себе певну кількість електронів від атома азоту  $N_4$ .

На основі наведених даних можна зробити висновок, що перша смуга поглинання сполуки (II) ( $\lambda_{\text{макс}}$  205-210 нм) зумовлена локальним збудженням електронів фенільного ядра, тобто є  ${}^1L_a$ -смугою. Даний факт підтверджується ще й тим, що, порівняно з водними розчинами, сполука (II) в етанолі проявляє коливальну структуру смуг, які спостерігаються, а в н-гексані ця смуга піддається значному гіпсохромному зміщенню і її максимум нижчий 200 нм.

Друга смуга поглинання сполуки (II) характеризується інтенсивними максимумами ( $\epsilon_{\text{макс}}=3,38$  при 230 нм у н-гексані до  $\epsilon_{\text{макс}}=4,26$  при 260 нм у воді). При переході від малополярного розчинника (н-гексан) до більш полярних (0,1 M HCl, 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 M NaOH, вода, етанол) смуга, що спостерігається, зміщується батохромно, а її інтенсивність зростає. Таким чином, можна зробити висновок, що максимумами другої смуги поглинання сполуки (II) зумовлені  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходами електронів бензольного циклу, тому її, за класифікацією Klevens та Platt [11], слід позначити як  ${}^1L_b$ -смугу.

Беручи до уваги пояснення характеру третьої смуги поглинання сполуки (I), розрахунки кількісних значень електронегативності атомів молекули речовини (II), в цілому можна сказати, що третя смуга є результатом р- $\pi$ -спряження фенільного циклу з 1,2,4-тріазол-3-тіоном, тобто ця смуга зумовлена локальним збудженням зазначеного вище замісника.

4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіон (сполука III) відрізняється від 4-феніл-1,2,4-тріазол-3-тіону (сполука II) наявністю в положенні  $N_4$  1,2,4-тріазольного циклу 2-метилфенільного радикала.

УФ-спектри сполуки (III) у воді, етанолі, 0,1 M HCl, 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 M NaOH, н-гексані також характеризуються трьома смугами поглинання.



Перша смуга сполуки (III) перебуває в межах 207-218 нм, друга – 243-258 нм, третя – 260-285 нм. Беручи до уваги структуру 4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону [4, 8, 10] та враховуючи результати власних досліджень, можна передбачити, що електронний спектр сполуки (III) може бути зумовлений вказаними переходами електронів (рис. 2).

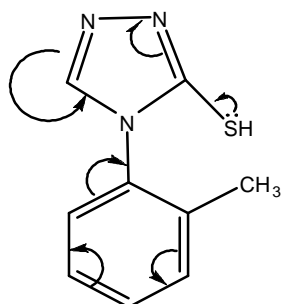


Рис. 2. Переходи електронної густини в молекулі 4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону.

Введення алкільної групи (у нашому випадку це метильний радикал) в бензольне кільце призводить лише до незначного батхромного зсуву  ${}^1L_a$ -смуги, яка є результатом локального збудження електронів фенільного ядра ( $\pi \rightarrow \pi^*$ -перехід) і знаходиться при 205 нм.  ${}^1L_b$ -смуга бензолу, яка зумовлена переходом електронів між симетричним основним та збудженим станами молекули, також зазнає батхромного зміщення на +7 нм і знаходиться для молекули метилбензолу при 262 нм [6]. Зазначений факт, зокрема зсув у довгохвильову частину УФ-спектра смуги, яка спостерігається, разом зі зміною полярності розчинників, характерний для  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходів у зв'язку з тим, що при цьому відбувається збільшення дипольного моменту молекули.

Перша смуга поглинання сполуки (III) зумовлена локальним збудженням електронів фенільного ядра, загальна оптична густина другої смуги поглинання сполуки (III) – загальним внеском  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходів 1,2,4-тріазольного циклу до  ${}^1L_b$ -смуги метильних похідних бензолу. Третю смугу поглинання для 4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (III) у даному випадку слід розглядати як результат р- $\pi$ -спряження, що спостерігається у молекулі в цілому.

4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіон (сполука IV) відрізняється від сполук (I-III) наявністю 2-метоксифенільного замісника в положенні  $N_4$  замість фенільного (сполука II) або 2-метилфенільного радикала (тіон III).

УФ-спектр сполуки (IV) у всіх використаних розчинниках характеризується наявністю також трьох смуг поглинання. Перша смуга має

максимум в межах 208-223 нм, друга – 250-260 нм, третя – 272-300 нм. Наведені дані свідчать про відмінність характеру електронного спектра сполуки (IV) від особливостей смуг поглинання сполук (I-III). Це, безумовно, пов'язано з наявністю метоксифенільного субституента (анізолу) в структурі останньої речовини (рис. 3).

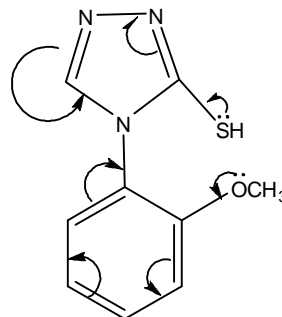


Рис. 3. Переходи електронної густини в молекулі 4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону.

Типи електронних переходів та УФ-спектри, які характерні для 1,2,4-тріазолового та фенільного фрагментів молекули сполуки (IV), описані нами вище. Тому, з нашої точки зору, необхідно розглянути переходи електронів та можливість р-спряження в молекулі анізолу.

Як свідчить наукова література [7-9], для анізолового хромофора характерними є р- $\pi$ -спряження у зазначеному субституенті ( $\lambda_{max}$  217 нм у н-гексані) та  $\pi \rightarrow \pi^*$ -перехід електронів, спричинений локальним збудженням фенільного ядра ( $\lambda_{max}$  271 нм у н-гексані) (рис. 4).

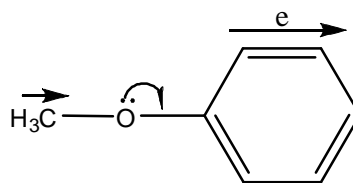


Рис. 4. Переходи електронів в анізоловому субституенті.

Незначне зміщення максимумів першої смуги поглинання сполуки (IV) у воді, етанолі, 0,1 м розчині хлоридної кислоти та н-гексані є доказом наявності р- $\pi$ -спряження, а не  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходу електронів.

Таким чином, перша смуга поглинання розчинів 4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону зумовлена р- $\pi$ -спряженням в анізоловому хромофорі, друга є результатом накладання  ${}^1L_b$ -смуги на поглинання, яке спричинене  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходом електронів у 1,2,4-тріазоловому циклі, а третя – р- $\pi$ -спряження всієї молекули (IV).

Також нами були вивчені УФ-спектри 5-(4-піридил)-4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (V) і 5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (VI).

Для повного з'ясування природи смуг, які спостерігаються, необхідно виявити вплив тіольного угруповання на 1,2,4-тріазольний цикл, а також визначити, чим є 4-піридино-вий радикал відносно, 2,4-тріазолового циклу – електронодонором чи електроноакцептором.

Безумовно, =S-субституент є електронодонором до 1,2,4-тріазольного циклу [8], про що свідчать переходи електронів у ядрі 1,2,4-тріазолу. Для того, щоб виявити роль 4-піридино-вого субституента відносно 1,2,4-тріазол-3-тіону, необхідно було розрахувати загальну електронегативність (ЗЕН) окремо для ядра 1,2,4-тріазолу, а також у цілому в молекулі досліджуваних речовин (V-VI).

Розрахунки проводили з використанням програмного пакета MOPAC, заряди окремих атомів у молекулах визначали за Міллікеном методом MINDO/3 (табл. 2).

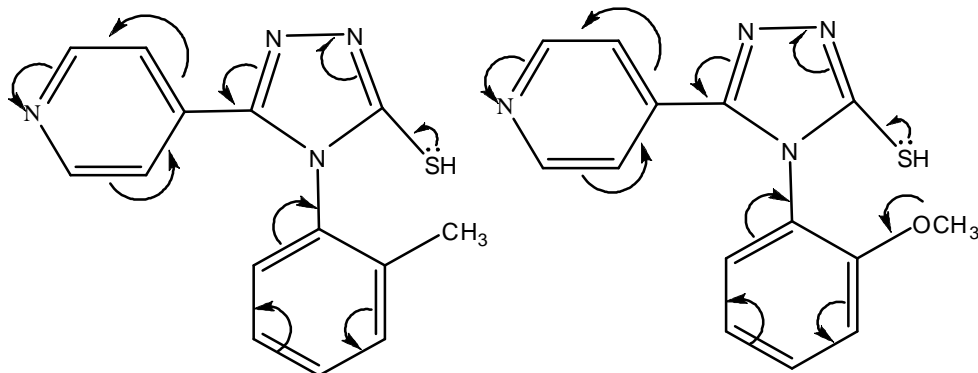


Рис. 5. Переходи електронної густини в молекулах 5-(4-піридил)-4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (V) і 5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (VI).

Відомо, що піридино-вий цикл являє собою циклічну систему із шістьма  $\pi$ -електронами [9]. Можна очікувати у першому зближенні, що спектральні властивості піридину будуть аналогічні властивостям бензолу. Така схожість дійсно спостерігається, адже необхідно враховувати, що спектр піридину має особливості, зумовлені неподіленою парою електронів атома азоту. Так, наприклад, у піридину, крім поглинання бензольного типу, можлива також  $n \rightarrow \pi^*$ -смуга, яка і проявляється, за винятком тих випадків, коли піридин піддається протонізації або утворює четвертинну основу.

За даними Platt [14], згідно з моделлю вільного електрона, при розчиненні у н-гексані  $n \rightarrow \pi^*$ -смуга спостерігається у вигляді перегину  $\lambda_{\text{макс}}$  176 нм на довгохвильовому схилі  $\pi \rightarrow \pi^*$ -смуги  $\lambda_{\text{макс}}$  251 нм. При переході до полярних розчинників відбувається типовий

Таблиця 2 – Розрахунки загальної електро-негативності в молекулі досліджуваної речовини

Незаміщений 1,2,4-тріазол-3-тіон		Піридиніл-4-заміщені 1,2,4-тріазол-3-тіону	
C <sub>5</sub>	0,06686	C <sub>5</sub>	0,1033
N <sub>4</sub>	-0,16221	N <sub>4</sub>	-0,45753
S	-0,65707	S	-0,6755
C <sub>3</sub>	0,61867	C <sub>3</sub>	0,08173
N <sub>2</sub>	-0,15716	N <sub>2</sub>	-0,40357
N <sub>1</sub>	-0,06392	N <sub>1</sub>	-0,02655
ЗЕН	-0,35483	ЗЕН	-0,77017

Як видно з розрахунків, загальна електронегативність 4-піридинзаміщених 1,2,4-тріазол-3-тіону перевищує електронегативність незаміщеного 1,2,4-тріазол-3-тіону в 2,17 разів, тобто 4-піридино-вий субституент відносно 1,2,4-тріазол-3-тіону є електронодонором, тому в молекулі речовини, яку аналізують, можуть спостерігатися переходи електронів, які позначені на рисунку 5.

гіпсохромний зсув, однак у даному випадку має місце також трохи незвичний ефект. У результаті гіпсохромного зсуву  $n \rightarrow \pi^*$ -смуга накладається на максимум  $\pi \rightarrow \pi^*$ -смуги, так що остання виявляє більш розвинену структуру в полярних розчинниках.

УФ-спектри 5-(4-піридил)-4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (V) і 5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (VI) у воді, етанолі, 0,1 М HCl, 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> характеризуються також трьома смугами поглинання. Перша смуга має максимуми в межах 214-218 нм, друга – 247-260 нм, третя – 290-340 нм. Лужні розчини (0,1 М NaOH) сполуки (I) характеризуються двома смугами поглинання з максимумами, відповідно, при 240 та 310 нм.

Таким чином, на підставі даних наукової літератури та результатів наших досліджень можна зробити певні висновки, які стосують-

ся інтерпретації природи смуг 5-(4-піридил)-4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (V) і 5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (VI).

Перша смуга ( $\lambda_{\text{макс}}$  214-218 нм), за класифікацією Klevenis і Platt [11], є типовою  ${}^1L_a$ -смугою, яка зумовлена локальним збудженням електронів у циклі піридиніл-4. Максимуми в межах 247-260 нм є результатом  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходів електронів, тобто  ${}^1L_b$ -смугою, з одночасним накладанням на неї  $n \rightarrow \pi^*$ -переходів, що властиві не тільки 1,2,4-тріазол-3-тіону, а також 4-піридиновою циклу. Треті смуги поглинання тіонів (V-VI) мають характерні максимуми в межах 290-340 нм. Виходячи із загальних переходів електронів у молекулі сполуки (I) в цілому, можна сказати, що дана смуга є результатом р- $\pi$ -спряження між тріазоловим і 4-піридиновим циклами. Це пов'язано із взаємодією неподілених пар  $\pi$ -електронів обох циклів, що призводить до утворення єдиної делокалізованої електронної хмари, яка і є р- $\pi$ -спряженням [7]. Напевно, збільшення розмірів єдиної електронної системи і призводить до батохромного зміщення цієї смуги, особливо в етанолі, 0,1 М НСІ та 0,1 М NaOH, тим більше відомо, що атоми або атомні угруповання, які мають неподілені електронні пари, як у нашому випадку, є аукохромними, тому викликають довгохвильове зміщення одночасно з гіпсохромним ефектом [12, 13].

УФ-спектр 5-(4-нітрофеніл)-4-(феніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (VII) в етанолі мають три максимуми з доволі чіткими положеннями при 210, 264 та 357 нм.

Крім пояснення характеру смуг поглинання тіонів (II-VII) і у зв'язку з наявністю в молекулі 1,2,4-тріазолу тіонного субституєнта по  $C_3$ , необхідно виявити можливість існування вищевказаних молекул у тіон-тіольних таутомерних формах.

Таутомерія являє собою динамічну ізомерію, оскільки таутомери легко перетворюються один в одного у розчинах. УФ-спектрофотометричний метод можна з успіхом застосувати для вивчення процесів встановлення рівноваги у тих випадках, коли ізомеризації підлягає хроматофорна група, тобто відбувається міграція подвійного зв'язку. Такий процес супроводжується суттєвими змінами в електронних спектрах. Так, у нашому випадку при тіон-тіольній таутомерії відбувається перехід від хроматофора тіонної групи до ізольованого подвійного зв'язку заміщеної тіольної групи (рис. 6).

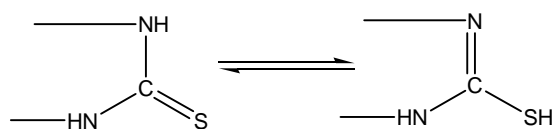


Рис. 6. Тіон-тіольна таутомерія ізольованого фрагмента 1,2,4-тріазол-3-тіону.

Таким чином, виходячи із структури досліджуваних речовин, можна передбачити, що вони проявляють тіон-тіольну таутомерію (рис. 7).

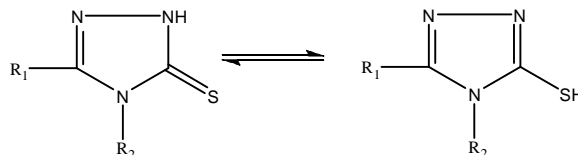


Рис. 7. Тіон-тіольні форми таутомерії 4-феніл-1,2,4-тріазол-3-тіону (II), 4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (III), 4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (IV), 5-(4-піридил)-4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (V), 5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (VI) і 5-(4-нітрофеніл)-4-(феніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (VII).

Найбільш характерною смугою поглинання для УФ-спектрів тіонів (II-VII) є смуга, яка перебуває в межах 240 (0,1 М NaOH), 260 нм (1 М  $H_2SO_4$ ). Ця смуга є результатом  $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходів з одночасним накладанням на неї  $n \rightarrow \pi^*$ -переходу, що властивий 1,2,4-тріазол-3-тіону [5]. Загальновідомо [2], що сполуки, які містять у своїй структурі таку ненасичену групу, як  $C=S$ , мають смуги поглинання, зумовлені синглет-синглетними  $n \rightarrow \pi^*$ -переходами.

Віднесення смуги поглинання з максимумами в межах 240-260 нм до певного електронного переходу можна добре проілюструвати на прикладі тіон-тіольного хромофора (рис. 5), який містить  $\sigma$ -,  $\pi$ - та  $n$ -електрони. Цей ізольований фрагмент молекули 1,2,4-тріазол-3-тіону в основному стані має плоску будову, і валентні електрони розподіляються по таким орбіталям, як:

- а) симетрична та антисиметрична зв'язувальні  $\sigma$ -орбіти групи C-N;
- б) зв'язувальна  $\sigma$ -орбіта групи C=S;
- в) зв'язувальна  $\pi$ -орбіта групи C=S;
- г) незв'язувальні орбіти неподілених пар атома сульфуру.

Одна з неподілених пар електронів атома сульфуру розміщена на р-орбіті ( $n_p$ ), друга займає гібридну  $sp$ -орбіту ( $n_{sp}$ ).

Найвищими зайнятими орбітами будуть незв'язувальні  $\pi$ - і  $sp$ -орбіти та зв'язувальні  $\sigma$ -орбіти.

Найнижчою незайнятою орбітою зазначеного фрагмента молекули буде розпушувача  $\sigma$ -орбіта C=S ( $\sigma^*$ ).

Можливі електронні переходи, які відбуваються в ізольованому фрагменті молекули, наведені на рисунку 8.

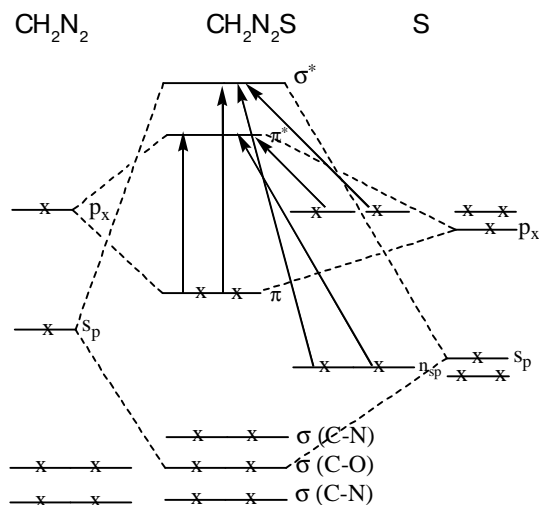
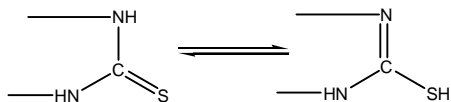


Рис. 8. Схема енергетичних рівнів ізольованого тіон-тіольного фрагмента



На основі даних, наведених на рисунку 8, можна зробити висновок, що смуга поглинання, яка спостерігається в спектрі сполуки (I) при  $\lambda_{\text{макс}}$  240-260 нм, належить переходу з незв'язувальної р-орбіти на розпушуючу  $\pi^*$ -орбіту, так званому  $n \rightarrow \pi^*$ -переходу.

Таким чином, на підставі вищезгаданого можна стверджувати, що інтенсивність і положення максимуму смуги в межах 240-260 нм безпосередньо пов'язані з тіон-тіольною таутомерією тіонів (II-VII).

В етанольному розчині переважає тіонна форма сполуки, основний максимум поглинання якої знаходиться при 250 нм. У лужному розчині (0,1 М NaOH) тіон-тіольна рівновага, ймовірно, зміщується в сторону тіольної форми з  $\lambda_{\text{макс}}$  240 нм, а  $\Delta\lambda_{\text{макс}}$  складає 10 нм. Таким чином, максимуми основної смуги тіонів

(II-VII) знаходяться  $\approx 250$  нм. Виходить, що і в нейтральному розчиннику (вода) ця сполука також існує у вигляді тіонної форми, максимуми якої знаходяться при 247 нм, а  $\Delta\lambda_{\text{макс}}$  становить 3 нм.

Ізольований тіон-тіольний таутомер можна також розглянути як S-H кислоти [13], тому в кислих розчинниках (0,1 М HCl та 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) тіони (II-VII) мають переважно вигляд тіольного таутомеру [14]. Цей висновок підтверджується також тим фактом, що із збільшенням полярності розчинника  $n \rightarrow \pi^*$ -смуга проявляє батохромний зсув на 10 нм. У малополярному розчиннику (н-гексан) максимум  $\approx 250$  нм не спостерігається.

У кислих розчинах (0,1 М HCl і 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) тіони (II-VII) характеризуються основним максимумом в усіх випадках при  $\approx 262$  нм. Безумовно, що і в цьому випадку тіони (II-VII) існують у формі тіольного таутомеру.

**ВИСНОВКИ.** 1. Вивчено УФ-спектри поглинання 4-феніл-1,2,4-тріазол-3-тіону (II), 4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (III), 4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (IV), 5-(4-піридил)-4-(2-метилфеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (V), 5-(4-піридил)-4-(2-метоксифеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (VI) і 5-(4-нітрофеніл)-4-(феніл)-1,2,4-тріазол-3-тіону (VII) в розчинниках різної полярності (вода, етанол, 0,1 М HCl, 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 М NaOH, н-гексан).

2. Встановлено, що УФ-спектрам досліджуваних сполук у всіх випадках властиві три смуги поглинання, положення максимумів та їх спектральні характеристики залежать від використаних розчинників.

3. Вивчено тіон-тіольну таутомерію всіх досліджуваних сполук. При цьому встановлено, що у нейтральних розчинниках дані речовини існують переважно у тіонній формі, у лужному розчині рівновага зміщується в сторону тіольної форми з утворенням s-натрієвого похідного. Всі сполуки у кислих розчинниках існують здебільшого у тіольній формі.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Дайер Джон Р. Приложения абсорбционной спектроскопии органических соединений. – М.: Химия, 1970. – С. 164.
2. Казлицына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии: Учебное пособие для вузов. – М.: Высшая школа, 1971. – 264 с.

3. Мейсон С.Ф. Электронные спектры поглощения гетероциклических соединений // Физические методы химии гетероциклических соединений / Под ред. А. Катрицкого. – М., 1966. – С. 319-393.

4. Несмеянов А.Н., Несмеянов М.А. Начало органической химии: В 2 т. – М.: Химия, 1974. – Т. 1. – 623 с.; Т. 2. – 744 с.

5. Пальм В.А. Введение в теоретическую органическую химию. – М.: Высшая школа, 1974. – 446 с.
6. Сайдов Т.В., Свердлова О.В. Практическое руководство по молекулярной спектроскопии. – Л.: Изд-во ЛТУ, 1980. – 136 с.
7. Свердлова О.В. Электронные спектры в органической химии. – Ленинград: Химия, 1985. – 248 с.
8. Сильверштейн Р., Баслер Т., Моррил Т. Спектрометрическая идентификация органических соединений. – М.: Мир, 1977. – 590 с.
9. Штерн Э., Тимонс К. Электронная абсорбционная спектроскопия в органической химии. – М.: Мир, 1974. – 214 с.
10. Эйдус Я.А., Экмане А., Вентер К., Гиллер С.А. Атлас электронных спектров 5-нитрофурановых соединений – Рига: Зинантне, 1968. – 256 с.
11. Klevens H.B., Platt J.R. Spectral resemblance of cata-condensed hydrocarbons // J. Chem. Phys. – 1949. – **17**, № 5. – P. 470-481.
12. Nachod F.C., Phillips W.D. (Ed.). Determination of organic structures by Physical methods. – N.I.-L.: Acad. Press., 1962. – 772 p.
13. Phillips I.P. Spectra – Structure Correlation. – N.I.-L., 1964. – 172 p.
14. Platt I.R. Wavelength formulas and configuration interaction in brooker dyes chain molecules // J. Chem. Phys. – 1956. – **25**, № 1. – P. 80-105.

## СПЕКТРАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА 5-R-4-R<sub>1</sub>-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТИОНОВ

**А.Г. Каплаушенко, А.И. Панасенко, Е.Г. Кныш, Т.В. Панасенко**  
ЗАПОРІЖСЬКИЙ ГОСУДАРСТВЕННИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

### Резюме

*Изучены УФ-спектры поглощения 5-R-4-R<sub>1</sub>-1,2,4-триазол-3-тионов в растворителях различной полярности (вода, этанол, 0,1 М НСl, 1 М Н<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 М NaOH, n-гексан). Установлено, что УФ-спектры исследуемых соединений во всех случаях характеризуются тремя полосами поглощения, положения максимумов и их спектральные характеристики зависят от использованных растворителей. Также изучена тион-тиольная таутомерия указанных выше соединений.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** 5-R-4-R<sub>1</sub>-1,2,4-триазол-3-тионы, УФ-спектры, спектральная характеристика, тион-тиольная таутомерия.

## SPECTRAL CHARACTERISTICS OF 5-R-4-R<sub>1</sub>-1,2,4-TRIAZOL-3-THIONS

**A.G. Kaplaushenko, O.I. Panasenko, Ye.H. Knysh, T.V. Panasenko**  
ZAPORIZHYAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

### Summary

*We have studied UV-spectra of 5-R-4-R<sub>1</sub>-1,2,4-triazol-3-thions absorption in dissolvents of various polarity (water, ethanol, 0,1 M HCl, 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 M NaOH, n-hexane). It has been established that UV-spectra of studied compounds are characterised in all cases by three strips of absorption, positions of maximums and their spectral characteristics depend on the used dissolvents. We have also studied thion-thiol tautomerism of mentioned compounds.*

**KEY WORDS:** 5-R-4-R<sub>1</sub>-1,2,4-triazol-3-thions, UV-spectra, spectral characteristics, thion-thiol tautomerism.

Отримано 4.11.2008 р.

**Адреса для листування:** А.Г. Каплаушенко, Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПІРИДОКСИНУ ГІДРОХЛОРИДУ В 0,2 % РОЗЧИНІ АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ

О.А. Євтіфєєва, О.А. Здорик, В.А. Георгіянц  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

*Проведено розробку та валідацію аналітичної методики кількісного визначення піридоксину гідрохлориду в 0,2 % водному розчині, виготовленого в умовах аптеки. Валідацію методики здійснювали за схемою, що наведена в ДФУ. При дослідженні були розглянуті такі валідаційні характеристики: діапазон застосування, специфічність, лінійність, робастність, збіжність, правильність, прецизійність, що дозволило визначити придатність методики для використання у фармацевтичному аналізі.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** спектрофотометричне визначення, валідація аналітичної методики, піридоксину гідрохлорид.

ВСТУП. Введення в Україні якісно нової методології організації системи контролю якості ліків вимагає підтвердження того, що аптеки та лабораторії з контролю якості лікарських засобів можуть з достатньою точністю виконувати аналіз. Тобто спеціалісти практичної фармації повинні проводити аналіз та робити висновки про якість ліків, що виготовлені в аптеці, на підставі затверджених державними органами валідованих методик. Як відомо, розробка експресних та відтворюваних методик якісного і кількісного визначення для аптечних форм ліків є одним з найважливіших завдань сучасного фармацевтичного аналізу, тому метою нашої роботи були розробка та валідація спектрофотометричної методики кількісного визначення піридоксину гідрохлориду в 0,2 % водному розчині аптечного виготовлення. Розчин піридоксину гідрохлориду 0,2 % призначений для внутрішнього застосування, його використовують з метою корекції судом, зумовлених метаболічним порушенням, у новонароджених.

При розробці спектрофотометричної методики особливу увагу приділяли вивченню спектральних характеристик піридоксину гідрохлориду, стабільності аналітичних розчинів у часі та стійкості значення оптичної густини при зміні  $\text{pH} \pm 10$  %. Згідно з даними літератури, на світлі в лужних та нейтральних розчинах піридоксину гідрохлорид швидко руйнується, а в 0,1 М розчині хлористоводневої кислоти порівняно стійкий. Таутомірні властивості піридоксину підтверджуються мінімальною його абсорбційного спектра в ультрафіолетовому світлі при різних  $\text{pH}$ : за  $\text{pH} 2,0$  крива

має максимум при 292,5 нм; за  $\text{pH} 4,0$  значення оптичної густини підвищується та з'являється новий максимум при 327,5 нм; за  $\text{pH} 6,0$  максимум при 292,5 нм зникає і з'являється максимум при 256 нм [12]. З огляду на це, вимірювання оптичної густини було доцільно проводити у середовищі 0,1 М хлористоводневої кислоти для досягнення стабільності розчинів та стійкості оптичної густини до зміни значення  $\text{pH} \pm 10$  %.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Для проведення досліджень використовували субстанцію піридоксину гідрохлориду, яка відповідає вимогам ВР 98, USP 24, ДФУ. Для роботи застосовували мірний посуд класу А, реактиви, які відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги АВ 204 S/A METTLER TOLEDO,  $\text{pH}$ -метр РВ-11 фірми "Sartorius AG" (Німеччина), спектрофотометр "SPECORD 200", спектрофотометр 46 "Ломо".

*Методика спектрофотометричного визначення піридоксину гідрохлориду:* 5 мл 0,2 % розчину переносять у мірну колбу місткістю 50 мл та доводять об'єм до мітки 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти (розведення А). 5 мл розведення А переносять у мірну колбу місткістю 100 мл і доводять об'єм до мітки 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти. Оптичну густину аналітичного розчину вимірюють за довжини хвилі 292 нм відносно розчинника – 0,1 М хлористоводневої кислоти. Вимірювання оптичної густини проводять тричі з вийманням кювети.

*Розчин робочого стандарту:* 0,1 г піридоксину гідрохлориду (точна наважка) переносять у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 70 мл води Р, після повного розчинення кристалів піридоксину гідрохлориду доводять об'єм во-

© О.А. Євтіфєєва, О.А. Здорик, В.А. Георгіянц, 2009.

дою Р до мітки та знову перемішують. 1 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу на 100 мл та доводять об'єм до мітки 0,1 М розчином хлористоводневої кислоти.

Розрахунок концентрації  $C_x$  аналізованого компонента проводять за формулою:

$$C_x = \frac{A_i \times C_0 \times b \times 100}{A_{st} \times a} = \frac{A_i \times 0,001 \times 50 \times 100 \times 100}{A_{st} \times 5 \times 5 \times a}$$

де  $A_i$  – оптична густина випробуваного розчину;

$A_{st}$  – оптична густина стандартного розчину;

$C_0$  – концентрація розчину стандартного зразка (г/мл);

$b$  – розведення (мл);

$a$  – наважка для аналізу (г).

Приготування модельних розчинів. Було приготовлено 5 модельних розчинів піридоксину гідрохлориду з точними наважками таких концентрацій: 80; 90; 100; 110; 120 %. Розчини готували за такою схемою: точну наважку поміщали у мірну колбу місткістю 100 мл і додавали близько 70 мл води Р, після розчинення субстанції доводили об'єм розчину до 100 мл.

Приготування аналітичних розчинів. З кожного модельного розчину та розчину стандарту готували по три аналітичні розчини за методикою, наведеною вище, таким чином сумарна кількість випробувань становила  $n=15$ .

Розчин плацебо (blank) для спектрофотометричної методики – 0,1 М розчин хлористоводневої кислоти.

Вимірювання оптичних густин випробуваного розчину і розчину порівняння проводили з використанням кювети з товщиною шару 1 см при температурі  $(20 \pm 2)$  °С за одних і тих самих умов з мінімальним інтервалом у часі.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Діапазон застосування методики. При проведенні спектрофотометричного визначення піридоксину гідрохлориду було обрано діапазон застосування методики від 80 до 120 %, враховуючи вміст піридоксину гідрохлориду й вимоги АНД у випадку 0,2 % розчину  $\pm 8$  % [11].

Розрахунок критеріїв прийнятності методики здійснювали відповідно до вимог ДФУ [9, 10], враховуючи стандартизовану процедуру проведення валідації [5]: максимальної допустимої повної невизначеності  $\max \Delta_{As} = 2,56$  %; максимальної систематичної похибки  $\max \delta = 0,8192$  %; критичне значення залишкового стандартного відхилення  $RSD_0^{1\%} = 1,4456$ ; критичне значення індексу кореляції  $R_c^{1\%} = 0,9951$ ; критичне

значення практичної невизначеності вільного члена лінійної залежності  $a_{1\%} = 4,096$ .

Щоб оцінити похибку пробопідготовки модельних розчинів та розчину робочого стандарту, були розраховані теоретичні значення невизначеності аналітичних операцій [1, 2, 5]. Розрахунок повної невизначеності проводили за формулою [11]:  $\Delta_{As} = \sqrt{(\Delta_{SP}^2 + \Delta_{FAO}^2)}$ .

Повна невизначеність пробопідготовки для даної спектрофотометричної методики становила:  $\Delta_{sp} = 1,103$  %.

Для підтвердження специфічності розраховували систематичну похибку, яку вносить розчинник, тобто вклад плацебо. Критерієм незначущості впливу плацебо є виконання нерівності:

$$d_{exc} \leq 0,32 \cdot \max d = 0,32 \cdot 0,32 \cdot \max \Delta_{As} = 0,033 \cdot B,$$

де  $B = \pm 8$  %, тобто  $d_{exc} \leq 0,26$  %

Вимірювали оптичну густина розчину плацебо та робочого стандарту. Отримані значення оптичних густин розчину плацебо та стандарту для спектрофотометричної методики:  $A_{blank} = 0,002$ ;  $A_{st} = 0,399$ , отже  $\delta_{exc} = 100 \cdot 0,002 / 0,399 = 0,5$  %.

На стадії розробки аналітичної методики, згідно зі статтею ДФУ “Валідація аналітичних методик”, необхідно перевірити її робастність, тобто стійкість методики до малих змін умов проведення експерименту: стабільність аналітичних розчинів у часі та вплив рН на коливання оптичної густини [3, 4]. З огляду на отримані дані, після їх статистичної обробки, стабільність випробуваного розчину та розчину робочого стандарту характеризується довірчим інтервалом  $\pm 0,66$  % і  $\pm 0,68$ , що не перевищує припустиме критичне значення  $\max \delta = 0,82$  % та свідчить про те, що аналітичні розчини досить стабільні (табл. 1).

Для вивчення впливу рН середовища штучно створювали коливання рН  $\pm 10$  % [7]. Аналітичні розчини мають кисле середовище – рН 1,2, тому інтервал відхилень складає 1,1–1,3 рН. Коливання рН відтворювали штучно, додаючи по 1–2 краплі 0,1 М розчину НСІ або 0,1 М розчину NaOH. В експерименті виявили, що вплив коливань не змінює величини оптичної густини та не перевищує максимальну невизначеність методики (табл. 2).

Дослідження лінійності аналітичної методики проводили на п'яти модельних лікарських формах з урахуванням рівномірного розкиду концентрацій 0,2 % піридоксину гідрохлориду від номінального вмісту за прописом на всьому діапазоні застосування методики (80, 90,

Таблиця 1 – Вивчення стабільності аналітичного розчину для спектрофотометричної методики

№ розчину	Термін дослідження стабільності t, хв					середнє	RSD <sub>t</sub> , %	Δt, %	maxδ, %
	0	15	30	45	60				
A <sub>st</sub> <sup>*</sup>	0,3990	0,3970	0,3977	0,3957	0,3980	0,3975	0,31	0,66	0,82
A <sub>x</sub> <sup>*</sup>	0,4010	0,4017	0,3990	0,3987	0,4003	0,4001	0,32	0,68	

Примітка. A<sub>st</sub><sup>\*</sup> та A<sub>x</sub><sup>\*</sup> – середнє значення оптичних густин трьох результатів для стандартного та модельного розчинів.

Таблиця 2 – Вплив рН на поглинання оптичної густини аналітичними розчинами

№ розчину	Оптичні густини A і середнє трьох вимірів			середнє	SpH	RSDpH, %	ΔpH, %	maxδ, %
	Випробування							
	1 – 0,1 M HCl	2 – без додавання	3 – 0,1 M NaOH					
2	0,3630	0,3610	0,3623	0,3621	0,0010	0,10	0,30	0,82
3	0,4040	0,4010	0,3997	0,4016	0,0022	0,22	0,65	
4	0,4437	0,4407	0,4413	0,4419	0,0016	0,16	0,46	

100, 110, 120 %) за схемою згідно з вимогами ДФУ [8]. Одержані результати для методики визначення розчину наведено у таблиці 3.

Таблиця 3 – Результати вивчення лінійності модельних розчинів

Метрологічні характеристики	Результати та параметри
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності b	1,0010
S <sub>b</sub>	0,0055
Вільний член лінійної залежності a	0,4188
Критичне значення для вільного члена a	4,096
S <sub>a</sub>	0,5552
Коефіцієнт кореляції методики r	0,9998
Критерій лінійного коефіцієнта кореляції R <sub>c</sub>	0,9951
Залишкове стандартне відхилення S <sub>o</sub>	0,3018
Критичне значення залишкового стандартного відхилення, RSD <sub>o</sub> <sup>1%</sup>	1,4456
Висновок	Відповідає

Графік лінійності (рис. 1) зображено у нормалізованих координатах [6]. Одержані результати свідчать про виконання вимог до параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методик підтверджується на всьому діапазоні концентрацій (80-120 %).

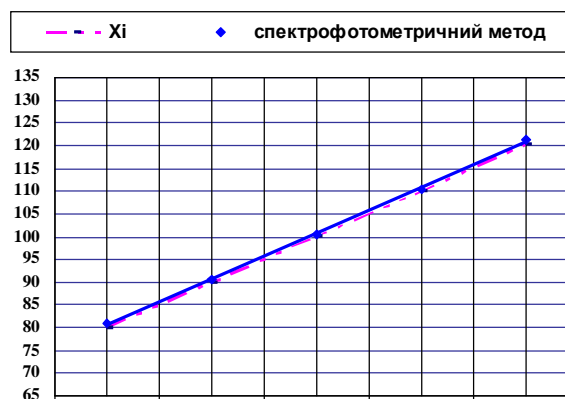


Рис. 1. Графік лінійної залежності оптичної густини від концентрації піридоксину гідрохлориду в діапазоні визначення.

Правильність та збіжність методики вивчали за результатами аналізу тих самих модельних розчинів. Одержані результати для методики наведено у таблиці 4. Результати вивчення правильності та збіжності не перевищують критеріїв прийнятності методики і відповідають вимогам до параметрів правильності та збіжності.

Відтворюваність оцінювали шляхом проведення міжлабораторних досліджень. Розраховували середнє значення концентрації піридоксину гідрохлориду в лікарській формі за експериментальними даними двох лабораторій Z<sub>intra</sub><sup>\*</sup>, об'єднане відносне стандартне

відхилення RSD<sub>Zintra</sub><sup>\*</sup>, міжлабораторну систематичну погрішність δ<sub>Zintra</sub><sup>\*</sup>, відносний довірчий інтервал середнього значення Δ<sub>intra</sub><sup>\*</sup>. Результати статистичної обробки отриманих експериментальних даних наведено у таблиці 5.

**ВИСНОВКИ.** 1. Запропоновано статистично обґрунтовану раціональну методику кількісного визначення 0,2 % розчину піридоксину гідрохлориду.

2. Здійснено процедуру валідації запропонованої методики кількісного визначення 0,2 % розчину піридоксину гідрохлориду за валі-



Таблиця 4 – Правильність та збіжність аналітичної методики

№ модельного розчину	Наважки піридоксину гідрохлориду, г	Введено у % до концентрації розчину порівняння ( $X_{\text{факт}}\%$ )	Оптичні густини $A_i$ ( $A_{\text{ст}}=0,399$ )	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння ( $Y_i\%$ )	Знайдено у % до введеного $Z_i=100(Y_i/X_i)$
1	0,1603	80,15	0,323	80,95	101,00
2			0,322	80,70	100,69
3			0,323	80,95	101,00
4	0,1801	90,05	0,361	90,48	100,47
5			0,360	90,23	100,19
6			0,362	90,73	100,75
7	0,2003	100,15	0,401	100,50	100,35
8			0,402	100,75	100,60
9			0,400	100,25	100,10
10	0,2203	110,15	0,440	110,28	100,11
11			0,440	110,28	100,11
12			0,442	110,78	100,57
13	0,2406	120,30	0,483	121,05	100,63
14			0,483	121,05	100,63
15			0,484	121,30	100,83
середнє Z%					100,54
відносне стандартне відхилення, Sz%					0,3062
відносний довірчий інтервал $\Delta s\%=t(95\%, 14)*Sz$					0,5393
критичне значення для збіжності результатів $\Delta s\%$					2,56
систематична похибка $\delta$					0,54
критерій невизначеності систематичної					0,82
загальний висновок про методику					коректна

Таблиця 5 – Результати вивчення відтворюваності аналітичної методики

№ модельного розчину	Введено у % до концентрації розчину порівняння ( $X_{\text{факт}}\%$ )		Знайдено у % до концентрації розчину порівняння ( $Y_i\%$ )		Знайдено у % до введеного $Z_i=100(Y_i/X_i)$	
	випробування		випробування		випробування	
	лаб. 1	лаб. 2	лаб. 1	лаб. 2	лаб. 1	лаб. 2
1	80,15	80,15	80,95	80,65	101,00	100,63
2			80,70	80,90	100,69	100,94
3			80,95	80,40	101,00	100,31
4	90,05	90,05	90,48	90,20	100,47	100,17
5			90,23	89,95	100,19	99,89
6			90,73	89,95	100,75	99,89
7	100,15	100,15	100,50	100,25	100,35	100,10
8			100,75	100,50	100,60	100,35
9			100,25	100,00	100,10	99,85
10	110,15	110,15	110,28	110,05	100,11	99,91
11			110,28	110,30	100,11	100,14
12			110,78	109,80	100,57	99,68
13	120,30	120,30	121,05	120,85	100,63	100,46
14			121,05	120,60	100,63	100,25
15			121,30	121,11	100,83	100,67
Середнє					100,54	100,22
Об'єднане середнє Z					100,38	
Відносне стандартне відхилення, $Sz_i\%$					0,31	0,35

Об'єднане відносне стандартне відхилення	0,33
Відносний довірчий інтервал середнього значення $D_{intra}$	0,04
Критичне значення для прецизійності результатів	2,56
Міжлабораторна систематична погрішність $d_{z\text{intra}}$	0,38
Критерій невизначеності систематичної похибки	0,82

даційними характеристиками (робасність, лінійність, правильність, стабільність, прецизійність, збіжність, відтворюваність, невизначеність пробопідготовки). За отриманими да-

ними зроблено висновок: методика відповідає вимогам ДФУ, може бути коректно відтворена та придатна для використання в аптечних умовах.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Беликов В.Г. Фармацевтическая химия: В 2 т. – 2-е изд. – М.: Высшая школа, 1993. Петригорск, 1996. – Т. 1. – 432 с; Т. 2. – 608 с.
2. Вимоги до виготовлення стерильних лікарських засобів в умовах аптек / За ред. О.І. Тихонова, Т.Г. Ярних. – К.: МОЗ України, 2005. – 76 с.
3. Государственная Фармакопея СССР. – 10-е изд. – М.: Медицина, 1968. – 1080 с.
4. Государственная Фармакопея Украины в системе контроля качества экстермпоральных лекарственных средств / Терно И.С., Тихонов А.И., Гризодуб А.И. и др. // Фармаком. – 2005. – № 2/3. – С. 104-115.
5. Гризодуб А.И. Валидация спектрофотометрических методик количественного анализа лекарственных средств в соответствии с требованиями ГФУ // Фармаком. – 2002. – № 3. – С. 42-50.
6. Гризодуб А.И. Стандартизованные процедуры валидации методик контроля качества лекарственных средств // Фармаком. – 2006. – № 1/2. – С. 35-44.
7. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В., Подпружников Ю.В. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 3-17.
8. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків: PIPEГ, 2001. – 556 с.
9. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – Доповнення 1. – Харків: PIPEГ, 2004. – 520 с.
10. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – Доповнення 2. – Харків: PIPEГ, 2008. – 608 с.
11. Про затвердження Правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки: Наказ МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. (зі змінами та доповненнями) // Юридичні аспекти фармації. – Х., 2006. – Т. 3. – С. 49-59.
12. Шнайдман Л.О. Производство витаминов. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 437 с.

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПИРИДОКСИНА ГИДРОХЛОРИДА В 0,2 % РАСТВОРЕ АПТЕЧНОГО ПРИГОТОВЛЕНИЯ

О.А. Евтифеева, А.А. Здорик, В.А. Георгиянц  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

#### Резюме

Проведены разработка и валидация аналитической методики количественного определения пиридоксина гидрохлорида в 0,2 % водном растворе, приготовленного в условиях аптеки. Валидацию методики осуществляли согласно схеме, которая приведена в ГФУ. При исследовании были рассмотрены следующие валидационные характеристики: диапазон применения, специфичность, линейность, робасность, сходимость, правильность, прецизионность, что позволило определить пригодность методики для использования в фармацевтическом анализе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: спектрофотометрическое определение, валидация аналитической методики, пиридоксина гидрохлорид.

**SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF PYRIDOXINE  
HYDROCHLORIDE IN 0,2 % WATER SOLUTION OF MANUFACTURING EX  
TEMPORE**

**O.A. Yevtifeyeva, O.A. Zdoryk, V.A. Georgiyants**  
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY

**Summary**

*The development and validation of analytical method of quantitative determination of pyridoxine hydrochloride in 0,2 % water solution of manufacturing ex tempore has been carried out. The validation of analytical method was carried out according to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine and modern normative documentation. The following validation characteristics were considered: range of use, specificity, linearity, robustness, precision that has allowed to define the ability of the method for use in the pharmaceutical analysis.*

**KEY WORDS: spectrophotometric determination, validation of analytical methods, pyridoxine hydrochloride.**

Отримано 18.05.2009 р.

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

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ФАРМАКОКІНЕТИКИ МЕТАБОЛІЧНОЇ НИЗКИ ‘ЕТАНОЛ-АЦЕТАЛЬДЕГІД-АЦЕТАТ’

**В.Б. Ларіонов, І.Ю. Борисюк, Н.В. Овчаренко, О.Б. Ліхота**  
 ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О.В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, ОДЕСА

*Проведено порівняльний аналіз фармакокінетичних показників етанолу та його головних метаболітів – ацетальдегіду та ацетату після їх внутрішньовенного введення білим мишам. Визначено відмінності в кінетичних показниках розподілу цих сполук між центральною та периферичною камерами й елімінації з організму. Відсутність пропорційності даних показників для речовин, які вивчали, свідчить про нелінійність процесів їх масопереносу.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** етанол, ацетальдегід, ацетат, масоперенос, нелінійна фармакокінетика.

**ВСТУП.** Метаболічні перетворення є звичайним процесом, якому піддаються як чужорідні речовини, що проникають з навколишнього середовища до організму, так й ендогенні сполуки [1]. Зазвичай, біотрансформація є процесом, спрямованим на зменшення біологічної активності (у разі біологічноактивних сполук – токсинів, ліків тощо) та прискорення їх екскреції з організму [2]. Однак, існує велика кількість прикладів, коли завдяки даним процесам утворюються активні у фізіологічному відношенні метаболіти, наприклад, токсичний формальдегід з метанолу [6, 7]. Визначення напрямку цих процесів, а також кінетичних характеристик як вихідної речовини, так й її метаболітів є однією з важливих проблем фармакології та токсикології, оскільки на підставі цих даних виникає можливість ефективного проведення фармакотерапевтичних та протитоксичних заходів. Беручи до уваги значне як соціальне, так і промислове споживання етанолу, актуальною метою даної роботи було порівняльне вивчення фармакокінетичних показників етанолу та його основних метаболітів – ацетальдегіду та оцтової кислоти».

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Експерименти проводили на білих безпородних мишах-самцях (22-24 г), яких утримували в умовах вільного доступу до води та при депривації їжі за 24 год до початку експерименту.  $^{14}\text{C}$ -етанол (20 мМоль/кг),  $^{14}\text{C}$ -ацетальдегід (10 мМоль/кг) та  $^{214}\text{C}$ -оцтову кислоту (2 мМоль/кг) вводили внутрішньовенно (у хвостову вену) у вигляді

розчину в 0,9 % NaCl. Через певний час тварин декапітували, відбираючи проби крові у попередньо гепаринізовані пробірки та центрифугуючи протягом 15 хв (2 тис. об./хв) для видалення формених елементів крові. 0,2 см<sup>3</sup> отриманої плазми крові переносили у віали для рідинної сцинтиляційної фотометрії, додавали 0,3 см<sup>3</sup> Тритон X-100, 10 см<sup>3</sup> толуол-спиртового сцинтилятора та визначали загальну радіоактивність на рідинному сцинтиляційному фотометрі Canberra PACKARD TRI-CARB 2700. Одержані результати оброблено статистично за допомогою пакета програм MS Excel.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Внутрішньовенне введення етанолу, ацетальдегіду та оцтової кислоти характеризується швидким їх розподілом із центральної камери (плазма крові). Зниження концентрації радіоактивних метаболітів має двофазний характер з чітко диференційованими фазами розподілу та елімінації (рис. 1). Також слід відмітити непропорційне зменшення концентраційного профілю радіоактивних продуктів при введенні етанолу та його кінцевого метаболіту – оцтової кислоти. Так, вміст радіоактивного матеріалу в плазмі крові після введення  $^{14}\text{C}$ -етанолу (20 мМоль/кг) значно вищий за такий при введенні оцтової кислоти (2 мМоль/кг) – майже у 100 разів, тоді як у випадку ацетальдегіду (10 мМоль/кг) спостерігається дозозалежне зниження концентрації радіоактивного матеріалу. Така відсутність симбатності фармакокінетичних кривих послідовних метаболітів, що виявляють при введенні їх у нееквівалентних дозах, може бути наслідком нелінійних про-

© В.Б. Ларіонов, І.Ю. Борисюк, Н.В. Овчаренко, О.Б. Ліхота, 2009.

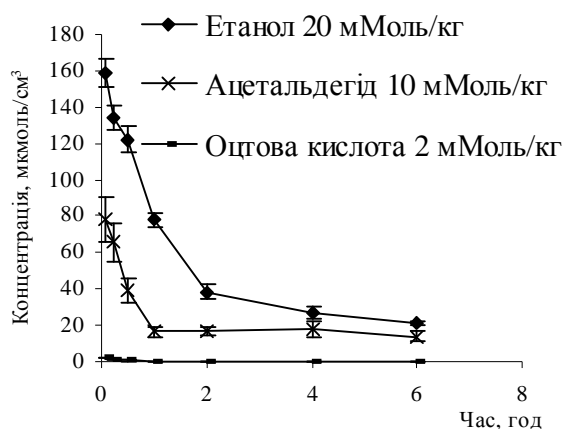


Рис. 1. Зміна концентрації радіоактивних продуктів у плазмі крові мишей після внутрішньовенного введення етанолу, ацетальдегіду або оцтової кислоти.

цесів біотрансформації етанолу до ацетальдегіду та, надалі, до оцтової кислоти. Так, відомо [3, 4], що вирішальну роль у метаболізмі етанолу відіграє алкогольдегідрогеназний шлях, по якому з етанолу утворюється ацетальдегід за умов, що концентрація етанолу не перевищує 80 мМоль [8]. Ацетальдегід, що утворюється, також швидко перетворюється в ацетат завдяки присутності високоактивних ацетальдегіддегідрогеназ [5], тоді як метаболізм ацетату

не має специфічних біохімічних шляхів, тому його концентрація в організмі після введення зменшується більшою мірою, ніж його метаболічних попередників.

Кількісну оцінку процесів масопереносу етанолу та його метаболітів здійснювали на підставі фармакокінетичних параметрів, що були розраховані за даними зміни вмісту радіоактивного матеріалу в плазмі крові мишей після введення відповідних радіоактивних сполук. Помітна значна різниця як у кінетичних показниках (міжкамерні константи обміну, комплексні параметри фаз розподілу та елімінації), так і в параметрах масопереносу (предекспоненційні коефіцієнти, об'єм розподілу та кліренс) фармакокінетичних процесів сполук, які вивчали (табл. 1). Так, значно відрізняються (з відсутністю дозозалежної пропорційності) предекспоненційні показники як фази розподілу та виведення, що відображає різний характер їх надходження із центральної камери (плазма крові) в інші органи. При переході від етанолу до ацетальдегіду та оцтової кислоти спостерігається значне збільшення параметра фази розподілу ( $\alpha$ ,  $0,86 \pm 0,05$  для етанолу,  $2,58 \pm 0,41$  для ацетальдегіду та  $5,14 \pm 0,80$  для ацетату), що є наслідком

Таблиця 1 – Фармакокінетичні параметри етанолу, ацетальдегіду та оцтової кислоти за умов їх внутрішньовенного введення

Фармакокінетичний параметр	Етанол 20 мМоль/кг	Ацетальдегід 10 мМоль/кг	Оцтова кислота 2 мМоль/кг
Предекспоненційний коефіцієнт, A	112,7±6,0	79,0 ±12,4	2,74 ± 0,42
Комплексний параметр $\alpha$ -фази, $\alpha$	0,86±0,05	2,58 ± 0,41	5,14 ± 0,80
Предекспоненційний коефіцієнт, B	50,8±5,1	19,0 ± 3,7	0,384 ± 0,033
Комплексний параметр $\beta$ -фази, $\beta$	0,15±0,02	0,042 ± 0,008	0,057 ± 0,005
Константа швидкості перенесення з периферичної камери у центральну, $k_{21}$ , год <sup>-1</sup>	0,371±0,059	0,53±0,19	0,684 ± 0,172
Константа елімінації із центральної камери, $k_{13}$ , год <sup>-1</sup>	0,349±0,069	0,204± 0,088	0,428±0,132
Константа швидкості перенесення з центральної камери в периферичну, $k_{12}$ , год <sup>-1</sup>	1,40±0,39	3,6±2,2	4,68±2,03
Кінетичний об'єм розподілу, $V_c$ , см <sup>3</sup> /кг	123±15	102±33	641±116
Об'єм розподілу периферичної камери, $V_{\beta}$ , см <sup>3</sup> /кг	284±48	493±202	4822±1221
Сталий об'єм розподілу, $V_{dss}$ , см <sup>3</sup> /кг	587±213	782±640	5025±2825
Загальний кліренс, $Cl_{\text{общ.}}$ , см <sup>3</sup> /год·кг	43±16	20,8±1,7	275±156
Період напіврозподілу, $t_{\alpha}$ 1/2, год	0,806±0,043	0,27±0,04	0,135±0,021
Період напівелімінації, $t_{\beta}$ 1/2, год	4,61±0,46	16,4±3,2	12,18±1,06
Площа під кривою, $AUC_{\text{заг.}}$ , мкмоль/см <sup>3</sup> ·год	424±50	456±123	7,2±0,9
Площа під кривою, $AUMC_{\text{общ.}}$ , мкмоль /см <sup>3</sup> ·год <sup>2</sup>	2314±265	10144±2725	118±15
Середній час утримання, MRT, год	5,5±0,9	22,2±8,4	16,4±3,0

збільшення здатності цих сполук до розподілу по тканинах та органах тварин після внутрішньовенного введення та проявляється значним зменшенням часу їх напіврозподілу. Разом із тим, збільшення часу напівелімінації ацетальдегіду ( $16,4 \pm 3,2$ ) год порівняно з етанолом ( $4,61 \pm 0,46$ ) год і середнього часу утримання, зважаючи на його високу реакційну здатність, може бути наслідком уповільнення процесів його елімінації з організму. В разі оцтової кислоти ( $12,18 \pm 1,06$ ) год тривалий час її елімінації з організму після внутрішньовенного введення обумовлений, можливо, тим, що у вигляді ацетату вона бере участь у різних біохімічних процесах. Аналіз констант міжкамерного обміну також дає змогу оцінити швидкість переходу цих речовин між відсіками швидкого та тривалого обміну. Відношення констант перенесення речовин із централь-

ної та периферичної камер ( $k_{12}/k_{21}$ ) для етанолу становить  $3,7 \pm 1,2$ , тоді як для ацетальдегіду та оцтової кислоти воно є практично однаковим –  $6,7 \pm 3,1$  та  $6,8 \pm 3,5$  відповідно, що відображає збільшення їх здатності до проникнення в інші тканини.

**ВИСНОВКИ.** Відсутність лінійної кореляції у фармакокінетичних параметрах етанолу та його послідовних метаболітів проявляється непропорційною зміною певних фармакокінетичних параметрів та є наслідком або зміни функціональної активності (ацетальдегід), або участі у багатьох біохімічних перетвореннях (оцтова кислота). Відсутність дозозалежності у фармакокінетичному профілі метаболічної низки “етанол-ацетальдегід-оцтова кислота” свідчить про нелінійність процесів їх масопереносу з плазми крові до органів та тканин.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Головенко Н.Я., Карасева Т.Л. Сравнительная биохимия чужеродных соединений. – К.: Наукова думка, 1984. – 200 с.
2. Головенко Н.Я. Физико-химическая фармакология. – Одесса: Астропринт, 2004. – 720 с.
3. Charles S., Lieber M.D. Alcohol and the liver: metabolism and its role in hepatic and extrahepatic diseases // The Mount Sinai J. Med. – 2000. – **67** (№ 1). – P. 84-94.
4. Eriksson C., Sippel H.W. The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation // Biochem. Pharmacol. – 1977. – № 26. – P. 241-247.
5. Quertemont E., Tambour S., Tirelli E. The role of acetaldehyde in the neurobehavioral effects of ethanol: A comprehensive review of animal studies // Progress in Neurobiology. – 2005. – № 75. – P. 247-274.
6. Roe O. Species differences in methanol poisoning // Crit. Rev. Toxicol. – 1982. – № 10. – P. 275-286.
7. Tephly T.R., McMartin K.E. Methanol metabolism and toxicity // In Aspartame. Physiology and Biochemistry (Stegink L.D. Filer L.J.Jr. Eds). – New York: Marcel Dekker, 1984. – P. 111-140.
8. Thrman R.G., McKenna W.R., McCaffrey T.B. Pathways responsible for the adaptive increase in ethanol utilization following chronic treatment with ethanol: inhibitor studies with the hemoglobin-free perfused rat liver // Mol. Pharmacol. – 1976. – **12** (1). – P. 156-166.

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФАРМАКОКИНЕТИКИ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ “ЭТАНОЛ-АЦЕТАЛЬДЕГИД-АЦЕТАТ”

**В.Б. Ларионов, И.Ю. Борисюк, Н.В. Овчаренко, Е.Б. Лихота**  
 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ А.В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ, ОДЕССА

#### Резюме

Проведен сравнительный анализ фармакокинетических показателей этанола и его основных метаболитов – ацетальдегида и ацетата после их внутривенного введения белым мышам. Установлены различия в кинетических показателях распределения этих соединений между центральной и периферической камерами и элиминации из организма. Отсутствие пропорциональности данных показателей для изучаемых веществ свидетельствует о нелинейности процессов их массопереноса.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** этанол, ацетальдегид, ацетат, массоперенос, нелинейная фармакокинетика.

# COMPARATIVE CHARACTERIZATION OF METABOLIC LINE “ETHANOL-ACETALDEHIDE-ACETATE” PHARMACOKINETICS

V.B. Larionov, I.Yu. Borysyuk, N.V. Ovcharenko, O.B. Likhota  
PHYSICS-CHEMICAL INSTITUTE BY O.V. BOHATSKY OF NAS OF UKRAINE, ODESSA

## Summary

*The comparative analysis of pharmacokinetic parameters of ethanol and its main metabolites – acetaldehyde and acetate after their intravenous administration in mice had been carried out. For these substances there were shown the differences in kinetic parameters of distribution between central and peripheral compartments, distribution and elimination from the organism. The non-linear dependence of these parameters is due to non-linear processes of their mass-transfer.*

KEY WORDS: **ethanol, acetaldehyde, acetate, mass-transfer, non-linear pharmacokinetics.**

Отримано 6.11.2008 р.

Адреса для листування: В.Б. Ларіонов, вул. І. Рабіна, 2, кв. 176, Одеса, 65076, Україна.

## СТАН СИСТЕМИ МІКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСНЕННЯ В ОРГАНІЗМІ ЩУРІВ ПІД ВПЛИВОМ ПРОСТИХ ПОЛІЕФІРІВ

В.І. Жуков, О.А. Наконечна  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

*Вивчено вплив простих поліефірів на стан системи мікросомального окиснення. Виявлено збільшення вмісту цитохрому Р-450, активності о-деметилази, НАДФН-цитохром с-редуктази, НАДН-цитохром с-редуктази мікросом гепатоцитів щурів порівняно з контролем.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** прості поліефіри, мікросомальне окиснення, цитохром Р-450, о-деметилаза, НАДФН-цитохром с-редуктаза, НАДН-цитохром с-редуктаза.

ВСТУП. Останнім часом на організм людини суттєво впливають несприятливі хімічні фактори, які можуть призвести до значних змін процесів метаболізму та викликати появу цілого ряду захворювань різної етіології. Тому вивчення механізмів біологічної дії ксенобіотиків та визначення їх небезпеки для організму є актуальною проблемою.

Об'єктом даного дослідження була група простих поліефірів (ППЕ), яка належить до поширених забруднювачів навколишнього середовища, що пов'язано з їх широким використанням у багатьох галузях народного господарства та медицини. Відомо, що одним із найважливіших процесів організму, які визначають біологічну активність ксенобіотиків, є їх біотрансформація. У цьому процесі беруть участь різні органи та тканини: печінка, легені, шкіра, нирки, клітини імункомпетентної системи [1, 2]. Але найбільш активно біотрансформація чужорідних сполук відбувається у печінці в системі мікросомального окиснення, яка здійснює процеси детоксикації, елімінації, а в деяких випадках – і метаболічної активації речовин [2].

Метою даної роботи було вивчення впливу ППЕ на активність системи мікросомального окиснення гепатоцитів в організмі щурів.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Дослідження виконано на 90 статевозрілих щурах-самцях популяції Вістар масою 200-220 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тваринам дослідних груп перорально за допомогою зонда щодня протягом 30 днів вводили водні розчини: ППЕ на основі пропіленгліколей (ПГ)

з молекулярною масою 192, 540, 1120, 2106 (ПГ-192, ПГ-540, ПГ-1120, ПГ-2106); ППЕ на основі гліцеролу (Гл) та ПГ з молекулярною масою 498, 1136 (ГлПГ-498, ГлПГ-1136); ППЕ на основі пентанолу (Пн) та ПГ з молекулярною масою 700, 790 (ПнПГ-700, ПнПГ-790). Розрахунок необхідної для введення дози речовини проводили, виходячи з даних про параметри їх токсичності. Встановлено, що найбільш оптимальною дозою для вивчення стану показників біохімічних процесів в організмі експериментальних тварин є 1/100 ДЛ<sub>50</sub>, яка, відповідно, складала: для ПГ-1120 – 0,048; ПГ-2106 – 0,0145; ПГ-192 – 0,0304; ПГ-540 – 0,018; ГлПГ-498 – 0,21; ГлПГ-1136 – 0,015; ПнПГ-700 – 0,15; ПнПГ-790 – 0,17 г/кг маси тварин. Щурам контрольної групи вводили відповідні об'єми питної води. Дослідження параметрів стану системи мікросомального окиснення в печінці здійснювали через 30 днів після початку експерименту. Тварин декапітували гільйотинним ножом, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію у дозі 50 мг/кг маси щурів. У дослідних і контрольних групах налічувалось по 10 тварин.

Стан монооксигеназної системи гепатоцитів оцінювали за дихальною і ферментативною активністю, вмістом цитохромів Р-450 та b<sub>5</sub>. Мембрани ендоплазматичного ретикулула виділяли за методом S.A. Komoth [6] у модифікації В.В. Лемешко [3]. Вміст білка визначали за методом О.Н. Lowry [7]. Споживання кисню суспензією мікросом реєстрували за допомогою закритого електрода Кларка; швидкість окиснення НАДФН<sub>2</sub> визначали флуориметричним методом при довжині хвилі збудження 366 нм, флуоресценції – 420 нм, НАДФН-цитохром



c-редуктазну активність – спектрофотометричним методом при 550 нм [5], вміст цитохромів P-450 та  $b_5$  – методом диференційної спектрофотометрії за допомогою двопроменевого реєструючого спектрофотометра “Specord UV VIS” [5, 8]. Результати обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Вплив досліджуваної групи сполук у дозі 1/100 ДЛ<sub>50</sub> на організм призводив на 30-ту добу спостереження до підвищення активності о-деметилази, НАДФН-цитохром c-редуктази, НАДН-цитохром c-редуктази мікросом печінки порівняно з контролем (табл. 1).

Таблиця 1 – **Активність о-деметилази та НАДФН-цитохром c-редуктаз мікросом печінки білих щурів за умов дії простих поліефірів (M±m, n=10)**

Речовини	о-деметилаза <sup>a</sup>	НАДФН-цитохром c-редуктаза <sup>b</sup>	НАДН-цитохром c-редуктаза <sup>b</sup>
Контроль	6,82±0,46	197,3±16,4	924,6±88,4
ПГ-192	17,41±1,82*	263,8±27,4*	1360,5±125,4*
ПГ-540	17,50±1,67*	264,6±24,5*	1372,7±129,8*
ПГ-1120	15,75±1,65*	259,9±26,1*	1368,9±127,6*
ПГ-2106	18,74±1,59*	270,5±26,6*	1386,6±126,9*
ГлПГ-498	14,81±1,35*	254,7±25,6*	1208,7±118,7*
ГлПГ-1136	17,86±1,62*	268,7±25,7*	1379,8±128,5*
ПнПГ-700	12,54±1,32*	250,7±24,6*	1240,6±121,7*
ПнПГ-790	11,32±1,33*	256,5±23,5*	1260,5±125,9*

Примітка. \* –  $p < 0,05$  відносно контролю; <sup>a</sup> – нмоль p-нітрофенолу/хв·мг білка; <sup>b</sup> – нмоль цитохрому c/хв·мг білка.

Найбільш вираженою ферментативна активність була за дії ПГ-2106 (на 174 % для о-деметилази, на 37 % для НАДФН-цитохром c-редуктази, на 50 % для НАДН-цитохром c-редуктази), ГлПГ-1136 (відповідно, на 162, 36 та 49 %), найменш вираженою – за дії ПнПГ-790 (на 66 % для о-деметилази, на 30 % для НАДФН-цитохром c-редуктази та на 36 % для НАДН-цитохром c-редуктази).

Досліджувані речовини також впливали на активність двох електронно-транспортних (НАДФН-цитохром P-450 та НАДН-цитохром  $b_5$ ) ланцюгів мікросомальної системи гепатоцитів щурів. Спостерігали статистично достовірне підвищення показників, що характеризують

швидкість мікросомального окиснення, порівняно з контролем. Вплив 1/100 ДЛ<sub>50</sub> ППЕ призводив до збільшення швидкості споживання кисню (у середньому на 113 %) та окиснення НАДФН<sub>2</sub> (у середньому на 86 %) мікросомами (табл. 2). Швидкість поглинання кисню відображає сумарну дихальну активність мікросом печінки, включаючи й неферментативні процеси перекисного окиснення ліпідів, а швидкість окиснення НАДФН – дихальну активність мікросом, яка забезпечується оксигеназними системами [1-3].

Досліджувані речовини на 30-ту добу експерименту в 1/100 ДЛ<sub>50</sub> статистично достовірно підвищували вміст цитохрому P-450 (табл. 3)

Таблиця 2 – **Швидкість споживання кисню мікросомами гепатоцитів щурів за умов дії простих поліефірів (M±m, n=10)**

Речовини	Швидкість споживання кисню <sup>a</sup>	Швидкість окиснення НАДФН <sub>2</sub> <sup>b</sup>
Контроль	1,47±0,13	3,12±0,34
ПГ-192	3,21±0,29*	6,56±0,61*
ПГ-540	3,46±0,35*	7,08±0,65*
ПГ-1120	3,09±0,28*	6,34±0,59*
ПГ-2106	3,97±0,36*	7,43±0,67*
ГлПГ-498	2,54±0,23*	5,23±0,46*
ГлПГ-1136	3,76±0,32*	7,13±0,68*
ПнПГ-700	2,74±0,31*	4,76±0,438
ПнПГ-790	2,35±0,21*	5,54±0,48*

Примітка. <sup>a</sup> – нмоль O<sub>2</sub>/хв·мг білка, <sup>b</sup> – нмоль НАДФН<sub>2</sub>/хв·мг білка, \* –  $p < 0,05$  відносно контролю.

– в середньому на 79,5 % порівняно з контрольною групою тварин. При цьому сполуки не викликали змін вмісту цитохрому  $b_5$ , що, можливо, пов'язано з його меншою роллю у процесах знешкодження ксенобіотиків, оскільки НАДН-цитохром с-редуктазна активність є відображенням як активності цього ферменту та вмісту цитохрому  $b_5$ , так і ефективності взаємодії даних білків. Це дозволяє вважати, що перенесення електронів через цитохром  $b_5$  не

являє собою лімітувальну ланку в перетворенні ППЕ у монооксигеназній системі. Відсутність змін концентрації цитохрому  $b_5$  також може вказувати на те, що значна частина даного гемопротейну входить до складу НАДН-залежного ланцюга вільного окиснення, компоненти якого, у зв'язку з особливостями молекулярної організації та розташування в мембранах ендоплазматичного ретикулула, менш чутливі до пошкоджувальної дії ППЕ.

Таблиця 3 – Вміст цитохромів у суспензії мікросом гепатоцитів щурів за умов дії простих поліефірів ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Речовини	Цитохром $b_5$	Цитохром P-450
Контроль	0,54±0,06	0,94±0,08
ПГ-192	0,60±0,05	1,71±0,16*
ПГ-540	0,55±0,06	1,76±0,18*
ПГ-1120	0,56±0,05	1,67±0,15*
ПГ-2106	0,57±0,06	1,87±0,17*
ГлПГ-498	0,56±0,06	1,54±0,14*
ГлПГ-1136	0,58±0,06	1,83±0,19*
ПнПГ-700	0,56±0,06	1,53±0,14*
ПнПГ-790	0,55±0,05	1,59±0,16*

Примітка. Вміст виражено у нмоль/мг білка; \* –  $p < 0,05$  відносно контролю.

**ВИСНОВКИ.** 1. Група простих поліефірів на основі пропіленгліколю, гліцеролу та пентанолу за умов тривалої дії у 1/100 ДЛ<sub>50</sub> призводить до активації монооксигеназної системи гепатоцитів, про що свідчить збільшення дихальної, ферментативної, деметилазної активності мікросом, а також вмісту цитохрому P-450.

2. Активація монооксигеназної системи гепатоцитів як істотного джерела утворення активних форм кисню, є причиною підвищення вільнорадикальних процесів та перекисного окиснення ліпідів [4], що вказує на можливість мембранотропну дію досліджуваної групи ксенобіотиків.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Барабой В.А., Олійник С.А., Білоконь Ю.М. Динаміка процесів перекисного окиснення ліпідів у крові і органах щурів в умовах максимального фізичного навантаження та фракціонованого опромінення в низьких дозах // Доп. НАН України. – 1995. – № 7. – С. 127-129.
2. Губський Ю.І. Біологічна хімія: Підручник. – Київ–Вінниця: Нова книга, 2007. – 656 с.
3. Лемешко В.В. Система мікросомального окислення при розвитку і старенні організму // Биохимия. – 1980. – **45**, № 11. – С. 1964-1969.
4. Наконечна О.А. Стан оксидантної системи в організмі щурів за умов дії простих поліефірів //

Вісник проблем біології та медицини. – 2008. – № 3. – С. 85-89.

5. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – 371 с.

6. Komoth S.A., Narayan K.A. Interaction of Ca with endoplasmic reticulum of rat liver in standartized procedure for the isolation of rat liver microsomes // *Analyt. Biochem.* – 1972. – **48**, № 1. – P. 53-61.

7. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – **193**. – P. 265-275.

8. Omura T., Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes // *J. Biol. Chem.* – 1964. – **239**. – № 7. – P. 917-920.

# СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ПРОСТЫХ ПОЛИЭФИРОВ

**В.И. Жуков, О.А. Наконечная**  
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

## Резюме

*Изучено влияние простых полиэфиров на состояние системы микросомального окисления. Выявлено увеличение содержания цитохрома P-450, активности o-деметилазы, НАДФН-цитохром c-редуктазы, НАДН-цитохром c-редуктазы микросом гепатоцитов крыс в сравнении с контролем.*

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** простые полиэфиры, микросомальное окисление, цитохром P-450, o-деметилаза, НАДФН-цитохром c-редуктаза, НАДН-цитохром c-редуктаза.

# INFLUENCE OF SIMPLE POLYETHERS ON MICROSOMAL OXIDATIVE SYSTEM IN RAT ORGANISM

**V.I. Zhukov, O.A. Nakonechna**  
KHARKIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

## Summary

*The influence of simple polyethers on microsomal oxidative system was studied. Increase of contents of cytochrome P-450, activity of o-demethylase, NADPH-cytochrome of c-reductase, NADH-cytochrome of c-reductase of microsomes of rat hepatocytes compared with control was revealed.*

**KEY WORDS:** simple polyethers, microsomal oxidation, cytochrome P-450, o-demethylase, NADPH-cytochrome c-reductase, NADH-cytochrome c-reductase.

Отримано 27.11.2008 р.

Адреса для листування: О.А. Наконечна, вул. Анрі Барбюса, 3 А, кв. 31, Харків, 61022, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

## ОСОБЛИВОСТІ ЗМІН ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА ЇХ КОРЕКЦІЯ КОРВІТИНОМ У ХВОРИХ НА АРТЕРІАЛЬНУ ГІПЕРТЕНЗІЮ У ПОЄДНАННІ З ХРОНІЧНИМИ ОБСТРУКТИВНИМИ ЗАХВОРЮВАННЯМИ ЛЕГЕНЬ

О.П. Мазур

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

З метою вивчення патогенетичного значення розвитку оксидативного стресу при артеріальній гіпертензії у поєднанні з хронічними обструктивними захворюваннями легень та ефективності застосування корвітину обстежено 42 хворих на артеріальну гіпертензію II-III стадій у поєднанні з хронічними обструктивними захворюваннями легень II-III ступенів важкості.

Встановлено, що у хворих із поєднаною патологією розвивається оксидативний стрес із підвищенням рівня малонового діальдегіду та зниженням глутатіону відновленого, супероксиддисмутази й активності каталази, що обґрунтовує доцільність програми їх лікування.

Включення в комплексну терапію біофлавоноїду корвітину приводило до поліпшення параметрів перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантної системи захисту, яке проявлялося достовірним зниженням малонового діальдегіду, підвищенням глутатіону відновленого, супероксиддисмутази та активності каталази.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** артеріальна гіпертензія, хронічні обструктивні захворювання легень, перекисне окиснення ліпідів, корвітин.

ВСТУП. Артеріальна гіпертензія (АГ) – одне з найпоширеніших захворювань серцево-судинної системи, яке є чинником ризику інвалідності та смерті, насамперед населення працездатного віку [1, 9]. Так, у 2006 році в Україні було зареєстровано більше 11 млн хворих на АГ, що складає приблизно 23 % всього населення країни. Хоча, згідно з результатами деяких епідеміологічних досліджень, поширеність АГ є ще вищою (до 25-30 % у популяції) [4, 12].

В Україні за період 1996-2007 років поширеність гіпертонічної хвороби серед дорослих зросла у 2,2 раза, а захворюваність – у 2,3 раза. Серед осіб, в яких уперше виявили гіпертонічну хворобу, 78,4 % – це хворі працездатного віку, що становить 2023,0 на 100 тис. населення.

Хронічні обструктивні захворювання легень (ХОЗЛ) займають провідне місце серед причин захворюваності та смертності населення промислово розвинених країн світу, зокрема України. Захворювання характеризується обмеженням повітряного потоку в дихальних шляхах, яке не є повністю зворотним. Обструктивний синдром зумовлений незвичайною

відповіддю запального характеру на шкідливі частки або газу і поступово прогресує, особливо після кожного наступного загострення.

Епідеміологічні дослідження свідчать про те, що у 4-6 % європейців є ознаки ХОЗЛ. Це захворювання дедалі частіше виявляють в осіб до 45 років. На сьогодні у світі нараховується понад 600 млн хворих на ХОЗЛ. За даними ВООЗ, протягом найближчого десятиліття передбачаються значне поширення ХОЗЛ і зростання смертності від цього захворювання. До 2020 року ХОЗЛ займатиме третє місце в структурі причин смертності [5].

Порушення структурно-функціональної організації клітинних мембран, інтенсифікація перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), дестабілізація імунної системи значною мірою визначають патофізіологічні та клінічні критерії запалення і прогноз перебігу захворювання [2, 8].

Пероксиди ліпідів, що утворюються ферментним чи неферментним шляхом у зв'язку з їх реакційною здатністю, є потенційно небезпечними для нормального перебігу низки метаболічних процесів. Так, ліпопероксиди можуть інактивувати деякі ферментні системи, спричиняючи деструкцію SH-вмісних сполук, деполімеризацію ДНК, тобто можуть безпосередньо пошкоджувати клітину [3, 6, 8]. Комп-

лекс захисних механізмів захищає клітину від надлишкового накопичення в ній токсичних продуктів ПОЛ. Однак при розвитку низки патологічних процесів і дії деяких агентів ці захисні механізми не спроможні запобігти посиленню ПОЛ мембран клітин та ендоплазматичного ретикулула.

Первинна активація ПОЛ має переважно інформаційний характер, сигналізуючи організму про небезпеку, і, незалежно від природи діючого агента, включає стереотипну реакцію – відповідь організму у вигляді мобілізації стресреалізуючих систем: гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикотропної, симпатoadреналової та ін. Оскільки спосіб включення цих систем є універсальним і відбувається через активацію пероксидних реакцій, то адаптивна відповідь організму також формується через загальні механізми стреслімітувальних систем, серед яких чи не головну роль відіграє ендогенна антиоксидантна система захисту (АОСЗ) [7, 8]. Компонентом антиоксидантної системи є кверцетин, який нормалізує антиоксидантний гомеостаз, модулює рівень NO в пошкоджених тканинах і крові, утворює хелатні комплекси з металами, захищає від окиснення аскорбінову кислоту і ліпіди мембран [9].

Можливість обмеження продукції вільних радикалів зумовила зростання зацікавленості препаратами флавоноїдів, зокрема корвітином (2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,5,7-тригідрокси-4Н-1-бензопіран-4-он дигідрат) виробництва Борщагівського хіміко-фармацевтичного заводу. Поряд зі значною антиоксидантною активністю препарат проявляє імунокоригувальну дію, нормалізує ліпідний спектр крові, показники системного запального процесу, знижує утворення цитокінів, що показано у клінічних та експериментальних дослідженнях.

Метою нашого дослідження було попередити прогресування артеріальної гіпертензії у поєднанні з хронічними обструктивними захворюваннями легень шляхом корекції корвітином змін перекисного окиснення ліпідів у хворих з даною мікст-патологією.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Показники ПОЛ та АОСЗ вивчено у 45 хворих (28 чоловіків та 17 жінок) на АГ II-III ступенів важкості у поєднанні з ХОЗЛ II-III ступенів важкості, які отримували стандартну терапію із застосуванням антигіпертензивного препарату кандесартану. 42 пацієнти (24 чоловіки та 18 жінок) з цією ж патологією одержували комплексну терапію з використанням біофлавоноїду корвітину. Об-

стеження проводили до лікування, через 4 тижні та 6 місяців після лікування. Контрольну групу становили 20 практично здорових людей. Середній вік обстежуваних складав (53,4±2,6) років, тривалість захворювання – (15,65±1,15) років.

Для оцінки активності ПОЛ і АОСЗ використовували показники малонового діальдегіду (МДА), глутатіону відновленого (ГВ), супероксиддисмутази (СОД), каталази.

Визначення концентрації МДА ґрунтується на тому, що при високій температурі в кислому середовищі МДА реагує з тіобарбітуровою кислотою, утворюючи забарвлений триметиновий комплекс.

Про активність СОД свідчить її здатність інгібувати відновлення нітротетразолію синього при наявності НАДН2 і фенозинметасульфату.

ГВ вивчали на основі того, що при взаємодії 5,5-дитіотіс-2-нітробензойної кислоти з вільними SH-групами утворюється тіонітрофенільний аніон, кількість якого прямо пропорційна рівню SH-груп.

Визначення активності каталази проводили за методикою, яка ґрунтується на здатності перекису водню утворювати з молібдатом амонію стійкий забарвлений комплекс. При порівнюванні концентрації даного розчину зі стандартним шляхом фотометрування визначали вміст каталази.

Усі хворі отримували кандесартан, який призначали як засіб комбінованої антигіпертензивної терапії. Добова доза препарату становила 8 мг раз на добу протягом перших 2 тижнів з наступним титруванням до 16 мг на добу. Оцінювали динаміку показників добового моніторингу артеріального тиску, клінічних симптомів та побічних ефектів, які виникали під час лікування. Тривалість спостереження за хворими становила 6 місяців. Крім того, пацієнти досліджуваної групи (42 хворих) додатково отримували водорозчинну форму кверцетину – корвітин (по 0,5 г препарату в 50 мл фізіологічного розчину внутрішньовенно краплинно протягом 30-45 хв раз на добу). Курс лікування складав 5 ін'єкцій.

Статистичну обробку матеріалу проведено на персональному комп'ютері із застосуванням електронних таблиць Excel 2000 for Windows (Microsoft, USA). Результати вважали статистично достовірними при  $p < 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** При аналізі результатів проведених досліджень до лікування були виявлені суттєві порушення рівно-

ваги у системі ПОЛ–АОСЗ. Потрібно зауважити, що в обстежених хворих відмічено значне підвищення вмісту в плазмі крові МДА (до  $(5,16 \pm 0,38)$  мкмоль/л), який є проміжним продуктом окиснення та основним показником активації процесів ПОЛ.

Разом із посиленням активності ПОЛ спостерігалось погіршення показників АОСЗ. Слід відмітити, що зміни активності ферментів АОСЗ при АГ у поєднанні з ХОЗЛ були однонаправленими. Але при цьому виявлено суттєве пригнічення рівнів ГВ (до  $(46,56 \pm 2,24)$  мкмоль/л) і СОД (до  $(122,4 \pm 6,4) \cdot 10^3$  ум. од./мл) за умов помірного зниження активності каталази в сироватці крові (до  $(11,23 \pm 0,73)$  ммоль/л).

Зауважимо, що параметри ПОЛ та АОСЗ достовірно корелювали з важкістю захворювання.

При порівнюванні показників ПОЛ та АОСЗ в обстежених хворих залежно від віку і статі виявлено, що вміст СОД та МДА у чоловіків суттєво не змінювався залежно від віку, тоді як у жінок після 45 років їх рівні значно знижувались, досягаючи таких у чоловіків.

При аналізі динаміки параметрів ПОЛ та АОСЗ після проведеного курсу стандартної терапії не було діагностовано суттєвого лікувального впливу на активність ферментів АОСЗ. Так, вміст СОД становив  $(134,7 \pm 10,4) \cdot 10^3$  і  $(130,5 \pm 10,8) \cdot 10^3$  ум. од./мл через чотири тижні та шість місяців лікування відповідно, ГВ –  $(48,36 \pm 3,45)$  та  $(44,12 \pm 3,15)$  мкмоль/л, каталази –  $(11,83 \pm 0,84)$  і  $(11,36 \pm 0,87)$  ммоль/л. При цьому не відмічено достовірних змін концентрації МДА: через чотири тижні його рівень складав  $(5,35 \pm 0,35)$  мкмоль/л, а через шість місяців –  $(5,47 \pm 0,34)$  мкмоль/л, що вказує на недостатній лікувальний ефект стандартної терапії у хворих із поєднаною патологією.

При вивченні впливу комплексного курсу лікування із застосуванням корвітину на стан системи ПОЛ та АОСЗ спостерігали його виражений антиоксидантний ефект через чотири тижні лікування у хворих на АГ у поєднанні з ХОЗЛ.

Відмітимо, що застосування корвітину в складі комплексної терапії дозволило досягнути вираженого зростання вмісту ГВ (до  $(58,17 \pm 2,43)$  мкмоль/л) і СОД ( $(151,3 \pm 7,0) \cdot 10^3$  ум. од./мл) та помірного – каталази ( $(13,62 \pm 0,61)$  ммоль/л) з нормалізацією їх активності. Внаслідок цього рівень МДА значно знижувався і становив  $(3,56 \pm 0,15)$  мкмоль/л, проте залишався достовірно вищим від такого у контролі  $(1,56 \pm 0,04)$  (табл. 1). Аналізуючи дані проведених досліджень, зауважимо, що

у хворих на АГ у поєднанні з ХОЗЛ корвітин проявляє суттєвий антиоксидантний ефект, у хворих як із II, так і з III ступенем важкості захворювання.

Після проведення повторного обстеження хворих через шість місяців після курсу терапії відмічено погіршення показників ПОЛ та АОСЗ. Так, спостерігали достовірне підвищення рівня МДА до  $(4,82 \pm 0,24)$  мкмоль/л. Разом із тим, відзначали зниження активності АОСЗ: достовірно зменшувались рівні ГВ ( $(49,12 \pm 2,30)$  мкмоль/л) та СОД ( $(125,5 \pm 6,8) \cdot 10^3$  ум. од./мл) на фоні незначного зниження рівня каталази (до  $(12,32 \pm 0,64)$  ммоль/л), які, проте, не досягали показників контролю.

Відмітимо, що погіршення показників було більш вираженим у хворих із III ступенем важкості захворювання.

Таким чином, у хворих на АГ у поєднанні з ХОЗЛ виявлено виражену антиоксидантну дію комплексного лікування із застосуванням корвітину. Встановлено відновлення активності ферментів АОСЗ та нормалізацію рівня МДА в усіх досліджуваних пацієнтів. Зауважимо більш виражений антиоксидантний ефект у хворих в період ремісії ХОЗЛ.

Слід відмітити, що поліпшення показників ПОЛ та АОСЗ супроводжувалось покращенням клінічного перебігу поєднаної патології, а саме: зменшенням частоти виникнення періодів кашлю, задишки, нормалізацією артеріального тиску на рівні 140/90 мм рт. ст. та стабілізацією перебігу АГ.

За даними багатьох авторів, порушення в системі ПОЛ–АОСЗ відіграють важливу роль у розвитку та прогресуванні як АГ, так і ХОЗЛ.

Внаслідок інтенсифікації ПОЛ синтезуються сполуки, які порушують цілісність ліпідного шару мембран клітин, і стає можливим пасивний транспорт іонів і метаболітів [7, 9].

Порушення рівноваги між синтезом та елімінацією форм реактивного кисню, таких, як супероксиданіон і водню пероксид, впливає на гомеостаз клітинного окисного напруження, що відіграє важливу роль у розвитку АГ [9, 11].

Деякі автори встановили підвищення рівня водню пероксиду в плазмі хворих на АГ. До того ж, цей показник був більшим у тих пацієнтів з АГ, в яких дане захворювання спостерігалось у родині. Окрім того, у людей з нормальним АТ, але з генетичною схильністю до розвитку АГ (захворюваність на АГ у родині) вміст у крові водню пероксиду був значно більшим, ніж у пацієнтів без такої спадковості. Ці дані свідчать про те, що підвищений синтез

Таблиця 1 – **Порушення в системі перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантній системі захисту у хворих на АГ у поєднанні з ХОЗЛ (M±m)**

Показник		Контроль (n=20)	Хворі на АГ+ХОЗЛ до лікування	Хворі на АГ+ХОЗЛ через 4 тижні лікування	Хворі на АГ+ХОЗЛ через 6 місяців лікування	p1	p2	p3
МДА, мкмоль/л	1 (n=42)	1,56±0,04	5,16±0,38	3,56±0,15	4,82±0,24	<0,05	<0,05	<0,05
	2 (n=45)		5,68±0,35	5,35±0,35	5,47±0,34	>0,05	<0,05	<0,05
ГВ, мкмоль/л	1 (n=42)	60,52±2,13	46,56±2,24	58,17±2,43	49,12±2,30	<0,05	>0,05	<0,05
	2(n=45)		46,15±3,22	48,36±3,45	44,12±3,15	>0,05	<0,05	<0,05
СОД, ·10 <sup>3</sup> ум. од./мл	1 (n=42)	164,6±5,6	122,4±6,4	151,3±7,0	125,5±6,8	<0,05	<0,05	<0,05
	2(n=45)		132,6±11,2	134,7±10,4	130,5±10,8	>0,05	<0,05	<0,05
Каталаза, ммоль/л	1 (n=42)	13,60±1,21	11,23±0,73	13,62±0,61	12,32±0,64	<0,05	>0,05	>0,05
	2(n=45)		11,69±0,83	11,83±0,84	11,36±0,87	>0,05	>0,05	<0,05

Примітки:

1. p1 – достовірність різниці між параметрами у хворих на АГ II-III стадій у поєднанні з ХОЗЛ II-III ступенів важкості до та через 4 тижні після лікування.

2. p2 – достовірність різниці між параметрами у хворих на АГ II-III стадій у поєднанні з ХОЗЛ II-III ступенів важкості через 4 тижні після лікування та контролем.

3. p3 – достовірність різниці між параметрами у хворих на АГ II-III стадій у поєднанні з ХОЗЛ II-III ступенів важкості через 6 місяців після лікування та контролем.

4. 1 – пацієнти, в комплексне лікування яких було включено корвітин.

5. 2 – пацієнти, які отримували стандартну терапію.

водню пероксиду генетично детермінований і передуює розвитку АГ [9, 13].

За даними деяких авторів, активізація процесів ПОЛ в разі загострення ХОЗЛ супроводжується достовірним зниженням контамінаційної здатності основних ензимів – каталази і супероксиддисмутази як показників АОСЗ. Зазначені зміни свідчать про синдром ендотоксикозу при ХОЗЛ [1, 3, 5]. Масивні утворення вільних радикалів із потужною альтернативною дією у хворих на АГ з гемодинамічними порушеннями та при генетично детермінованій АГ спричиняють значні морфофункціональні зміни слизової оболонки і мікроциркуляторного русла бронхіального дерева, що сприяє подальшому прогресуванню запального процесу в бронхах [10, 12, 13].

Отже, результати проведених нами досліджень доводять, що у хворих на АГ та ХОЗЛ відмічається значна активація процесів ПОЛ на фоні пригнічення активності АОСЗ, а курс комплексного лікування із застосуванням біофлавоноїду корвітину проявляє більш виражену, ніж стандартна терапія, антиоксидантну дію з нормалізацією показників ПОЛ та АОСЗ.

**ВИСНОВКИ.** 1. Особливістю змін параметрів перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантної системи захисту у хворих на артеріальну гіпертензію у поєднанні з хронічними обструктивними захворюваннями легень є розвиток оксидативного стресу з підвищенням рівня малонового діальдегіду та зниженням глутатіону відновленого, супероксиддисмутази та активності каталази, що може підвищувати ризик ураження органів-мішеней та призводити до більш швидкого прогресування поєднаної патології.

2. Використання стандартної терапії у хворих із поєднаною патологією сприяє стабілізації клінічного перебігу артеріальної гіпертензії, проте не проявляє достатнього ефекту щодо корекції порушень у системі перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантній системі захисту.

3. Корвітин є клінічно ефективним засобом корекції порушень перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантної системи захисту у хворих на артеріальну гіпертензію у поєднанні з хронічними обструктивними захворюваннями легень.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Ащеулова Т.В., Заика М.В., Герасимчук Н.Н. Взаимосвязь иммунной активации и оксидативно-го стресса при прогрессировании артериальной гипертензии // Укр. терапевт. журн. – 2007. – № 2. – С. 12-15.
2. Біловол О.М., Шкляр С.П., Черкашина Л.В. Мішені антиоксидантного впливу у осіб молодого віку при хронічних захворюваннях шлунково-кишкового тракту та хронічних обструктивних захворюваннях легень // Запороз. мед. журн. – 2007. – № 6 (45). – С. 54-58.
3. Вакалюк І.П., Клименко В.І., Клименко А.О. Антиоксидантний захист та стан пероксидного окиснення ліпідів у хворих на стабільну стенокардію // Буковин. мед. вісник. – 2005. – 9, № 2. – С. 27-28.
4. Дзяк Г.В., Ханюков А.А., Кошка Т.А. Опыт использования комбинированного антигипертензивного препарата экватор в лечении больных с артериальной гипертензией // Укр. мед. часопис. – 2008. – № 1 (63). – С. 33-37.
5. Масік Н.П. Етіопатогенетичні механізми полісистемних порушень у хворих на хронічні обструктивні захворювання легень // Укр. терапевт. журн. – 2007. – № 4. – С. 118-122.
6. Мойбенко А.А., Пархоменко А.Н., Кожухов С.Н. Эффективность водорастворимой формы кварцетина (корвитина) при лечении острого коронарного синдрома с элевацией сегмента ST // Журнал АМН України. – 2003. – 9, № 2. – С. 361-370.
7. Славкина Т.Ю. Патогенетическое значение развития оксидативного стресса при гипертонической болезни // Буковин. мед. вісник. – 2004. – 8, № 4. – С. 57-60.
8. Тодоріко Л.Д., Рахліцька К.В. Стан пероксидної оксидації ліпідів при бронхіальній астмі та ішемічній хворобі серця // Буковин. мед. вісник. – 2005. – 9, № 1. – С. 144-148.
9. Чекман І.С., Дацюк Н.О. Роль перекисного окиснення ліпідів у патогенезі артеріальної гіпертензії // Серце і судини. – 2008. – № 4. – С. 110-115.
10. Чернюк Н.В. Оцінка ефективності протизапальної та антиоксидантної терапії у хворих на хронічний обструктивний бронхіт за концентрацією середньомолекулярних пептидів // Буковин. мед. вісник. – 2004. – 8, № 3. – С. 124-127.
11. Chan S.H.H., Tai M.H., Li C.Y. et al. Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxidizedismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats // Free Radical Biology and Medicine. – 2006. – 40. – P. 2028-2039.
12. Gomez-Amores L., Mate A., Revilla E. et al. Antioxidant activity of propionyl-L-carnitine in liver and heart of spontaneously hypertensive rats // Life Sciences. – 2006. – № 78. – P. 1945-1952.
13. Hussein G., Goto H., Oda S. et al. Antihypertensive potential and mechanism of action of astaxanthin: III. Antioxidant and hystopathological effects in spontaneously hypertensive rats // Biol. Pharmac. Bull. – 2006. – 29, № 4. – P. 684-688.

## ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕРОКСИДНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И ИХ КОРРЕКЦИЯ КОРВИТИНОМ У БОЛЬНЫХ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ В СОЧЕТАНИИ С ХРОНИЧЕСКИМИ ОБСТРУКТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ

О.П. Мазур

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

### Резюме

С целью изучения патогенетического значения развития оксидативного стресса при артериальной гипертензии в сочетании с хроническими обструктивными заболеваниями легких и эффективности использования корвитина обследовано 42 больных артериальной гипертензией II-III стадий в сочетании с хроническими обструктивными заболеваниями легких II-III степеней тяжести.

Установлено, что у больных с сочетанной патологией развивается оксидативный стресс с повышением уровня малонового диальдегида и снижением глутатиона восстановленного, супероксиддисмутазы и активности каталазы, что обуславливает целесообразность программы их лечения.

Включение в комплексную терапию биофлавоноида корвитина приводило к улучшению параметров пероксидного окисления липидов и антиоксидантной системы защиты, которое проявлялось достоверным снижением малонового диальдегида, повышением глутатиона восстановленного, супероксиддисмутазы и активности каталазы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: артериальная гипертензия, хронические обструктивные заболевания легких, пероксидное окисление липидов, корвитин.



# PECULARITIES OF LIPID PEROXIDATION DISTURBANCES AND THEIR CORRECTION BY CORVITYN IN PATIENTS WITH BLOOD HYPERTENSION COMBINED WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARE DISEASES

O.P. Mazur

TERNOPIIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I. YA. HORBACHEVSKY

## Summary

*With the aim to study the pathogenetic role of oxidative stress in the development of arterial hypertension combined with the chronic obstructive pulmonary diseases and efficiency of usage of corvityn were examined 42 patients with arterial hypertension of II-III stages combined with chronic obstructive pulmonary diseases of II-III severity stages.*

*It was found that in patients with combined pathology develops oxidative stress with increasing of levels of malonic dialdehyde and decreasing of reduced glutathion, superoxidedismutase and activity of catalase, that grounds prescribing of the program of their treatment.*

*Usage of bioflavonoid corvityn in complex therapy let to improve the parameters of lipid peroxidation and antioxidant defence system which was manifested in reliable decrease of malonic dialdehyde, increase of reduced glutathion, superoxide dismutase and activity of catalase.*

**KEY WORDS:** arterial hypertension, chronic obstructive pulmonary diseases, lipid peroxidation, corvityn.

Отримано 16.02.2009 р.

**Адреса для листування:** О.П. Мазур, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

## АНТИОКСИДАНТНА АКТИВНІСТЬ БІОФЛАВОНОЇДІВ ЦИТРУСОВИХ

О.А. Макаренко  
ІНСТИТУТ СТОМАТОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ, ОДЕСА

У роботі представлені результати дослідження антиоксидантної активності стандартів біофлавоноїдів цитрусових в модельних системах окиснювального стресу *in vitro*. Показано, що здатність біофлавоноїдів цитрусових запобігати окисненню твіну-80, відновлювати супероксидний радикал і вільний радикал дифенілпікрілгідразилу, пов'язана з наявністю в їх молекулі гідроксильних груп з рухомим атомом водню. Ступінь хелатуючої активності цих сполук залежить від конформації їх молекули.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: біофлавоноїди цитрусових, антиоксидантна активність, моделювання *in vitro*.

ВСТУП. Лікувальні властивості цитрусових відомі здавна. Народна медицина рекомендує використовувати їх при запальних захворюваннях слизових оболонок ротоглотки, ангіні, дифтерії, грибкових дерматитах, екземі, себореї, для лікування захворювань шлунково-кишкового тракту, нирок, геронтологічних розладів [4, 11]. Лікувально-профілактичну дію цитрусових пов'язували із вмістом ефірних олій, вітаміну С, каротину, не звертаючи особливої уваги на групу речовин, які належать до біофлавоноїдів (БФ). Проте ці речовини в даний час розглядають як найважливіші біорегулятори рослинного походження в організмі тварин [13, 17]. Тим більше, що їх вміст у плодах цитрусових в 2,5-4 рази перевищує вміст аскорбінової кислоти.

Плоди цитрусових відносять до одних із найбагатших джерел БФ [4, 11]. За своєю будовою більшість флавоноїдів цитрусових можна поділити на 2 групи: похідні флаванону і похідні флавонолу (рис. 1).

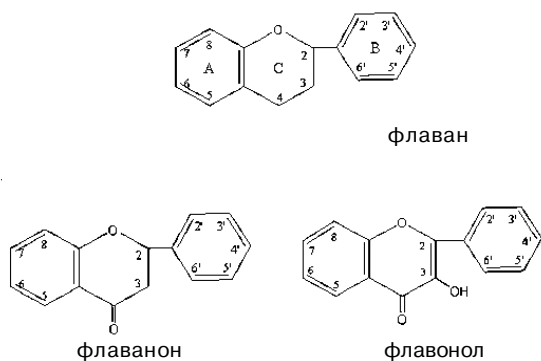


Рис. 1. Хімічна будова головних агліконів БФ цитрусових.

Нарингенін (5,7,4'-триокси-флаванон),  
Гесперитин (5,7,3'-триокси-4'-метокси-флаванон)  
Кверцетин (3,5,7,3',4'-пентаокси-флавонол)

© О.А. Макаренко, 2009.

До похідних флаванону належать глікозиди гесперитину (гесперидин), нарингеніну (нарингін), до похідних флавонолу – глікозиди кверцетину (рутин), кемпферолу (кемпферитин) і мірицетину. Всі інші флавоноїди становлять у плодах цитрусових менше 10 % від загальної кількості цих сполук. Головною формою існування БФ є глікозидна, утворена за рахунок β-глікозидного зв'язку однієї з гідроксильних груп аглікону із цукрами.

Головним біофлавоноїдом апельсина є гесперитин (точніше, його глікозид гесперидин), а грейпфрута – нарингенін (глікозид нарингін). У лимонах в найбільшій кількості містяться два БФ – гесперитин і еридиктіол. Слід також підкреслити, що сік цитрусових містить значно менше БФ, ніж цілий плід. Так, в соку апельсина нарингін у 50 разів менше, ніж в цілому плоді [4].

Глікозиди БФ, які потрапляють в організм з їжею, піддаються ферментативному гідролізу під дією β-глікозидаз мікробного походження. У травних соках людини і тварин аналогічні ферменти відсутні. Однак в тонкій кишці всмоктуються як аглікони, так і глікозидні форми біофлавоноїдів.

Усі БФ цитрусових являють собою тверді кристалічні сполуки без кольору, погано розчинні в холодній воді (особливо аглікони) і добре розчинні в спирті [13].

Однією з ключових біологічних властивостей БФ є їх антиоксидантна активність, зокрема здатність пригнічувати процеси перекисного окиснення ліпідів, білків, нуклеїнових кислот та інших сполук, гальмувати розвиток синдрому пероксидації [16]. Припускають також, що антиоксидантна дія БФ зумовлена їх здатністю нейтралізувати активні форми кисню і утворювати комплекси з іонами заліза [5, 6].

Продукція активних форм кисню (АФК), таких, як супероксидрадикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), перекис водню ( $H_2O_2$ ), гідроксилрадикал ( $OH^{\cdot}$ ), є невід'ємною частиною процесів аеробного метаболізму клітини. АФК беруть участь в нормальній життєдіяльності організму: фагоцитоз, апоптоз, регуляція клітинного ділення, синтез АТФ і біологічно активних речовин. Але, крім того,  $O_2$ ,  $H_2O_2$  і  $OH^{\cdot}$  ініціюють ланцюгову реакцію перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), яку каталізують іони перехідних металів  $Fe^{2+}$  і  $Cu^{2+}$ . Цим шляхом окиснюються ненасичені жирні кислоти, а також нуклеїнові кислоти, білки та інші органічні сполуки, що може бути причиною порушення цілісності й фізіологічних функцій клітини [1, 7, 9].

Для підтримки інтенсивності вільнорадикальних процесів на оптимальному рівні, без загрози їх різкої активації та участі в розвитку різних патологічних процесів, існує багатокомпонентна система антиоксидантного захисту. Це такі групи: 1) ферменти; 2) низькомолекулярні антиоксиданти, що синтезуються в організмі; 3) природні антиоксиданти, що надходять з їжею; 4) хелатори індукторів утворення АФК. Узгоджена робота компонентів антирадикального захисту підтримує на постійному рівні як утворення, так і перетворення АФК та інших потенційно небезпечних сполук [1, 7, 9].

До групи природних антиоксидантів, що надходять в організм з їжею, відносять БФ, зокрема БФ цитрусових. При цьому залишається відкритим питання, на яких етапах утворення АФК і продуктів ПОЛ реалізується антиоксидантна діяльність основних БФ цитрусових. Тому метою роботи було дослідження головних БФ цитрусових в різних модельних системах окиснювального стресу *in vitro*, що відображають основні етапи утворення АФК і продуктів ПОЛ у живій клітині.

У дослідженні використовували чисті препарати нарингеніну і його глікозиду нарингіну (основні БФ грейпфрута), а також гесперитину і його глікозиду гесперидину (основні БФ апельсина, лимона і мандарина). Антисупероксидну активність БФ вивчали у системі утворення  $O_2^{\cdot-}$ , антиперекисну – за здатністю знижувати концентрацію  $H_2O_2$ , антирадикальну – в реакції з радикалом дифенілпікрілгідрозилом ( $OH^{\cdot}$ ), антиокиснювальну – в реакції окиснення твіну-80 (продукти ПОЛ) і хелатуючу – за здатністю зв'язувати іони  $Fe^{2+}$ . Як стандарт використовували найбільш вивчений БФ кверцетин і його глікозид рутин. Необхідно додати, що до складу цитрусових також входять кверцетин і рутин, але їх кількість в де-

сятки, а іноді й у сотні разів менша кількості основних БФ.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** У роботі використовували комерційні препарати БФ Naringenine, Naringin, Hesperetin, Hesperidin, Rutin, Quercetin ("Sigma", USA), які розчиняли в етиловому спирті в молярних концентраціях.

Загальну антиоксидантну активність оцінювали за мірою інгібування БФ аскорбат- і ферроіндукованого окиснення твіну-80 до малонового діальдегіду (МДА), вміст якого визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [2]. Антисупероксидну активність визначали за здатністю БФ конкурувати з нітросинім тетразолієм в реакції відновлення супероксидних радикалів, утворених в системі феназинметасульфат–NADH [12]. Антирадикальну активність – за здатністю БФ віддавати рухомий атом водню радикалові дифенілпікрілгідрозилу (ДФПГ). Процес дегідрування БФ за присутності ДФПГ супроводжується зниженням оптичної густини [3]. Хелатуючу активність БФ оцінювали за їх здатністю зв'язувати іони  $Fe^{2+}$ , кількість яких визначали за допомогою ферозину [18]. Антиперекисну активність БФ визначали спектрофотометрично за ступенем зниження концентрації перекису водню в пробі [18]. Вимірювання оптичної густини в усіх методиках здійснювали на спектрофотометрі UV mini-1240 Shimadzu (Японія). Усі дослідження проводили в декількох концентраціях БФ. Інгібуючу активність (ІА) біофлавоноїдів виявляли у відсотках і розраховували за формулою:

$$IA = \frac{E_k - E_{оп}}{E_k} \cdot 100,$$

де  $E_k$  – оптична густина контролю без БФ;  $E_{оп}$  – оптична густина дослідного БФ; 100 – переведення у % [18]. Для оцінювання антиоксидантних властивостей БФ використовували показник  $K_1$ , який дорівнював концентрації препарату, що здійснював 50 % інгібування досліджуваних процесів. Значення  $K_1$  розраховували за залежністю доза–ефект із застосуванням методу регресійного аналізу і визначали у молярній концентрації (М) [8].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Як показало проведене дослідження, усі препарати, які вивчали, здатні гальмувати перекисне окиснення твіну-80 з явною перевагою кверцетину і гесперитину,  $K_1$  яких на порядок нижче, ніж у їхніх глікозидів рутину і гесперидину. Нарингенін володіє менш яскравою здатністю інгібувати ПОЛ з  $K_1=36,5 \cdot 10^{-4}$  М. Антиоксидан-

тна активність його глікозиду нарингін у ще нижча ( $K_1=161,0 \cdot 10^4$  М) (табл. 1).

Стандарти, які вивчали, мають високу здатність взаємодіяти із стабільним радикалом ДФПГ, володіючи різною антирадикальною активністю. Яскраво виражену антирадикальну дію проявляють кверцетин і рутин, 50 % інгібуюча активність яких виявляється в концентраціях  $5,4 \cdot 10^6$  і  $1,3 \cdot 10^5$  М відповідно. Нижча антирадикальна активність властива гесперитину і гесперидину,  $K_1$  яких становить, відповідно,  $0,9 \cdot 10^3$  і  $1,31 \cdot 10^2$  М. Найнижчу антирадикальну активність виявлено у нарингіні та нарингіні, вона в десятки тисяч разів нижча, ніж у кверцетині, і в тисячу разів менша, ніж у рутині (табл. 1).

Як показано в таблиці 1, стандарти БФ цитрусових можуть відновлювати супероксидний радикал. Залежно від ступеня антисупероксидної активності речовини, які вивчають, можна розташувати в такому порядку величин  $K_1$ : кверцетин < рутин < гесперитин < нарингін і гесперидин < нарингін.

Кверцетин володіє також найбільшою здатністю зв'язувати іони  $Fe^{2+}$ . Хелатуюча активність рутину в 3,2 рази нижча, ніж його аглікону кверцетину. При цьому глікозиди гесперидин і нарингін проявляють у декілька разів вищу хелатуючу активність, ніж відповідні аглікони гесперитин і нарингін (табл. 1). Ці дослідження доповнюють результати робіт А.П. Потаповича і В.С. Феденко [8, 10], в яких показана

Таблиця 1 – Антиоксидантна, антирадикальна, антисупероксидна і хелатуюча активність біофлавоноїдів цитрусових,  $K_1$ , М

Препарат	Антиоксидантна активність	Антирадикальна активність	Антисупероксидна активність	Хелатуюча активність
Кверцетин	$2,10 \cdot 10^{-4}$	$5,43 \cdot 10^{-6}$	$9,62 \cdot 10^{-5}$	$5,40 \cdot 10^{-5}$
Рутин	$14,53 \cdot 10^{-4}$	$1,31 \cdot 10^{-5}$	$5,84 \cdot 10^{-4}$	$1,75 \cdot 10^{-4}$
Гесперитин	$8,91 \cdot 10^{-4}$	$0,90 \cdot 10^{-3}$	$1,70 \cdot 10^{-3}$	$1,32 \cdot 10^{-3}$
Гесперидин	$26,80 \cdot 10^{-4}$	$1,31 \cdot 10^{-2}$	$3,51 \cdot 10^{-3}$	$5,31 \cdot 10^{-4}$
Нарингін	$36,52 \cdot 10^{-4}$	$1,76 \cdot 10^{-2}$	$3,50 \cdot 10^{-3}$	$1,51 \cdot 10^{-3}$
Нарингін	$161,04 \cdot 10^{-4}$	$4,40 \cdot 10^{-2}$	$8,31 \cdot 10^{-3}$	$4,09 \cdot 10^{-4}$

здатність деяких БФ проявляти хелатуючу активність.

Нам не вдалося виявити у БФ цитрусових здатність руйнувати перекис водню в модельній системі *in vitro*. Можливо, наявні відомості про антиперекисну активність БФ пов'язані з їх опосередкованою дією на ферменти каталазу або глутатіонпероксидазу.

Отже, проведені дослідження показали яскраво виражену антирадикальну (АРА), загальну антиоксидантну (АОА), антисупероксидну (АСА) і хелатуючу активність (ХА) кверцетину. Його глікозид рутин також володіє високою здатністю гальмувати утворення МДА, відновлювати супероксидний радикал ДФПГ, а також зв'язувати іони  $Fe^{2+}$ , однак у всіх модельних дослідах активність рутину в 3-10 разів нижча, ніж кверцетину. Це узгоджується з даними E.L. Silva та ін. [19]. Далі за ступенем зниження активності знаходиться гесперитин. При цьому його активність набагато більш виражена в усіх випадках порівняно з активністю БФ грейпфрута нарингін, АОА, АРА, АСА і ХА якого виявились найслабшими.

Загалом, за результатами проведеного дослідження БФ цитрусових їх можна розта-

шувати за ступенем прояву антиоксидантної активності в модельних системах *in vitro* таким чином: кверцетин > рутин > гесперитин > гесперидин = нарингін > нарингін.

БФ нарингін і гесперитин відносять до групи флаванонів, а кверцетин – до флавонолів (див. рис. 1). Загальною для цих речовин є наявність в 5 і 7 положеннях кільця А гідроксилів. У кільці В нарингіні розміщена гідроксильна група в 4'. Гесперитин відрізняється від нарингіні тим, що гідроксильна група кільця В розташована в 3', а в 4' – метоксигрупа.

Основною відмінною особливістю флавонолів, з якою можна пов'язати їх яскраво виражені антиоксидантні властивості, є наявність гідроксильної групи в 3 положенні гетероциклу С, крім гідроксилів у 5 і 7 положеннях кільця А. У кільці В молекули кверцетину, крім того, є ще два гідроксили в 3' і 4' положеннях. Таким чином, молекула кверцетину містить п'ять гідроксильних груп, гесперитину – три гідроксили й одну метоксигрупу, а нарингіні – три гідроксили. Тому можна вважати, що АОА, АРА і АСА біофлавоноїдів пов'язані з наявністю в їх молекулі гідроксильних груп в 5 і 7 положен-

нях кільця А, які є у всіх БФ, які вивчають. Ступінь АОА, АРА і АСА зростає зі збільшенням кількості гідроксильних груп і метоксигрупи у кільці В.

Активність глікозидних форм БФ у всіх випадках набагато нижча, ніж у відповідних агліконів. Винятком є хелатуючі властивості нарингину і гесперидину, інтенсивність прояву яких в декілька разів вища, ніж у відповідних агліконів. Тому можна вважати, що хелатуюча здатність БФ більшою мірою пов'язана з конформацією молекули.

Таким чином, ступінь здатності БФ цитрусових запобігати перекисному окисненню твіну-80, відновлювати супероксидний радикал і вільний радикал ДФПГ, пов'язаний з кількістю в їх молекулі гідроксильних груп з рухомим атомом водню, а у флаванолів – з наявністю гідроксилу в 3 положенні кільця С, що підтверджує висновки робіт [14, 15]. Ступінь

хелатуючої активності БФ залежить від конформації молекули.

**ВИСНОВКИ.** Проведені дослідження показали здатність основних БФ апельсина, мандарина і грейпфрута інгібувати утворення супероксидрадикала, гідроксилрадикала, малонового дільдегіду, а також зв'язувати іони  $Fe^{2+}$ , за присутності яких створюються первинні й вторинні вільні радикали. Важливо підкреслити, що антиоксидантні властивості кверцетину, рутину, а також агліконів гесперитину і нарингину реалізуються завдяки антирадикальній та антисупероксидній активності, а глікозидів гесперидину і нарингину – завдяки вищій хелатуючій активності.

Таким чином, БФ цитрусових є неспецифічними антиоксидантами, що проявляють багатofакторний вплив на утворення різних форм АФК і ліпідних перекисів.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Воейков В.Л. Активные формы кислорода – патогенны или целители? // Клин. геронтология. – 2003. – **9**, № 3. – С. 27-40.

2. Горячковский А.М. Определение общей антиоксидантной активности плазмы и эритроцитов // В кн.: Клінічна біохімія в лабораторній діагностиці. – 3-те вид., вип. і доп. – Одеса: Екологія, 2005. – С. 379-380.

3. Губский Ю.И., Юрженко Н.Н., Шаповал Н.Н. и др. Антирадикальная и антиокислительная активность некоторых мембранотропных препаратов синтетического и растительного происхождения // Укр. биохим. журн. – 1998. – **70**, № 3. – С. 128-134.

4. Дудченко Л.Г., Кривенко В.В. Пищевые растения – целители. – К.: Наук. думка, 1988. – 272 с.

5. Заводник Л.Б., Шкодик А.П., Вилянек М. и др. Исследование антиоксидантных свойств изофлавонона – генистеин-8-С-гликозида *in vitro* и *in vivo* // Эксперим. и клин. фармакол. – 2006. – **69**, № 1. – С. 48-52.

6. Костюк В.А., Потапович А.И., Терещенко С.М., Афанасьев И.Б. Антиокислительная активность флаваноидов в различных системах перекисного окисления липидов // Биохимия. – 1988. – **53**, вып. 8. – С. 1365-1370.

7. Лушак В.І., Багнюкова Т.В., Лужна Л.І. Показники оксидативного стресу. 2. Пероксиди ліпідів // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 6. – С. 113-128.

8. Потапович А.П., Костюк В.А. Сравнительное исследование антиоксидантных свойств и цитопротекторной активности флаваноидов // Биохимия. – 2003. – **68**, вып. 5. – С. 632-638.

9. Сазонтова Т.Г., Архипенко Ю.В. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – № 3. – С. 2-18.

10. Феденко В.С., Шемет С.А. Металл-хелатирующая способность растительных полифенолов в

формировании резистентности организма // Вісник стоматології. – 2006. – Спецвипуск № 3 (**53**). – С. 31.

11. Формазюк В.И. Энциклопедия пищевых лекарственных растений. – К.: А.С.К., 2003. – С. 178-185.

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

13. Andersen O.M., Markham K.R. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Application // CRC Press. – 2005. – 1256 p.

14. Cao G., Sofic E., Prior R. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships // Free Radic. Biol. Med. – 1997. – **22** (5). – P. 749-760.

15. Cos P., Calomme M., Li I. et al. Flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxid scavengers: Abstr. 9<sup>th</sup> Bicen. Meet. Int. Soc. Free Radic. Res. "Free Radic. Res. 21<sup>th</sup> Century" Sao Paulo, 7-11 Sept. 1998 // Rev. Farm. e Bioquim. Univ. Sao Paulo. – 1998. – **34**, Suppl. № 1. – P. 206.

16. Kroger G. The antioxidant activity of citrus fruit peels // Z. Ernährungswiss. – 1986. – **25**. – P. 63-69.

17. Middleton E., Kandaswami C., Theoharides T. The effect of plant flavonoides on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease and cancer // Pharmacological Review. – 2000. – **52**, №4. – P. 673-701.

18. Nadaromlu H., Demir Y., Demir N. Antioxidant and radical scavenging properties of Iris Germanica // Химико-фарм. журн. – 2007. – **41**, № 8. – С. 13-18.

19. Silva E.L., Tsushida T., Terao J. Quercetin-mono-glucosides inhibit 15-lipoxygenase-induced LDL oxidation: Abstr. 9<sup>th</sup> Bicen. Meet. Int. Soc. Free Radic. Res. "Free Radic. Res. 21<sup>st</sup> Century", Sao Paulo, 7-11 Sept. – 1998 // Rev. Farm. e Bioquim. Univ. Sao Paulo. – **34**, Suppl № 1. – P. 196.

## АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ БИОФЛАВОНОИДОВ ЦИТРУСОВЫХ

О.А. Макаренко  
ИНСТИТУТ СТОМАТОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ, ОДЕССА

### Резюме

В работе представлены результаты исследования антиоксидантной активности стандартов биофлавоноидов цитрусовых в модельных системах окислительного стресса *in vitro*. Показано, что способность биофлавоноидов цитрусовых предотвращать окисление твина-80, восстанавливать супероксидный радикал и свободный радикал дифенилпикрилгидразила, связана с наличием в их молекуле гидроксильных групп с подвижным атомом водорода. Степень хелатирующей активности этих соединений зависит от конформации их молекулы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биофлавоноиды цитрусовых, антиоксидантная активность, моделирование *in vitro*.

## ANTIOXIDANT ACTIVITY OF CITRUS BIOFLAVONOIDS

О.А. Makarenko  
INSTITUTE OF DENTISTRY OF AMS OF UKRAINE, ODESSA

### Summary

The results of the study of antioxidant activity of the standards of citrus bioflavonoids in the simulated systems *in vitro* are presented in the article. It was shown that the ability of citrus bioflavonoids to prevent the oxidation of twin-80, to restore the superoxide radical and free radical diphenylpicrylhydrazyl, is connected with the presence of hydroxyl groups with the hydrogen labile atom. The degree of chelating activity of these compounds depends on the conformation of their molecule.

KEY WORDS: citrus bioflavonoids, antioxidant activity, modeling *in vitro*.

Отримано 27.01.2009 р.

Адреса для листування: О.А. Макаренко, вул. Рішельєвська, 11, Одеса, 650026, Україна.

## ЗАСТОСУВАННЯ АЛЮМІНОНУ ДЛЯ РОЗРОБКИ СПОСОБУ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ДИЛТІАЗЕМУ ТА ВАЛІДАЦІЯ АНАЛІТИЧНОЇ МЕТОДИКИ

Ю.В. Тимошик, В.В. Петренко  
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

*Запропоновано спектрофотометричний спосіб кількісного визначення дилтіазему гідрохлориду в готовій лікарській формі (таблетках), в основі якого лежить реакція препарату з алюміноном. Спосіб характеризується високою чутливістю, точністю та простотою виконання. Визначені основні валідаційні характеристики методики.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** дилтіазем, алюмінон, спектрофотометрія, кількісне визначення, валідація аналітичної методики.

**ВСТУП.** Дилтіазем-(2S, 3S)-3-ацетилокси-5-[-2-(диметил-аміно)етил]-2-(4-метокси-феніл)-2,3-дигідро-1,5-бензотіазепін-4(5H)-он гідрохлорид – препарат з групи антагоністів кальцію, похідне бензотіазепіну. Його широко застосовують у сучасній кардіологічній практиці при ішемічній хворобі серця (стабільна стенокардія напруги, вазоспастична стенокардія). Проявляє антиангінальну дію, а також антиаритмічну активність [3-5].

Згідно з розглянутою літературою, лікарські форми, які містять дилтіазем, можна аналізувати, використовуючи інструментальні методи, зокрема екстрактивні спектрофотометричні, які ґрунтуються на екстракції  $\text{CHCl}_3$  іонпарних комплексів, що утворюються при взаємодії з бромтимоловим голубим, бромфеноловим голубим або бромкрезоловим зеленим в кислому середовищі [6]; непрямі спектрофотометричні, які базуються на окисненні N-бромсукцинімідом; спектрофотометричний метод визначення дилтіазему гідрохлориду, що ґрунтується на окисненні препарату за присутності надлишку  $\text{FeCl}_3$  і N-бромсукциніміду з 1,10-фенантроліном або метилсульфаніламідом [7].

Нами був запропонований метод спектрофотометрії у видимій ділянці спектра на основі реакції дилтіазему гідрохлориду з алюміноном. Алюмінон – амонійна сіль ауринтрикарбонової кислоти – є селективним реактивом у неорганічному аналізі для визначення солей алюмінію з утворенням червоного лаку. Аналогічно реагують з алюміноном берилій, ітрій,

лантан, церій, неодим, ербій, цирконій, торій, а також іони заліза, хрому і кальцію. Іммобілізований алюмінон використовують як чутливий шар оптичного сенсора на двовалентну мідь. Методом катодної адсорбційної інверсійної вольтамперометрії алюмінон застосовують для визначення слідів шестивалентного урану і двовалентного цинку.

Нами були вивчені умови реакції дилтіазему гідрохлориду з алюміноном, дана реакція покладена в основу кількісного визначення дилтіазему гідрохлориду в лікарській формі – таблетках.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Об'єктом дослідження були таблетки “ДИЛТІАЗЕМ – РЕТАРД 0,09 г” ТОВ “Стиролбіофарм”, м. Горлівка (серія 010408), що містять такі допоміжні речовини, як: віск монтановий гліколевий, целюлоза мікрокристалічна, цукор молочний (лактоза), масло вазелінове, магнію стеарат, ойдрагіт RL 100, ойдрагіт RS 30 D. Як стандарт використовували субстанцію дилтіазему гідрохлориду.

У роботі застосовували аналітичне обладнання – спектрофотометр SPECORD 200 – 222U214, терези АДВ 200, реактиви та розчинники, що відповідають вимогам АНД: алюмінон кваліфікації ч.д.а., воду очищену (ДФУ).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Експериментально було встановлено, що водний розчин дилтіазему гідрохлориду реагує з водним розчином алюмінону при кімнатній температурі з утворенням продукту реакції червоного кольору з максимумом світлопоглинання при 534 нм (рис. 1).

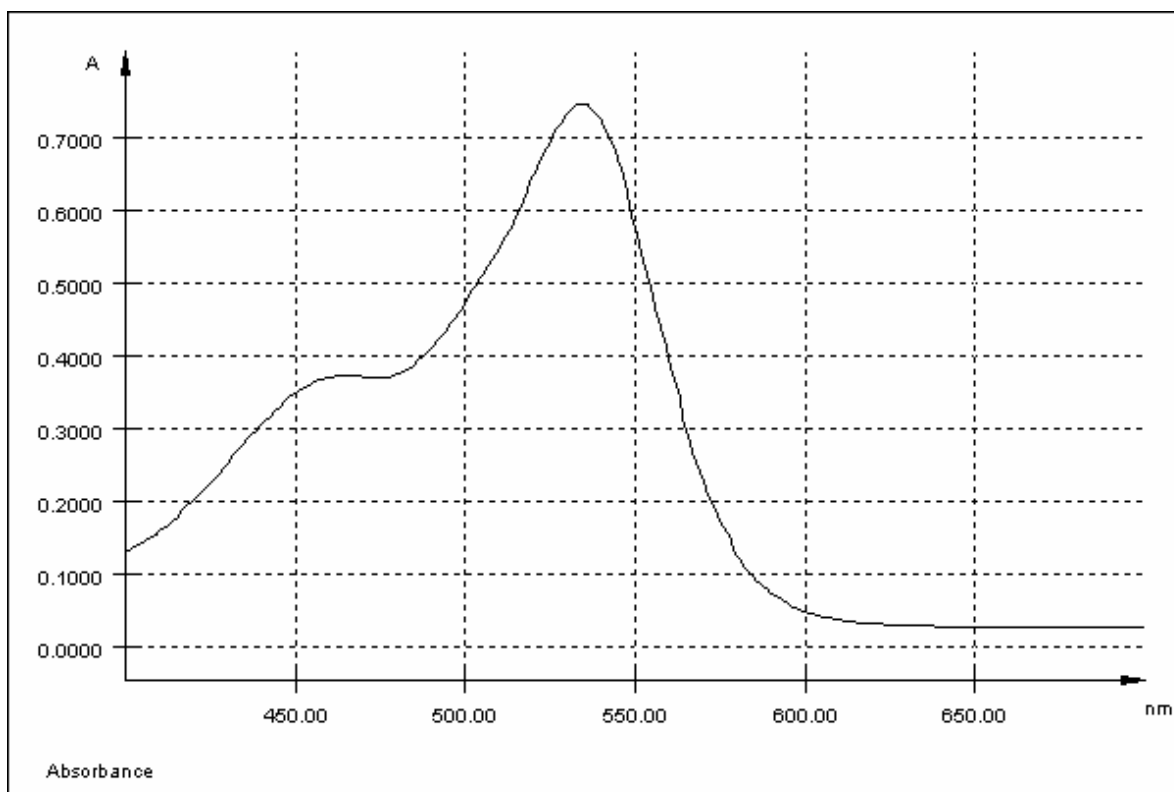


Рис. 1. Спектральна характеристика продукту реакції дилтіазему гідрохлориду з алюмінієм.

Підпорядкування основному закону світлопоглинання перебувало в межах концентрації дилтіазему гідрохлориду 4,2-8,4 мг/100 мл.

Розрахунок грамового вмісту в готових лікарських формах проводили методом стандарту, використовуючи водний розчин дилтіазему.

*Кількісне визначення дилтіазему в таблетках Випробуваний розчин.* Таблетки, які аналізують, розтирають у порошок. Наважку таблеткової маси, яка містить 0,03-0,05 г дилтіазему, розчиняють у воді очищеній в колбі ємністю 50 мл, доводять до позначки тим же розчинником, перемішують, фільтрують. Перші порції фільтрату відкидають. 2 мл отриманого розчину вміщують у мірну колбу ємністю 25 мл, додають 3 мл 0,8 % водного розчину алюмінію і доводять водою очищеною до позначки, перемішують.

Паралельно проводять дослід з розчином порівняння дилтіазему і компенсаційним розчином, який не містить об'єкта дослідження.

*Розчин порівняння.* 0,035 г (точна наважка) субстанції дилтіазему вміщують в мірну колбу ємністю 50 мл, розчиняють у воді очищеній, ретельно перемішуючи, доводять цим же розчинником до позначки. 2 мл одержаного розчину переносять в мірну колбу ємністю 25 мл, додають 3 мл 0,8 % водного розчину алюмінію і доводять водою очищеною до позначки.

Оптичну густину досліджуваного розчину та розчину порівняння вимірюють за допомогою спектрофотометра при довжині хвилі 534 нм у кюветях з товщиною шару 1 см.

Розрахунок вмісту дилтіазему в грамах проводять за формулою:

$$X = \frac{A \cdot C_0 \cdot M_{cp} \cdot 50 \cdot 25}{A_0 \cdot a \cdot l \cdot 2 \cdot 100}$$

де  $A$  – оптична густина досліджуваного розчину;  
 $A_0$  – оптична густина стандартного розчину;  
 $C_0$  – концентрація стандартного розчину (0,0028 г/100 мл);

$M_{cp}$  – середня маса таблеток, г;  
 $a$  – наважка таблеткової маси, г;  
 $l$  – товщина шару, см.

Результати кількісного визначення дилтіазему в таблетках наведені у таблиці 1.

*Валідація розробленої методики.* Згідно з вимогами Державної Фармакопеї України (ДФУ) [2], методики кількісного визначення, які включають до аналітичної нормативної документації, повинні бути валідовані. Відповідно до вимог ДФУ, розглянуто такі параметри: діапазон застосування, специфічність, лінійність, робастність, збіжність та правильність.

*Діапазон застосування (range) аналітичної методики.* Нами був обраний діапазон засто-



Таблиця 1 – Результати кількісного визначення дилтіазему в таблетках

Лікарська форма	Проба, яку аналізують	Знайдено, г	Вміст дилтіазему згідно з аналітичною нормативною документацією, г
Таблетки “ДИЛТІАЗЕМ-РЕТАРД”, вміст дилтіазему гідрохлориду 0,09 г Серія 010408	Наважка таблеткової маси, 0,1073 г	0,0867	0,083-0,097
	Наважка таблеткової маси, 0,1256 г	0,0874	
	Наважка таблеткової маси, 0,1455 г	0,0859	
	Наважка таблеткової маси, 0,1535 г	0,0927	
	Наважка таблеткової маси, 0,1653 г	0,0918	
	Наважка таблеткової маси, 0,1840 г	0,0888	

сування від 80 до 120 % згідно з методиками кількісного визначення за ДФУ[2].

*Невизначеність аналітичної методики.* Розрахунок критеріїв прийнятності методики аналізу: максимально допустимій повної невизначеності –  $\max\Delta_{\text{ас}} = 2,40\%$ , яка пов'язана із симетричними допусками вмісту  $\pm 7,5\%$  [1], максимальної систематичної похибки –  $\max\delta = 1,02\%$ , внесок плацебо в сумарну величину фонового поглинання відсутній, критичне значення для остаточного стандартного відхилення –  $RSD_{\text{о}}\% = \max\Delta_{\text{ас}}/t(95, n-2) = 1,69$ , індексу кореляції –

$R_c = 0,99571$  і практичної невизначеності вільного члена лінійної залежності –  $a = 3,8\%$ .

*Стабільність розчинів у часі.* Найважливішою характеристикою є стійкість аналізованих розчинів у часі (приготовлених за вищевказаною методикою). В АНД не регламентується, через який проміжок часу після приготування аналітичного розчину необхідно проводити дослід, тому ми обрали діапазон часу 2 год. Отримані результати наведені у таблиці 2. Як видно,  $\Delta_t \leq \max\delta = 0,77\%$ , отже, розчини стабільні протягом 2 год.

Таблиця 2 – Результати вивчення стабільності досліджуваного розчину та розчину порівняння

t, хв, A <sub>i</sub>							Середнє	RSD <sub>t</sub> , %	Δ <sub>t</sub> , %	maxδ, %
0	20	40	60	80	100	120				
0,2504	0,2515	0,2518	0,2521	0,2526	0,2524	0,2529	0,2520	0,0033	0,0020	0,77
0,2505	0,2512	0,2515	0,2520	0,2521	0,2525	0,2527	0,2518	0,0031	0,0019	

*Прогноз невизначеності пробопідготовки.* Для прогнозу невизначеності пробопідготовки ( $\Delta_{\text{сп}}$ ) було розраховано похибки кожної операції для розчину порівняння та випробовуваних розчинів, а також загальну невизначеність ( $\Delta_{\text{сп}}$ ). Для цього використовували підхід і граничні невизначеності мірного посуду [2].  $\Delta_{\text{сп}} = 1,06\%$ .

*Повна невизначеність аналізу.* Повну невизначеність аналізу обчислювали за формулою:

$$\Delta_{\text{As}} = \sqrt{\Delta_{\text{сп}}^2 + \Delta_{\text{FAO}}^2},$$

де  $\Delta_{\text{сп}}$  – невизначеність пробопідготовки методики;

$\Delta_{\text{FAO}}$  – прогнозована невизначеність вимірювань = 0,70 % [1];

$$\Delta_{\text{As}} = 1,27\% \leq \max\Delta_{\text{As}} = 2,40\%.$$

Як видно, прогнозована повна невизначеність результатів не перевищує критичного значення  $\max\Delta_{\text{As}}$ .

Таким чином, методика буде давати коректні результати і в інших лабораторіях.

*Перевірка незначущості фонового поглинання.* Вплив плацебо у “ДИЛТІАЗЕМ – РЕТАРД” таблетки по 0,09 г. Розчин плацебо готували так само, як і розчин препарату, але замість субстанції дилтіазему брали наважку суміші, яка складалася з таких допоміжних речовин, як: віск монтановий гліколевий, целюлоза мікрокристалічна, цукор молочний (лактоза), масло вазелінове, магнію стеарат, оїдрагіт RL 100, оїдрагіт RS 30 D у відповідних співвідношеннях.

Вимірювали оптичну густину ( $A_{\text{blank}}$ ) розчину плацебо. Паралельно вимірювали оптичну густину ( $A_{\text{ст}}$ ) розчину порівняння. Було знайдено:  $A_{\text{blank}} = -0,0431$ ,  $A_{\text{ст}} = 0,5041$ . Внесок плацебо в сумарне поглинання відсутній, тому модельні розчини готували без плацебо.

*Лінійність.* Лінійність визначали у межах концентрацій 80-120 % від номінального вмісту дилтіазему. Розчини з відомою концентрацією отримували шляхом розведення стандартного розчину дилтіазему гідрохлориду і наважок

лікарських форм та проводили визначення за вищезазначеною методикою. На основі отриманих даних будували графік залежності оптичної густини від концентрації лікарського засобу (рис. 2).

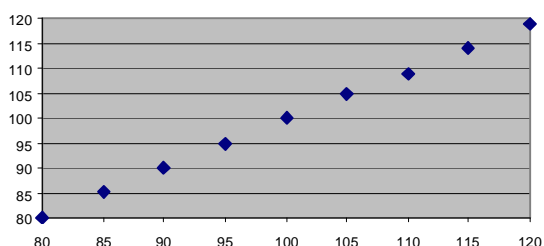


Рис. 2. Лінійна залежність оптичної густини від концентрації ділтіазему гідрохлориду в нормалізованих координатах.

Одержані величини  $b$ ,  $a$ ,  $s_b$ ,  $s_a$  (стандартні відхилення для  $b$  і  $a$ ),  $s$  (залишкове стандартне відхилення) і  $R_c$  (коефіцієнт кореляції) наведені у таблиці 3.

Розрахунок параметрів  $Y = bX + a$  проводили за допомогою методу найменших квадратів.

**Збіжність та правильність.** Збіжність та правильність досліджуваної методики визначали одночасно. Оптичну густину всіх 9 розчинів вимірювали при аналітичній довжині хвилі й встановлювали відношення знайденої концентрації до введеної у відсотках (табл. 4).

Із таблиці 4 видно, що методика аналізу характеризується достатньою збіжністю та правильністю у всьому діапазоні концентрацій (80-120%).

Таблиця 3 – Метрологічні характеристики лінійної залежності

Величини	Значення	Критерії для допуску (97,0-102,00 %), число точок 9	Висновок (відповідає чи ні)
$B$	0,999863	–	–
$S_b$	0,006069	–	–
$a$	2,69667	1) $\leq 1,8946 \cdot S_a = 1,16$ 2) якщо не виконується 1), то $\leq 3,8$	відповідає
$S_a$	0,612	–	–
$S_r$	0,235044	$\leq 1,27$	–
$r$	0,999863	$\geq 0,99571$	відповідає

Таблиця 4 – Результати перевірки правильності та збіжності

№ модельного розчину	Наважки ділтіазему, мг ( $m_{st} = 0,035$ )	Введено у % до концентрації розчину порівняння ( $X_{факт}$ %)	Оптичні густини $A_i$	Знайдено у % до концентрації розчину порівняння ( $Y_i$ %)	Знайдено у % до введеного $Z_i = 100(Y_i/X_i)$
1	0,0140	80	0,3983	80,04	100,1
2	0,0149	85	0,4230	85,01	100,0
3	0,0158	90	0,4474	89,91	99,90
4	0,0166	95	0,4723	94,92	99,92
5	0,0175	100	0,4976	100	100,0
6	0,0184	105	0,5210	104,7	99,71
7	0,0193	110	0,5409	109	99,10
8	0,0201	115	0,5662	114	99,13
9	0,0210	120	0,5918	119	99,17
Середнє $Z_i$					99,67
Відносне стандартне відхилення, $S_{z_i}$ %					0,24
Відносний довірчий інтервал $\Delta_z\% = t(95\%, 8) \cdot S_z = 1,860 \cdot S_z$					0,45
Критичне значення для збіжності результатів $\Delta\%$					2,40
Систематична похибка $\delta =  Z - 100 $					0,33
Критерій невизначеності систематичної похибки 1) $\delta \leq \Delta/3 = 0,45/3 = 0,15$ ; 2) якщо не виконується 1), то $\delta \leq 0,77$					виконується
Загальний висновок щодо методики					коректна

ВИСНОВКИ. 1. Запропоновано спектрофотометричний спосіб кількісного визначення дилтіазему гідрохлориду за реакцією з алюмініном.

2. Показано можливість застосування опрацьованої методики для визначення дилтіазему гідрохлориду в готових лікарських формах.

3. Визначені основні валідаційні характеристики методики кількісного визначення.

4. Запропонована методика характеризується високою чутливістю, простотою виконання і може бути використана при контролі якості лікарських засобів.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В. и др. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 1-15.

2. Державна Фармакопея України: Доп. 1. – Х.: РІРЕГ, 2004. – С. 85-100.

3. Львова Л.В. Сердечные лекарства // Провизор. – 1999. – № 9. – С. 100-102.

4. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: Новая волна, 2000. – 1. – 417 с.

5. Сидоренко Б.А., Преображенский Д.В. Фармакотерапия гипертонической болезни // РМЖ. – 1998. – 6, № 20. – С. 30-29.

6. Nafisur R., Syed Najmul Muslim H.-A. Extractive spectrophotometric methods for determination of diltiazem HCl in pharmaceutical formulations using bromothymol blue, bromophenol blue and bromocresol green // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2000. – 24, № 1. – P. 33-41.

7. Sastry C.S.P., Steedhar K., Reddy M. Visible spectrophotometric method for determination of diltiazem hydrochloride// Indian J. Pharm. Sci. – 1995. – 57, № 4. – P. 170-172.

## ПРИМЕНЕНИЕ АЛЮМИНОНА ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СПОСОБА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДИЛТИАЗЕМА И ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ

Ю.В. Тимошик, В.В. Петренко  
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

#### Резюме

Предложен спектрофотометрический способ количественного определения дилтиазема гидрохлорида в готовой лекарственной форме (таблетках), в основе которого лежит реакция препарата с алюминином. Способ характеризуется высокой чувствительностью, точностью и простотой выполнения. Определены основные валідаційні характеристики методики.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дилтіазем, алюмінін, спектрофотометрия, количественное определение, валідація аналітичної методики.

## APPLICATION OF ALUMINON FOR DEVELOPMENT OF METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF DILTIAZEM AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD

Yu.V. Tymoshyk, V.V. Petrenko  
ZAPORIZHYAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

#### Summary

The method of quantitative spectrophotometric identification of diltiazem tablets was worked out. It is based on the interaction of preparation with aluminonum. This method is highly sensitive and easy executable. The basic characteristics of diltiazem validation assays have been carried.

KEY WORDS: diltiazem, aluminonum, spectrophotometric method, quantitative determination, validation of analytical method.

Отримано 24.11.2008 р.

Адреса для листування: Ю.В. Тимошик, Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.

## ВИВЧЕННЯ МІНЕРАЛЬНОГО СКЛАДУ ЛИСТЯ ТА ЕКСТРАКТУ ЯГЛИЦІ ЗВИЧАЙНОЇ

О.О. Койро, С.І. Степанова, С.Ю. Штриголь  
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Визначено кількісний вміст 19 макро- і мікроелементів у листі та екстракті яглиці звичайної (*Aegorodium podagraria* L.). Виявлено значний вміст K, Ca, Mg, P, Fe, Cu, Zn, Si в листі та K, Ca, Mg – в екстракті.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: яглиця звичайна, листя, екстракт, макро- та мікроелементи.

ВСТУП. Вивчення мінерального складу рослин має важливе значення для стандартизації лікарської рослинної сировини та препаратів, створених на її основі. Особливо актуальним це стає в умовах сучасної екологічної ситуації.

Рослини накопичують есенціальні елементи, що відіграють суттєву роль у профілактиці та лікуванні захворювань, викликаних порушенням мінерального балансу організму. Використання рослин як джерела мінеральних речовин є доцільним та перспективним, оскільки елементи в них перебувають у зв'язаному з органічними сполуками стані та в оптимальних співвідношеннях, завдяки чому краще засвоюються організмом людини [2].

Яглиця звичайна (*Aegorodium podagraria* L.) – представник родини селерових (Ariaceae), багаторічна трав'яниста рослина з довгим повзучим кореневищем, широко розповсюджена в лісовій та лісостеповій зонах України. Часто зустрічається в листяних, мішаних, хвойних лісах, між чагарниками та на вирубках, лісових полянах і заливних луках, біля житла, в парках, утворює великі зарості [3, 7]. Хімічний склад яглиці звичайної вивчено недостатньо. В рослині ідентифіковано вуглеводи: умбеліферозу, глюкозу, фруктозу; циклітоли: сциліт, глюцинол; лектини; кумарини: умбеліферон, бергаптен, ксантотоксин; β-ситостерин; холін. Надземна частина містить вітаміни: аскорбінову кислоту, каротин; флавоноїди: кверцетин, кемпферол, а також їх глікозиди; амінокислоти. В листі та квітках ідентифіковано поліацетиленові сполуки: фалькаринолон, фалькаринон, фалькаринол, фалькариндіол, цис-гептадекадієн-1,8-диін-4,6-діол-3,10, гептадекадієн-1,5-диін-4,6-діол-3,10, цис-ацетоксигептадекадієн-1,8-диін-4,6-ол-3, транс-10-цетоксигеп-

тадекадієн-1,9-диін-4,6-ол-3-он-8, (2цис,9цис)-гептадекадієн-2,9-диін-4,6-ол. Досліджено склад ліпофільної фракції листя та ефірної олії квіток і листя [3, 7-9].

Яглиця проявляє загальнозміцнювальну, дезінтоксикаційну, антигіпоксичну дії. Її широко застосовують у народній медицині при ревматизмі, артриті, артрозі, подагрі [3, 7]. Літературні дані та отримані нами результати свідчать про діуретичну, нефропротекторну, урикозуричну та протизапальну активність галенових препаратів цієї рослини [4, 5, 6, 8, 10].

Метою нашої роботи було вивчення мінерального складу перспективного виду сировини – листя та екстракту яглиці звичайної.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктами дослідження були листя яглиці звичайної з різних регіонів, ґрунт, на якому зростали рослини, та сухий екстракт листя яглиці (екстрагент – вода).

Подрібнені проби обробляли кислотою сірчаною та спалювали в муфельній печі при температурі 500 °C протягом 1 год. Мікро- та макроелементний склад визначали методом атомно-емісійної спектроскопії на базі ДНУ НТК "Інститут монокристалів" НАН України. Метод оснований на випарюванні золи досліджуваної проби в дуговому розряді, фотографічній реєстрації розкладеного в спектр випромінювання, вимірюванні інтенсивності спектральних ліній окремих елементів на приладі ДФС-8 та порівнюванні їх зі стандартними сумішами мінеральних речовин.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В листі, екстракті яглиці звичайної та ґрунті визначено кількісний вміст 19 мінеральних елементів. Результати дослідження наведено в таблиці 1.

Отримані дані свідчать про значний вміст у сировині таких елементів, як кременій (500-

Таблиця 1 – Макро- та мікроелементний склад листя, екстракту яглиці звичайної та ґрунту, мг/100 г

Елемент	м. Харків			м. Рівне		Болгарія, вершина Ком		Чернігівська обл.	
	Листя (проба № 1)	Листя (проба № 2)	Ґрунт (проба № 2)	Листя	Ґрунт	Листя	Ґрунт	Листя	Екстракт
Fe	15	89	3600	520	3400	95	3600	70	8
Si	500	720	32000	2150	–	630	–	1140	1600
P	210	300	340	310	–	190	–	210	640
Mn	4	7	180	20	130	9	200	20	20
Al	55	140	6600	380	6500	240	7000	100	10
Pb	0,1	0,2	3	0,5	3	<0,03	3	<0,03	<0,03
Mg	550	630	950	1020	–	420	–	570	1200
K	8300	5730	1600	7680	1800	3810	1900	4860	16000
Ni	0,5	0,5	5	0,25	2	0,1	4	0,3	2
Ca	1500	1430	2000	2050	4000	1040	3000	1150	2400
Mo	0,1	0,09	0,5	<0,03	0,5	0,2	0,5	0,1	0,8
Cu	0,7	4	3	1,2	5	0,7	3	0,7	0,8
Na	–	360	1300	770	1500	70	1450	170	800
Zn	<0,05	2	3	130	5	10	20	10	20
Sr	1,8	5	<1	5	30	1	20	3	2
Cd	<0,01	–	–	<0,001	–	<0,001	–	<0,001	<0,001
As	<0,01	–	–	<0,001	–	<0,001	–	<0,001	<0,001
Hg	<0,01	–	–	<0,001	–	<0,001	–	<0,001	<0,001
Co	<0,05	–	–	<0,003	–	<0,003	–	<0,03	<0,03

Примітка. “–” – не визначали.

1140 мг/100 г), фосфор (190-300 мг/100 г), магній (420-1020 мг/100 г), кальцій (1040-2050 мг/100 г), залізо (15-95 мг/100 г), мідь (0,7-4 мг/100 г), цинк (0,05-10 мг/100 г) тощо. З макроелементів у сировині переважає калій (3810-8300 мг/100 г). Його вміст складає близько 60 % від маси золи.

Накопичення калію можна вважати метаболічною особливістю рослини, оскільки у відповідних зразках ґрунту його вміст невеликий, коефіцієнт накопичення коливається від 2,0 до 4,3. Крім того, калій у значній кількості переходить в екстракт (16 000 мг/100 г). Це, зважаючи на діуретичні властивості препаратів яглиці, дає змогу компенсувати надмірну втрату калію, яка має місце при використанні багатьох сечогінних засобів. За вмістом калію яглиця переважає більшість видів рослин. Порівняно з іншими його вміст співвідносний, наприклад листя петрушки (*Petroselinum crispum*) накопичує калій у кількості 5150 мг/100 г. Особливістю яглиці можна вважати також накопичення магнію – біохімічного та фармакологічного синергіста калію. За його

вмістом яглиця не поступається петрушці (490 мг/100 г), споришу (420 мг/100 г), суниці лісовій (450 мг/100 г) тощо [1].

Вміст таких токсичних елементів, як кадмій, арсен, кобальт та ртуть, перебуває в межах гранично допустимих концентрацій для сировини та харчових продуктів [3].

Щодо плюмбуму привертає увагу той факт, що рослинна сировина, яку збирали в межах великих міст (Харків, Рівне), накопичує його у більшій кількості. Очевидно, це пов'язано з адсорбцією даного елемента з вихлопних газів, бо зразки, зібрані далеко від великих міст (Болгарія, Чернігівська обл.), містять значно менше плюмбуму.

**ВИСНОВКИ.** 1. Проведено дослідження елементного складу листя та екстракту яглиці звичайної. Зважаючи на багатий якісний склад і кількісний вміст макро- та мікроелементів, сировину яглиці можна вважати перспективним джерелом мінеральних речовин.

2. Дані елементного аналізу можуть бути критерієм чистоти заготовленої сировини.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Ловкова М.Я., Рабинович А.М., Пономарева С.М. и др. Почему растения лечат. – М.: Наука, 1989. – 256 с.
2. Скальный А.В., Рудаков И.А. Биоэлементы в медицине. – М.: Изд. дом “Оникс 21 век”: Мир, 2004. – 272 с.
3. Стогова Н. Сныть и бедренец против ста болезней. – С.Пб.: Питер, 2006. – 96 с.
4. Товчига О.В., Штрыголь С.Ю., Степанова С.И. Возможная связь мочегонного действия сныти обыкновенной и ее фитохимических особенностей // Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України: Матеріали VI Національного з'їзду фармацевтів України, 28-30 вересня 2005 р. – Харків: НФаУ, 2005. – С. 787.
5. Товчига О.В., Штрыголь С.Ю., Степанова С.И. и др. Получение, анализ, исследование острой токсичности и ренальных эффектов настойки сныти обыкновенной (*Aegopodium podagraria* L.) // Запорож. мед. журн. – 2005. – № 1. – С. 121-124.
6. Товчига О.В., Штрыголь С.Ю., Степанова С.И. Вплив екстракту яглиці звичайної на перебіг нефротоксичної ниркової недостатності в експерименті // Експерим. та клін. медицина. – 2007. – № 1. – С. 33-37.
7. Штрыголь С.Ю., Степанова С.И., Товчига О.В. и др. Сныть обыкновенная (*Aegopodium podagraria* L.). Перспективы применения в медицине // Провизор. – 2008. – № 7. – С. 50-53.
8. Christensen L.P., Brandt K. Bioactive polyacetylenes food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2006. – **41**. – P. 683-693.
9. Kapetanos C., Karioti A., Bojovic S. et al. Chemical and Principal-Component Analyses of the Essential Oils of Apioidae Taxa (Apiaceae) from Central Balkan // Chem. Biodivers. – 2008. – **5**, № 1. – P. 101-119.
10. Prior R.M., Lundgaard M.E., Light M.E. et al. Anti-inflammatory activity of *Aegopodium podagraria* L. // Planta Med. – 2007. – **73**.

## ИЗУЧЕНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА ЛИСТЬЕВ И ЭКСТРАКТА СНЫТИ ОБЫКНОВЕННОЙ

**О.О. Койро, С.И. Степанова, С.Ю. Штрыголь**  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

### Резюме

Определено количественное содержание 19 макро- и микроэлементов в листьях и экстракте сныти обыкновенной (*Aegopodium podagraria* L.). Обнаружено значительное содержание K, Ca, Mg, P, Fe, Cu, Zn, Si в листьях и K, Ca, Mg – в экстракте.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сныть обыкновенная, листья, экстракт, макро- и микроэлементы.

## INVESTIGATION OF MINERAL COMPOSITION OF LEAVES AND EXTRACT OF AEGOPODIUM PODAGRARIA L.

**O.O. Koyro, S.I. Stepanova, S.Yu. Shtryhol**  
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

### Summary

The quantitative content of 19 micro- and macroelements in the leaves and extract of *Aegopodium podagraria* L. has been determined. The great amount of K, Ca, Mg, P, Fe, Cu, Zn, Si was revealed in the leaves and K, Ca, Mg – in the extract.

KEY WORDS: *Aegopodium podagraria* L. leaves, extract, macro- and microelements.

Отримано 1.12.2008 р.

Адреса для листування: С.І. Степанов, вул. Гвардійців Широнінців, 23, кв. 297, Харків, 61054, Україна.

**ВИВЧЕННЯ В ЕКСПЕРИМЕНТІ ПРОТИБОЛЬОВОЇ ТА ПРОТИСУДОМНОЇ ДІЙ НОВОЇ КОМБІНАЦІЇ, ЩО МІСТИТЬ КАРБАМАЗЕПІН****Г.О. Сирова***ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ*

*Показано, що карбамазепін потенціює протибольову дію периферичного генезу калієвої солі 2,4-дихлорбензойної кислоти і кофеїну, а також сприяє протисудомній активності комбінації.*

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** карбамазепін, протибольова дія, протисудомна активність.

**ВСТУП.** Карбамазепін (5-карбамоіл-5-Н-добенз(b,f)азепін) – трициклічна сполука, яка за структурою подібна до трициклічних антидепресантів групи дибензоазепіну (іміпрамін). Він спочатку був рекомендований для лікування невралгії трійчастого нерва, але став необхідним в терапії епілепсії [1]. Карбамазепін широко застосовують у психіатрії як один із визнаних тимоізолептичних препаратів [4]. Його вважають золотим стандартом у лікуванні парціальних епілептичних нападів [2]. Доцільно використовувати карбамазепін для лікування депресій, навіть у хворих з ознаками органічного ушкодження мозку [5]. Самостійно або у комбінації з літієм його призначають для вторинної профілактики афективного психозу та шизоафективного розладу [5], в комбінації з галоперидолом та літієм – для терапії маніакальних станів [1, 7]. Підтверджено ефективність карбамазепіну при лікуванні алкогольної абстиненції та абстиненції, пов'язаної із прийманням бензодіазепінів, кокаїну [15].

Похідне іміностильбенів карбамазепін містить у 6 положенні карбамоїльну групу, що хімічно визначає наявність протисудомної активності препарату [3]. Ця активність зумовлена комплексним механізмом дії препарату, а саме: посиленням інгібуючих механізмів (тобто ГАМК-ергічної передачі), пригніченням збудливих механізмів (тобто глутаматергічної передачі) та надмірних розрядів нейронів, гальмуванням потенціалзалежних натрієвих каналів [12], взаємодією із центральними пуриновими рецепторами [3]. Завдяки таким механізмам дії карбамазепін, крім протисудомної активності, здатен зменшувати біль при різних неврологічних розладах (нейрогенний

біль, мігрень [9], невралгія трійчастого нерва [10], постгерпетична невралгія), позитивно впливати на пацієнтів з тривожністю, які страждають від депресії, манії [7].

Мішенню для анальгетичного ефекту карбамазепіну є, по-перше, ГАМК-ергічна система, тому що через специфічні ГАМК-ергічні рецептори ГАМК здатна модулювати ноцицептивну передачу [11]. Відомо, що протиепілептичні засоби, які збільшують концентрацію ГАМК, мають виражений анальгетичний ефект [7]. Тому їх застосування може сприяти зменшенню дози анальгетиків у пацієнтів з периферичним або центральним болем [13]. Другою мішенню для анальгетичного ефекту карбамазепіну є також глутаматергічна система [7], у зв'язку з тим, що іоно- й метаболітичні глутаматні рецептори залучені до передачі ноцицепції та виявлені у спинному мозку і мембранах аксонів демієлінізованих нервів, а також нервових закінченнях у шкірі [14]. Разом із тим, відомо, що запалення, особливо хронічне, сприяє збільшенню кількості демієлінізованих і мієлінізованих нервів з іонотропними глутаматними рецепторами [8]. Третьою мішенню для фармакологічної анальгетичної дії карбамазепіну є іонні канали.

Карбамазепін шляхом блокади потенціалзалежних натрієвих каналів попереджує вивільнення збуджувальних нейромедіаторних амінокислот (глутамату, аспартату).

Психотропна дія карбамазепіну разом з його активним впливом на провідні нейромедіаторні системи зумовлена дією на бензодіазепінові та опіатні рецептори з пригніченням активації аденілатциклази (циклічний аденозин) та гуанізинмонофосфату [5]. Наведені дані свідчать про наявність у карбамазепіну широкого спектра фармакологічної дії.

Метою роботи було вивчити в експерименті протибольову та протисудомну дії комбінації, що містить карбамазепін, калієву сіль 2,4-дихлорбензойної кислоти і кофеїн.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Досліди проведені на статевозрілих щурах лінії WAG популяції Вістар обох статей масою 190-300 г (протибольова дія) і білих безпородних мишах обох статей масою 20-30 г (протисудомна дія). Дослідження проводили згідно з методичними рекомендаціями Державного фармакологічного центру МОЗ України [6].

Протибольові властивості визначали за впливом на периферичний компонент больової реакції, який вивчали на моделі "оцтових судом" у щурів. Піддослідних щурів поділили на 5 груп по 6 у кожній. Тварини 1-ї групи (контрольної) одержували 3 % крохмальний слиз однократно внутрішньошлунково (2 мл на 200 г щура); тваринам 2-ї групи вводили калієву сіль 2,4-дихлорбензойної кислоти (0,075 г/кг) у вигляді 1,5 % зависі на 3 % крохмальному слизу; тварини 3-ї групи отримували комбінацію калієвої солі 2,4-дихлорбензойної кислоти (0,075 г/кг) і кофеїну (0,03 г/кг); тваринам 4-ї групи вводили комбінацію калієвої солі 2,4-дихлорбензойної кислоти (0,075 г/кг), кофеїну (0,03 г/кг) і карбамазепіну (0,3 г/кг); тварини 5-ї групи одержували препарат порівняння диклофенак-натрій у дозі 8 мг/кг в аналогічних умовах.

Протисудомну активність вивчали на моделі "прозеринових судом" у мишей. Її визначали за часом початку судом, їх кількістю та кількістю тварин, які вижили. Піддослідних мишей поділили на 5 груп по 6 у кожній. Тварини 1-ї групи (контрольної) одержували крохмальний слиз (0,2 мл на 20 г миші); тваринам 2-ї групи вводили калієву сіль 2,4-дихлорбензойної кислоти (0,036 г/кг) у вигляді 1,5 % зависі на 3 % крохмальному слизу; тварини 3-ї групи отримували комбінацію калієвої солі 2,4-дихлорбензойної кислоти (0,036 г/кг) і кофеїну (0,015 г/кг); тваринам 4-ї групи вводили комбінацію калієвої солі 2,4-дихлорбензойної кислоти (0,036 г/кг), кофеїну (0,015 г/кг) і карбамазепіну (0,145 г/кг); тварини 5-ї групи одержували препарат порівняння диклофенак-натрій у дозі 8,2 мг/кг в аналогічних умовах.

Піддослідних тварин утримували в умовах віварію згідно з правилами гуманного ставлення до лабораторних тварин. Усі втручання проводили з дотриманням біоетичних норм (Страсбург, 1986; Київ, 2007).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** При вивченні стану периферичної ланки болю відміче-

но, що кількість судом у щурів при введенні калієвої солі 2,4-дихлорбензойної кислоти (2-га група) становила  $6,11 \pm 0,34$ , при введенні комбінації солі з кофеїном (3-тя група) –  $4,67 \pm 0,57$ , мінімальна кількість судом спостерігалась у щурів 4-ї групи ( $3,1 \pm 1,2$ ), яким вводили трикомпонентну комбінацію калієвої солі 2,4-дихлорбензойної кислоти, кофеїну і карбамазепіну. Одержані дані значно менші, ніж при застосуванні препарату порівняння ( $9,0 \pm 2,8$ ) та в контрольній групі ( $14,8 \pm 1,7$ ), що свідчить про наявність протибольової дії периферичного характеру (рис. 1) як у трикомпонентній комбінації, так і в кожного її компонента. При цьому спостерігались потенціювання кофеїном протибольової активності калієвої солі 2,4-дихлорбензойної кислоти і потенціювання карбамазепіном протибольової дії солі та кофеїну.

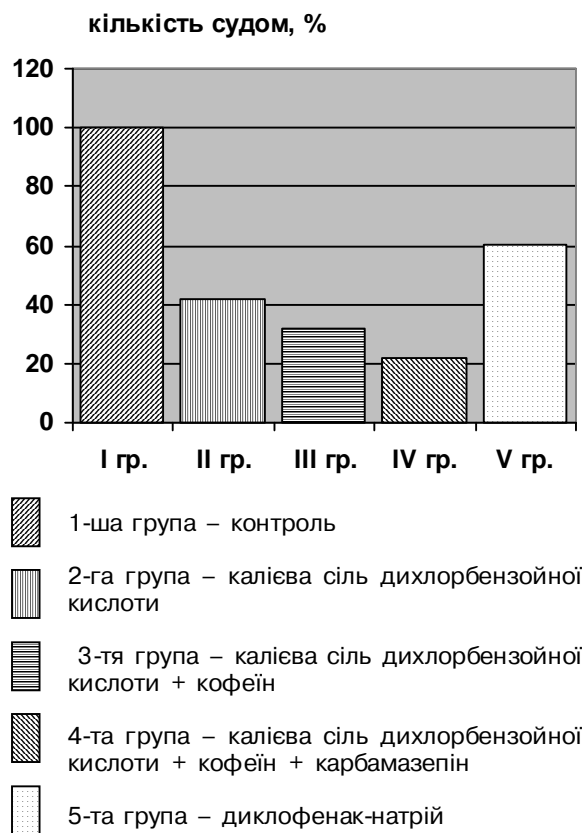


Рис. 1. Вивчення протибольових властивостей на моделі "оцтових судом".

При вивченні протисудомної дії 100 % загибель мишей відмічали в контрольній, 2-й і 3-й групах. Спостерігалася протисудомна дія у дослідженій комбінації карбамазепіну, кофеїну і калієвої солі 2,4-дихлорбензойної кислоти (4-та група): при її введенні 4 із 6 мишей вижили. Аналогічні дані мали місце і в групі порівняння. Час появи судом, кількість нападів судом у всіх групах були однаковими. Судо-



мна готовність під впливом трикомпонентної комбінації у мишей не знижувалася, витри-

валість зростала, про що свідчить 67 % виживаність тварин (табл. 1).

Таблиця 1 – Вивчення протисудомної дії на моделі “прозеринових судом”

Вивчені показники	1-ша група	2-га група	3-тя група	4-та група	5-та група
Час появи судом, хв	10	10	10	10	10
Кількість тварин із судомами	6	6	6	6	6
Кількість тварин, які вижили	0	0	0	4	4

**ВИСНОВКИ.** 1. Карбамазепін потенціює протибольову дію периферичного генезу калієвої солі 2,4-дихлорбензойної кислоти і кофеїну.

2. Введення карбамазепіну до складу комбінації калієвої солі 2,4-дихлорбензойної кис-

лоти і кофеїну сприяє протисудомній активності комбінації. Дослідна комбінація має протисудомну активність, збільшуючи стійкість мишей до прозеринових судом.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Базисная и клиническая фармакология / Под ред. Бертрама Г. Катцунга. – М. – С. Пб.: Бином – Невский Диалект, 1998. – 2. – С. 449-451.
2. Воробьева О.В. Оптимизация терапии симптоматической парциальной эпилепсии с использованием ретардной формы карбамазепина // Журн. неврологии и психиатрии. – 2001. – № 3. – С. 24-28.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: Новая волна, 2000. – 1. – С. 42-43.
4. Мосолов С.Н. Основы психофармакотерапии. – М., 1996. – 228 с.
5. Сосін І.К., Слюсарева Л.В., Марценковський І.А. Тимоізолептична терапія карбамазепіном пролонгованої дії ендогенних та органічних психічних розладів // Укр. мед. часопис. – 1999. – № 1 (9). – I/II. – С. 107-113.
6. Стефанов О.В. (ред.) Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації. – К., 2001. – 528 с.
7. Філоненко М.А., Сироватська Л.П. Застосування нових протиепілептичних засобів при неврологічних та психічних розладах // Ліки. – 2004. – № 5-6. – С. 32-36.
8. Carlton S.U., Zhou S., Coggesh R.E. Carbamazepin in der Neurologie // Neurosci. – 1999. – 93. – P. 713-722.
9. Corbo I. The role of anticonvulsant in preventive migraine therapy // J. Current Pain and Headache reports. – 2003. – 7, № 1. – P. 63-66.
10. Kanazi G.E., Johnson R.W., Dworkin R.H. Integrative use of old and new antiepileptic drugs. // Drugs. – 2000. – 59, № 5. – P. 1113-1126.
11. Sawynok J. GABAergic Mechanisms Are Involved in the Antihyperalgesic Effects of Carbamazepine and Oxcarbazepine in a Rat Model of Inflammatory Hyperalgesia // Pharmacol. Rev. – 2003. – 55, № 1. – P. 1-20.
12. Sorbera I.A., Leeson P.A., Castaner J. Valdecoxib and Parecoxib Sodium. Drugs of the Future. – 2001. – 26, № 8. – P. 745-749.
13. Straten M. V.; Carrasco D.; Lee P.; Tying S.K. A Review of Antiviral Therapy for Herpes Labialis. // J. Cutan. Med. Surgery. – 2001. – 5, № 5. – P. 409-416.
14. Zhou S., Komak S., Du J., Caretan S.M. The new anti-epileptic drugs: their current role in the management of epilepsy // Brain Res. – 2001. – 913. – P. 18-26.
15. Zullino D.F., Khazaal Y., Hattenschwiler J. et al. Antiepileptic pharmacotherapy with a slow release carbamazepine formulation // Drugs of Today. – 2004. – 40, № 7. – P. 603-619.

# ИЗУЧЕНИЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ ПРОТИВОБОЛЕВОГО И ПРОТИВОСУДОРОЖНОГО ДЕЙСТВИЙ НОВОЙ КОМБИНАЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ КАРБАМАЗЕПИН

**А.О. Сырвая**

ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

## Резюме

*Показано, что карбамазепин потенцирует противоболевое действие периферического генеза калиевой соли 2,4-дихлорбензойной кислоты и кофеина, а также способствует противосудорожной активности комбинации.*

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **карбамазепин, противоболевое действие, противосудорожная активность.**

# INFLUENCE OF ANALGETIC AND ANTICONVULSANT ACTIVITY OF NEW COMBINATION WITH CARBAMAZEPINUM IN EXPERIMENT

**H.O. Syrova**

KHARKIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

## Summary

*Carbamazepinum was shown to potentiate analgetic action of potassium salt of 2,4-dichlorbenzoic acid and coffeine and to promote the anticonvulsant activity of combination.*

KEY WORDS: **carbamazepinum, analgetic action, anticonvulsant activity.**

Отримано 23.12.2008 р.

Адреса для листування: Г.О. Сырвая, Харківський національний медичний університет, пр-т Леніна, 4, Харків, 61022, Україна.