

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ АЛЬФА-АДРЕНОМІМЕТИКА МЕЗАТОНУ З МОЛЕКУЛАМИ СИРОВАТКОВОГО АЛЬБУМІНУ ЗА ДАНИМИ ¹H ЯМР СПЕКТРОСКОПІЇ

І.С. Чекман¹, В.Н. Барвінченко², Т.Ю. Небесна¹, В.В. Туров²
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ¹
ІНСТИТУТ ХІМІЇ ПОВЕРХНІ НАН УКРАЇНИ ІМЕНІ О.О. ЧУЙКО²

У статті описано дослідження параметрів гідратації сироваткового альбуміну людини у водному середовищі та впливу на гідратацію альфа-адrenomіметика – мезатону, проведені за допомогою методу ¹H ЯМР спектроскопії в умовах пошарового виморожування рідкої фази. Показано, що доти, доки концентрація мезатону в 5 % розчині альбуміну не перевищить 0,1 % мас, він весь зв'язується з білковими молекулами. При цьому максимальна дегідратація альбуміну складає 600 мг/г, що може відбуватись лише при значній конформаційній перебудові білкових глобул. Зроблено висновок про те, що дегідратація є реакцією супрамолекулярної системи білка на зв'язування з нею молекул середньої молекулярної маси.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мезатон, альбумін, гідратація, ¹H ЯМР спектроскопія.

ВСТУП. Розподіл лікарських засобів в організмі людини залежить від концентрації незв'язаного препарату в циркулюючій плазмі крові. У свою чергу, ця концентрація визначається рівнем адсорбції лікарського засобу білками плазми. Сироватковий альбумін людини (САЛ) складає 60 % білкової фракції плазми крові, має властивість зв'язувати понад 70 % відомих на сьогодні лікарських засобів та більше 20 ендогенних лігандів [14]. Зв'язування препарату із САЛ покращує його розчинність у плазмі крові, зменшує токсичність, попереджує окиснення лікарського засобу та впливає на фармакокінетику, зокрема подовжує період напіввиведення. Однак висока афінність препарату до САЛ може бути причиною занадто повільного вивільнення молекул лікарського засобу в тканинах. Одночасне призначення декількох препаратів, що зв'язуються з однаковим центром в молекулі САЛ, або порушення комплексоутворюючих властивостей альбуміну за умов патологічного стану викликає непередбачувані зміни розподілу лікарських засобів між тканинами [9]. Тому дослідження молекулярних механізмів взаємодії лікарських засобів із САЛ є важливими для розуміння процесів абсорбції, розподілу, метаболізму та екскреції медикаментів [18].

Молекула САЛ має масу 65500 а.о., складається з трьох доменів (кожен з яких поділяється на 2 субдомени), містить 17 дисульфідних зв'язків. Найбільш детально, за даними рентгеноструктурного аналізу, охарактеризовано два центри зв'язування лікарських засобів із САЛ: центр I (варфариновий) знаходиться в субдомени IIА, центр II (бензодіазепіновий) – в субдомени IIIА [13]. Типовими лігандами центру I є бензилтіоурацил, карбеніцилін, кверцетин, спіронолактон, сульфадиметоксин, індометацин, дикарбонові кислоти та гетероциклічні негативно заряджені молекули з локалізацією заряду по центру молекули [11], а центру II – діазепам, ібупрофен, диклофенак, кетопрофен, клофібрат та ароматичні карбонові кислоти з локалізацією заряду на радикалах та гідрофобним центром [18]. У водному середовищі структурні елементи молекули САЛ розташовуються таким чином, щоб забезпечити мінімальне значення вільної енергії глобули. При цьому гідрофобні фрагменти, що належать до різних частин макромолекули, формують компактні гідрофобні ділянки, які значною мірою стабілізують структуру всієї білкової глобули [10, 15, 20, 25]. В результаті молекула альбуміну набуває спорідненості не лише до полярних, але і неполярних органічних молекул. Простір глобули, не зайнятий поліпептидними ланцюгами та амінокислотними групами, заповнений водою. Завдяки малим відстаням між структурними

© І.С. Чекман, В.Н. Барвінченко, Т.Ю. Небесна, В.В. Туров, 2010.

елементами білкової молекули практично вся вода всередині глобули зазнає збурюючого впливу на межі розподілу фаз і, відповідно, є зв'язаною. Залежно від гідрофільних властивостей суміжних ділянок білкової молекули вода може знаходитись в гідрофобному або гідрофільному середовищі, а гідратація відбувається за рахунок формування водневих зв'язків з протоактивними функціональними групами, вандерваальсових або гідрофобних взаємодій. Особливості гідрофобної та гідрофільної гідратації білків докладно розглянуто в роботах [19, 23, 24, 28]. ^1H ЯМР дослідження, проведені на гідратованих порошках ліофілізованого альбуміну в гідрофобному середовищі, дозволили роздільно реєструвати сигнали молекул води, які взаємодіють з молекулами альбуміну за механізмами гідрофобної та гідрофільної гідратації [5].

Метою даної роботи було дослідження параметрів гідратації сироваткового альбуміну людини у водному середовищі та впливу на гідратацію альфа-адреноміметика – мезатону, ступінь зв'язування якого з білками плазми крові складає 95 %.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В роботі використовували субстанцію мезатону (1-(мета-оксифеніл)-2-метиламіноетанолу гідрохлорид) виробництва ЗАТ “Фармацевтична фірма “Дарниця”, ліофілізований сироватковий альбумін виробництва ЗАТ “Біофарма” (Україна).

Як основний метод досліджень проводили ^1H ЯМР спектроскопію за умов пошарового виморожування рідкої фази [12, 26, 27]. За допомогою цього методу не лише визначали концентрацію зв'язаної води в широкому температурному інтервалі при $T < 0$ °C, але і розраховували термодинамічні характеристики шарів води, які піддаються збурюючому впливу з боку білкових молекул.

Спектри ЯМР отримували на ЯМР-спектрометрі високого розрізнення Varian Mercury з робочою частотою 400 МГц. Використовували 90° зонduючий імпульс тривалістю 2 мкс. Температура в датчиках спектрометрів регулювалась термоприставкою Bruker VT-1000 з точністю $\pm 1^\circ$. Інтенсивність сигналів визначали шляхом комп'ютерної обробки серії ^1H ЯМР сигналів незамерзаючої води, отриманих в автоматизованій процедурі фіксування температурних залежностей. Час термостатування зразка після встановлення температури становив 6 хв. При обробці спектрів використовували функціональну лінеаризацію нульової лінії. В результаті похибка інтегрування не пе-

ревищувала ± 3 %. Для попередження переохолодження води в досліджуваних об'єктах визначення концентрації незамерзаючої води проводили при нагріванні зразків, попередньо охолоджених до температури 210 К.

Для отримання характеристик шарів зв'язаної води вимірювали температурні залежності інтегральних інтенсивностей сигналу (I) незамерзаючої води, за якими розраховували залежність диференціальної енергії Гіббса (ΔG) від концентрації незамерзаючої води. Оскільки умовою замерзання води на міжфазній межі біооб'єкт/вода є рівність вільних енергій адсорбованої води та льоду, зниження температури замерзання адсорбованої води ($273 - T$) визначає зменшення вільної енергії води, викликане адсорбційними взаємодіями ($\Delta G = G_o - G$, де G_o – вільна енергія льоду при $T = 273$ K) [27]. Оскільки вільна енергія льоду зі зниженням температури змінюється за приблизно лінійним законом [2], то величина ΔG може бути розрахована за формулою:

$$\Delta G = 0,036(273 - T) \quad (1)$$

Площа під кривою $\Delta G(C_{uw})$ визначає величину міжфазної енергії біологічного об'єкта (γ_s) у водному середовищі:

$$\gamma_s = K \int_0^{C_{uw}^{max}} \Delta G dC_{uw} \quad (2)$$

У цьому рівнянні C_{uw}^{max} – товщина шару незамерзаючої води при $T \rightarrow 273$ K.

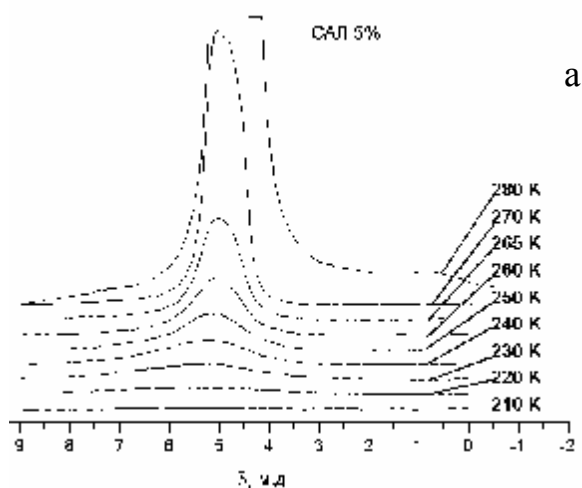
Якщо в розчині, крім молекул білка, присутні низькомолекулярні сполуки, свій внесок у величину C_{uw} може робити вода сконцентрованого в мікропорожнинах бінарного розчину, що міститься у вигляді включень в матриці льоду. При наявності такого розчину на залежностях $I(C_{uw})$ варто очікувати присутності ділянок лінійного зростання інтенсивності сигналу зі збільшенням C_{uw} [3]. Однак в багатьох випадках, при незначній концентрації, вся речовина домішки в процесі заморожування може бути сконцентрована в гідратних оболонках білкових молекул [4].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На рисунку 1 наведено спектри води в системі САЛ/вода, зняті в температурному інтервалі 210-280 K (а), й аналогічні спектри води за присутності мінімальної (0,1 % мас) і максимальної (1 % мас) концентрації мезатону. Зі зменшенням температури нижче 273 K основна частина води замерзає і не реєструється в спектрах ^1H ЯМР високого розрізнення через велику різницю поперечної релаксації води та льоду

[1]. При цьому інтенсивність сигналу води різко зменшується (рис. 1,а). Сигнал води, що спостерігається за таких умов, зумовлений тією частиною води, яка не замерзла через адсорбційні взаємодії з молекулами біополімера або розчинених у воді низькомолекулярних органічних (або неорганічних) речовин. Оскільки використовувався розчин ліофілізованого САЛ в дистильованій воді, органічною домішкою, яка могла викликати зниження температури замерзання води, міг бути лише мезатон, який не взаємодіє з молекулами САЛ. Вода спостерігається у вигляді одиничного сигналу з хімічним зсувом 5 м.д., відповідно до класифікації, наведеної в [26], може бути віднесена до сильноасоційованої. Саме цей тип зв'язаної води характерний для більшості гідратованих біополімерів [4, 26]. Зі зниженням температури інтенсивність сигналу зв'язаної води зменшується через її часткове замерзання. Кількість води, що не замерзла, при кожній фіксованій температурі визначається інтенсивністю адсорбційних взаємодій гідратного шару води з молекулами САЛ. Ширина сигналу води зі зниженням температури збільшується завдяки зменшенню її молекулярної рухливості [3].

Введення у розчин невеликої кількості (0,1 % мас) мезатону викликає зменшення інтенсивності сигналу незамерзаючої води, яке особливо помітне при $T = 270$ К (рис. 1,б). Ефект нівелюється при збільшенні концентрації мезатону до 1 % мас (рис. 1,в). При цьому в спектрах, окрім сигналу незамерзаючої води, реєструються сигнали протонів аліфатичних і ароматичних груп молекул мезатону. На рисунку 2 наведено залежності зміни концентрації незамерзаючої води від температури (а), побудовані на їх основі відповідно до співвідношення (1) залежності зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води (б), ізотерми концентраційних залежностей незамерзаючої води (в) та залежність міжфазної енергії (г) від концентрації мезатону у водних розчинах САЛ з концентрацією $C_{САЛ} = 5$ % мас.

На залежностях $\Delta G(C_{ув})$ легко розрізнити ділянки, зумовлені слабо- та сильнозв'язаною водою. Характеристики зв'язаної води, розраховані з даних рисунка 2 для всіх досліджених систем, наведено в таблиці 1. Відповідно до даних таблиці 1, концентрація сильнозв'язаної води складним чином залежить від концентрації мезатону. Разом із тим, зниження концентрації слабозв'язаної води реєструється лише в тому випадку, коли концентрація мезатону не перевищує 0,1 %, а потім суттєво



САЛ 5% + 0,1% Мезатон

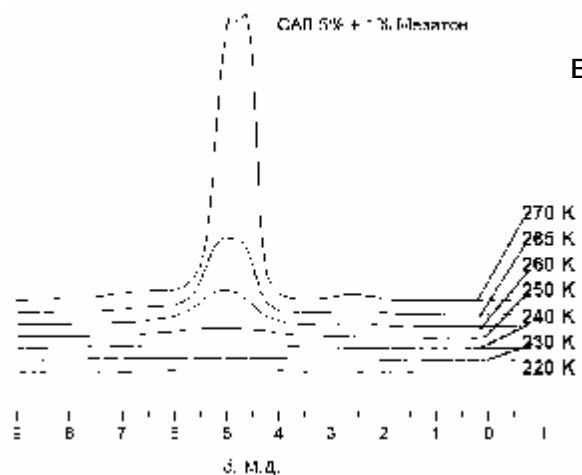
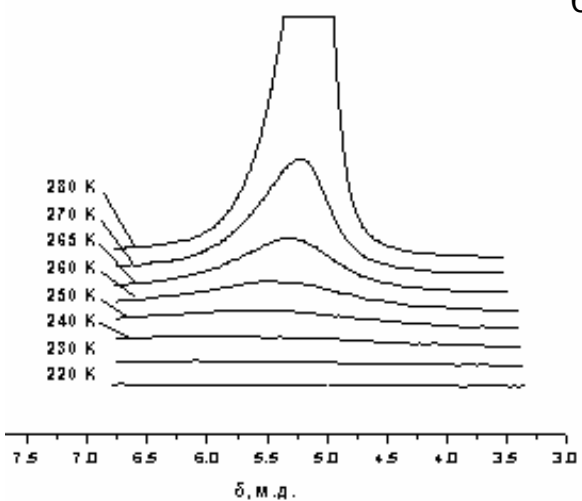


Рис. 1. Температурні залежності спектрів ^1H ЯМР води, адсорбованої молекулами САЛ (а) і САЛ в присутності мезатону (б, в).

збільшується. При цій концентрації на залежності $\gamma_s(C_{Mez})$ спостерігається мінімум, який відповідає зменшенню міжфазної енергії вдвічі відносно вихідного розчину САЛ.

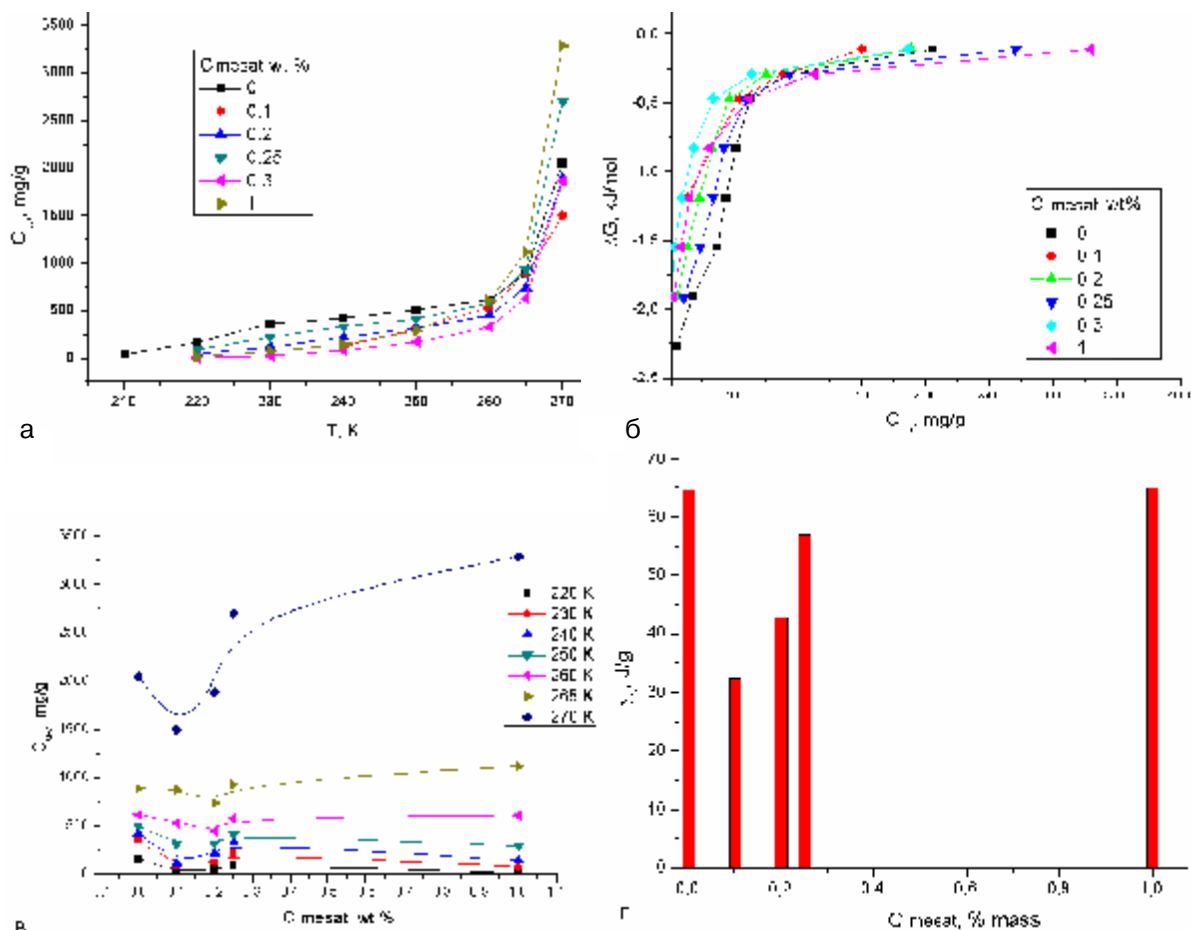


Рис. 2. Залежності зміни концентрації незамерзаючої води від температури (а), зміни вільної енергії Гіббса від концентрації незамерзаючої води (б), ізотерми концентраційних залежностей незамерзаючої води (в) і залежність міжфазної енергії від концентрації мезатону в водних розчинах САЛ (г) з концентрацією САЛ $C_{САЛ} = 5\%$ масс.

Таблиця 1. – Характеристики шарів зв'язаної води в системі альбумін-вода-мезатон.

| $C_{mesaton}$ wt % | C_{uw}^s mg/g | C_{uw}^w mg/g | ΔG^s kJ/mol | ΔG^w kJ/mol | γ_s J/g |
|-----------------------|--------------------|--------------------|------------------------|------------------------|-------------------|
| 0 | 720 | 1330 | 2,4 | 0,6 | 64,8 |
| 0,1 | 280 | 1170 | | 0,8 | 32,5 |
| 0,2 | 580 | 1310 | 2,2 | 0,6 | 43 |
| 0,25 | 650 | 2050 | 2,4 | 0,6 | 57 |
| 1 | 400 | 2890 | 2,0 | 0,6 | 65 |

Раніше аналогічні закономірності зміни параметрів гідратації спостерігались при дослідженні взаємодії альбуміну з простими цукрами [4, 7]. Вони зумовлені тим, що в колоїдній системі одночасно перебігають два процеси, які по-різному впливають на кількість незамерзаючої води. З одного боку, підвищення концентрації мезатону в розчині призводить до зниження температури його замерзання згідно із законом Рауля (в результаті зростає концентрація незамерзаючої води в розчині мезатон-вода), а з іншого – проникнення молекул мезатону в білкові глобули зумовлює часткову дегідратацію біополімерних ланцюгів (зменшується кількість води, зв'язаної з

білком). Перший процес відбувається переважно в температурному інтервалі $250 < T < 273\text{K}$ і, відповідно, повинен проявлятися зростанням концентрації слабозв'язаної води (див. табл. 1). На основі даних таблиці 1 та рисунка 2г можна вважати, що доти, доки концентрація мезатону не перевищить 0,1 % масс (0,02 г мезатону на 1 г САЛ), препарат весь зв'язується з білковими молекулами. При цьому максимальна дегідратація САЛ складає 600 мг/г. Відповідно, маса води, видалена з білкових глобул в результаті зв'язування з ними молекул мезатону, на два порядки більша маси самого мезатону. Це може відбуватись лише при значній конформаційній перебудові білко-

вих глобул, в яких, імовірно, за рахунок взаємодії з мезатоном, різко зменшується об'єм гідрофільних порожнин.

Можливість конформаційних змін молекули САЛ під дією зовнішніх факторів відмічалась багатьма авторами. Зокрема, в роботі [22] показано помітну зміну коефіцієнта дифузії молекул альбуміну під дією температури і домішок солей, що пояснювалось конформаційними змінами білкових молекул. В роботі [17] встановлено, що найбільш компактну конфігурацію (діаметр 59-62 Å) альбумінова глобула має при фізіологічному значенні рН 7,4. При зсуві рН в кислий (5,4) або лужний (8,0) бік розмір глобули однаково збільшується до 72-81 Å, але при підкисленні середовища на спектрі з'являється додатковий пік. Показано, що взаємодія альбуміну з пропранололом, клонідином та мезатоном викликає зміни спектра, аналогічні до тих, що спостерігались при зсуві в кислий бік, а йохімбін, хлорпромазин, ізопротеренол та атропін зумовлюють конформаційні зміни, характерні для лужного середовища. Конформаційна перебудова відбувається при взаємодії рофекоксибу та формонетину з гідрофобним карманом центру I САЛ [16, 21]. В роботі [8] показано, що взаємодія бичачого сироваткового альбуміну з фенілбутазоном (бутадіоном) змінює конформацію білка таким чином, що в молекулі альбуміну відкритими стають додаткові сайти зв'язування лікарського засобу, які не були дос-

тупні в нативній конформації. Подібні результати отримані й у роботі [9], де зазначено, що діазепам, зв'язуючись із САЛ (II центр зв'язування), значно підвищує афінність теноксикаму до альбуміну (I центр зв'язування), що свідчить про індуковану лікарськими засобами алостеричну перебудову молекул білка. При дослідженні зв'язування САЛ з нанокремнеземом за присутності простих цукрів було встановлено значне зменшення величини адсорбції молекул білка, навантажених цукрозою, що також свідчить про їх конформаційну перебудову [6]. Імовірно, дегідратація, приклад якої розглянуто в даній роботі, є реакцією супрамолекулярної системи білка на зв'язування з нею молекул середньої молекулярної маси. Можливо, в процесах метаболізму ця властивість використовується організмом для розпізнавання навантажених та вільних молекул альбуміну.

ВИСНОВКИ. 1. Мезатон повністю зв'язується з білковими молекулами доти, доки його концентрація не перевищить 0,1 % мас.

2. Максимальна дегідратація САЛ складає 600 мг/г і супроводжується значною конформаційною перебудовою білкових глобул, в яких у результаті взаємодії з мезатоном різко зменшується об'єм гідрофільних порожнин.

3. Дегідратація є реакцією супрамолекулярної системи білка на зв'язування з нею молекул середньої молекулярної маси.

ЛІТЕРАТУРА

1. Манк В.В., Лебовка Н.И. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса в гетерогенных системах. – К.: Наукова думка, 1988. – 202 с.
2. Термодинамические свойства индивидуальных веществ / Под ред. В.П. Глушкова – М.: Наука, 1978.
3. Туров В.В., Бакай Э.А., Туров А.В., Корнилов М.Ю. Изучение связывания спиртов с сывороточным альбумином по спектрам ПМР замороженных водных растворов // Биофизика. – 1990. – **35**. – С. 829-833.
4. Туров В.В., Галаган Н.П., Ругаль А.А. Влияние сахаров на гидратированность сывороточного альбумина при низких температурах // Биофизика. – 2007. – **52**, № 5. – С. 780-784.
5. Туров В.В., Гунько В.М., Барвинченко В.Н. и др. Влияние хлороформа на состояние воды, адсорбированной сывороточным альбумином // Биополимеры и клетина. – 2006. – **22**, № 5. – С. 375-383.
6. Туров В.В., Ругаль А.О., Гунько В.М. и др. Супрамолекулярные структуры с участием белков крови и частиц высокодисперсного кремнезема // Хімія, фізика та технологія поверхні. – 2007. – **2**. – С. 357-391.
7. Чагер С.И. Транспортная функция сывороточного альбумина. – Бухарест: Изд-во Академии наук СРР, 1975. – 184 с.

8. Blanchard J., Tozer T.N., Sorby D.L., Dallas L. Drug-albumin interactions using spin labeling // J. of Pharmaceutical Sci. – 2006. – **62**, № 9. – P. 1545-1546.
9. Bree F., Urine S., Nguyen P. et al. Human serum albumin conformational changes as induced by tenoxicam and modified by simultaneous diazepam binding // J. Pharmacy and Pharmacology. – 1993. – **45**, № 12. – P. 1050-1053.
10. Fernandez A., Kardosb J., Gotob Y. Protein folding: could hydrophobic collapse be coupled with hydrogen-bond formation? // FEBS Letters. – 2003. – **536**. – P. 187-192.
11. Ghuman J., Zunszain P.A., Petitpas I. et al. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin // J. Mol. Biol. – 2005. – **353**, № 1. – P. 38-52.
12. Gun'ko V.M., Turov V.V., Bogatyrev V.M. et al. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces // Adv. Colloid Interface Sci. – 2005. – **118**. – P. 125-172.
13. Kragh-Hansen U., Chuang V.T.G., Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2002. – **25**, № 6. – P. 695-704.
14. Kratochwil N.A., Huber W., Muller F. et al. Predicting plasma protein binding of drugs: a new

approach // Biochem. Pharmacol. – 2002. – **69**, № 4. – P. 1355-1374.

15. Li W.S., Linb S.Y., Lib M.J. et al. Temperature effect on the structural stability, similarity, and reversibility of human serum albumin in different states // Biophysical Chemistry. – 2005. – **114**. – P. 205-212.

16. Lia Y., Hea W.Y., Donga Y.M. et al. Human serum albumin interaction with formononetin studied using fluorescence anisotropy, FT-IR spectroscopy, and molecular modeling methods // Bioorg. Med. Chem. – 2006. – **14**, № 1. – P. 1431-1436.

17. Luik A.I., Naboka Yu.N., Mogilevich S.E. et al. Study of human serum albumin structure by dynamic light scattering: two types of reactions under different pH and interaction with physiologically active compounds // Spectrochimica acta part A: Molecular and biomolecular spectroscopy. – 1998. – **54**, № 10. – P. 1503-1507.

18. Mandula H., Parepally J.M.R., Feng R., Smith Q.R. Role of site-specific binding of plasma albumin in drug availability to brain // J. Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2006. – **317**, № 2. – P. 667-675.

19. Pouliquen D., Gallois Y. Physicochemical properties of structured water in human albumin and gammaglobulin solutions // Biochemie. – 2001. – **83**. – P. 891-898.

20. Prat L.R., Pohorille A. Hydrophobic effects and modeling of biophysical aqueous solution interfaces // Chem. Rev. – 2002. – **102**. – P. 2671-2692.

21. Qi Z., Zhou B., Qi X. et al. Interaction of rofecoxib with human serum albumin: Determination of binding constants and the binding site by spectroscopic methods // J. Photochemistry and photobiology A: Chemistry. – 2008. – **193**, № 2-3. – P. 81-88.

22. Reyes L., Bert J., Fornazero J. et al. Influence of conformational changes on diffusion properties of bovine serum albumin: a holographic interferometry study // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2002. – **25**. – P. 99-108.

23. Robinson G.W., Cho C.H. Role of hydration water in protein unfolding // Biophys. J. – 1999. – **77**. – P. 3311-3318.

24. Schade P., Klein H., Egry I. et al. Hydrophobic volume effects in Albumin solutions // J. Colloid Interface Sci. – 2001. – **234**. – P. 445-447.

25. Tiwms J.K. Moisture content in proteins: its effects and measurement // J. Chromatography A. – 1995. – **705**. – P. 115-127.

26. Turov V.V., Gun'ko V.M., Bogatyrev V.M. Structured Water in Partially Dehydrated Yeast Cells and at Partially Hydrophobized Fumed Silica Surface // J. Colloid Interface Sci. – 2005. – **283**, № 2. – P. 329-343.

27. Turov V.V., Lebeda R. Application of ¹H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // Adv. Colloid Interface Sci. – 1999. – **79**. – P. 173-211.

28. Vogler E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces // Adv. in Colloid and Interface Sci. – 1998. – **74**. – P. 61-117.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АЛЬФА-АДРЕНОМИМЕТИКА МЕЗАТОНА С МОЛЕКУЛАМИ СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА ПО ДАННЫМ ¹H ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

И.С. Чекман¹, В.Н. Барвинченко², Т.Ю. Небесная¹, В.В. Туров²
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ А.А. БОГОМОЛЬЦА¹
ИНСТИТУТ ХИМИИ ПОВЕРХНОСТИ НАН УКРАИНЫ ИМЕНИ А.А. ЧУЙКО²

Резюме

В статье описаны исследования параметров гидратации сывороточного альбумина человека в водной среде и влияния на гидратацию альфа-адреномиметика – мезатона, проведенные методом ¹H ЯМР спектроскопии в условиях послойного вымораживания жидкой фазы. Показано, что до тех пор, пока концентрация мезатона в 5 % растворе альбумина не превысит 0,1 % масс, весь он связывается с белковыми молекулами. При этом максимальная дегидратация альбумина составляет 600 мг/г, что может происходить только при значительной конформационной перестройке белковых глобул. Сделан вывод о том, что дегидратация является реакцией супрамолекулярной системы белка на связывание с ней молекул средней молекулярной массы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мезатон, альбумин, гидратация, ¹H ЯМР спектроскопия.

¹H NMR SPECTROSCOPY STUDIES OF ALPHA-ADRENOMIMETIC MESATON INTERACTION WITH HUMAN SERUM ALBUMIN

I.S. Chekman¹, V.N. Barvinchenko², T.Yu. Nebesna¹, V.V. Turov²
NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY O.O. BOHOMOLET'S¹
INSTITUTE FOR SURFACE CHEMISTRY BY O.O. CHUYKO OF NAS OF UKRAINE²

Summary

In the article are described studies of human serum albumin hydration parameters in aqueous media and alpha-adrenomimetic mesaton influence on hydration by ¹H NMR spectroscopy under conditions of a liquid phase freezing. It was shown, that while concentration of mesaton is less than 0,1 % mass, it is completely binding with protein molecules. Maximum dehydration of albumin is 600 mg/g, that is possible only in case of significant conformational changes in protein globules. The authors made the conclusion that dehydration is a reaction of supramolecular protein system on binding with medium molecular weight substances.

KEY WORDS: mesaton, albumin, hydration, ¹H NMR spectroscopy.

Отримано 19.02.2009 р.

Адреса для листування: Т.Ю. Небесна, вул. Симиренка, 20А, кв. 44, Київ, 03134, Україна.

МІОТРОПНІ СПАЗМОЛІТИКИ СЕРЕД ПОХІДНИХ АДАМАНТАНУ

Т.П. Притула, О.В. Пупишева, М.А. Мохорт
ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ, КИЇВ

Уперше вивчали міотропні спазмолітичні властивості похідних адамантилвмісних солей 1-алкокси-3-діалкіламіно-2-пропанолу [КОР] в експериментах in vitro на ізольованих судинах. Адамантилвмісні похідні 1-алкокси-3-діалкіламіно-2-пропанолу призводять до релаксації ізольованих судин, ступінь вираження яких спостерігається до 10^8 М. Найбільш активні сполуки містять адамантилетильний (КОР-2, $EC_{50}=6,3 \cdot 10^{-9}$ М) та адамантильний (КОР-10, $EC_{50}=9,6 \cdot 10^{-7}$ М) радикали. Це малотоксичні сполуки, LD_{50} яких перебуває в межах 564-890 мг/кг.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: похідні адамантану, судини, спазмолітики, аорта щурів, in vitro.

ВСТУП. Наслідками недостатнього кровопостачання, пов'язаного з порушенням функції ендотелію кровеносних судин [17], є захворювання серцево-судинної системи, такі, як ішемічна хвороба серця (стабільна, нестабільна стенокардія, гостра та хронічна коронарна недостатність, деякі види аритмій), порушення мозкового кровообігу, при яких гіпертонічна хвороба [5] посідає провідне місце серед факторів високого кардіоваскулярного ризику.

Згідно з даними Центру медичної статистики (2007), у 2006 р. в Україні зареєстровано 11 млн хворих на артеріальну гіпертензію (АГ), а порівняно з 2005 р. цей показник збільшився на 0,3 млн чоловік. Слід зауважити, що АГ – проблема національного масштабу, яка, враховуючи старіння популяції, тільки поглиблюється.

Відповідно до Європейських та Російських рекомендацій (2003-2004), артеріальну гіпертензію лікують препаратами, що належать до різних класів. Це, зокрема, блокатори рецепторів ангіотензину II, діуретики, β -адреноблокатори, інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) та антагоністи кальцію (АК). Останні в медичній літературі мають назву “блокатори повільних кальцієвих каналів” і традиційно застосовуються як серцево-судинні засоби завдяки їх антиангінальному, антигіпертензивному, інотропному, антиаритмічному ефектам, співвідношенню антиангінального та гемодинамічного впливів, фармакокінетичним властивостям, здатності взаємодіяти з багатьма типами каналів, що

зумовлено гетерогенністю їх структури [7, 9]. Цей клас лікарських засобів містить препарати трьох різних за хімічною будовою груп (похідні фенілалкіламіну, бензодіазепіну та дигідропіридину), що дозволяє використовувати їх при різноманітних клінічних станах. Лікарі госпітального та догоспітального етапів віддають перевагу похідним дигідропіридину другого (IIa) покоління (ніфедипін ретард, ніфедикард XL тощо).

Відносно новою спазмолітичною групою з артеріолярними та венулярними властивостями прийнято вважати активатори калієвих каналів (АКК) [15, 16].

В останні роки розширена патогенетична “палітра” фармакологічної активності як представників БКК, так і АКК. Вони є терапевтично придатними для лікування сечокам'яної хвороби, спроможні знижувати тонус м'язів гладеньких клітин, викликаний широким спектром вазо- та бронхоконстрикторів. Незважаючи на різний механізм дії [11, 13], мають однакову точку свого кінцевого впливу – гладеньком'язові клітини.

Безконтрольне приймання існуючих на даний час антигіпертензивних лікарських засобів призводить до тяжких наслідків. За даними фармакологічного нагляду, в період 2002-2007 рр. у різних областях України на частку антигіпертензивних засобів припало 15,8-25 % серед зареєстрованих випадків побічної дії всіх препаратів, на частку антагоністів кальцію – 17,9 %, які розцінено як серйозні.

Фармацевтичні препарати з класів БКК та АКК не можуть повною мірою задовольнити вимоги клініцистів, зокрема як щодо нормалізації діяльності серцево-судинної системи, так

і стосовно їх нешкідливості, тому зрозумілим і безперечним стає пошук препаратів серед нових класів хімічних речовин.

Певну увагу привертають хімічні речовини, які мають у своїй структурі адамантільний фрагмент. Похідним адамантану притаманні анальгетична, протизапальна, ноотропна, імуномодулююча, транквілізуюча, актопротекторна та утеростимулювальна активності [6, 8, 12]. Багато представників 1-(2-хлор-3,4-диметоксибензиліден) адамантану, N-1-адамантилмалейміду та адамантилпіримідинів чинять антигрибкову дію [3]. Антибактеріальну активність виявлено в адамантанфталімідів, антимікробну – в N-гераніл-N'-(2-адамантил) етан-1,2-діаміну [2]. Наявність протимікробних властивостей у похідних аміноадамантану дає можливість проводити розробку антимікробних засобів для місцевого застосування, які досі відсутні у світовій медичній практиці [2, 3].

З огляду на широкий фармакологічний спектр дії вищезазначених похідних адамантану [2, 3, 6, 8, 14], нас зацікавили пропозиції пошуку нових складових їх фармакологічного ефекту і можливість дослідити їх як міотропні спазмолітичні засоби. На підставі специфічності усунення спазму отримані експериментальні результати дозволять віднести останні до класу БКК або АКК.

Надані для дослідження сполуки синтезовано в Інституті органічної хімії НАН України під керівництвом акад. М.О. Лозинського.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Скорочувальну активність судин гладеньких м'язів вивчали на сегментах грудної аорти щурів обох статей лінії Вістар. Тварин забивали шляхом цервікальної дислокації, яка підтверджена як гуманна декларацією III Національного конгресу з біоетики. Для експерименту брали частину аорти з більшою щільністю рецепторів, розташовану ближче до розгалуження. Сегменти судин поміщали в робочу камеру зі стандартним буферним розчином Кребса-Хенслея (рН 7,4), температура якого була постійною на рівні 37 °С.

Застосовували розчин Кребса такого складу (в мМоль/л): NaCl (133,0); KCl (4,7); MgCl₂ (1,05); CaCl₂ (2,5); NaH₂PO₄ (1,38); NaHCO₃ (16,3); глюкоза (7,82). Вихідне тонічне скорочення ізольованих фрагментів судин викликали гіперкалієвим (60 мМ) розчином та розчином фенілефрину в концентрації 10⁻⁶ М. Гіперкалієва деполяризація гладеньком'язових клітин судин, яка виникає в результаті підвищення концентрації іонів калію в пито-

мому розчині, що омиває ізольовані смужки судин, є найбільш простою, доступною та інформативною моделлю. Вибір щодо фенілефрину, який є синтетичним замінником біогенного аміну – епінефрину, зумовлений його здатністю взаємодіяти з α-адренорецепторами, що можна інтерпретувати як стимуляцію симпатичних нервів, і призводити до спазму судин.

Запис скорочень здійснювали на самописці model 202, Cole-Parmer Instrument Company, USA.

Спазмолітичну ефективність нових синтезованих сполук визначали, порівняно з класичним спазмолітиком – дротаверином, за величиною спазмолітичного ефекту.

Спектр фармакологічного застосування будь-якого нового ксенобіотика розширюється за допомогою додаткових знань, які одержують при встановленні його нешкідливості. В наших дослідженнях показник гострої токсичності – ЛД₅₀ (середньолетальна доза) дозволяв оцінити сполуку саме з позиції нешкідливості [15].

Для оцінки негативного впливу сполук на організм тварин (за показником ЛД₅₀) ми застосовували метод найменших квадратів [10]. До експерименту залучали білих безпородних мишей лінії Вістар обох статей масою 18-22 г. Під час спостереження складали клінічну картину ознак отруєння синтезованими речовинами, які вводили внутрішньошлунково через металевий зонд однократно в геометрично наростаючих дозах. Як розчинник використовували дистильовану воду, не розчинні у воді сполуки, які спочатку емульгували у твіні, а потім з'єднували з 2 % крохмальним розчином. Спостереження протягом 14 діб проводили від моменту введення речовини до періоду відновлення поведінкових реакцій або до загибелі тварин, яких тестували.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Здатність призупиняти або повністю знімати спазм гладеньком'язових структур, індукований констрикторами, ми вивчали в досліді *in vitro* на ізольованих фрагментах судин (аорта щурів) у порівняльному аспекті з класичним спазмолітиком – дротаверином.

Досліджували адамантанаміні аміноспирти, що містили у своїй структурі різні за об'ємом замісники.

Сполуки КОР 9-10 мали замісник у вигляді адамантільного радикала, який при поступовому навантаженні СН₂-групами утворював адамантанметильний (сполуки КОР 6-8) та адамантанетильний (сполуки КОР 1-5) ради-

кали. Останні переважно мали однонаправлену та рівноеквівалентну з препаратом порівняння спазмолітичну активність на тлі гіперкалієвого розчину. Однак більшість сполук на тлі зазначених констрикторів підтвердила циклічний, притаманний БКК, характер впливу на гладеньком'язові структури, який проявлявся спочатку розслабленням судин, а потім різким їх скороченням (табл. 1).

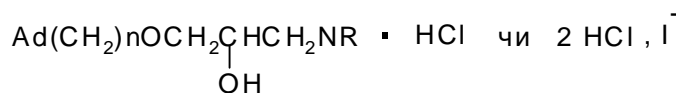
Адамантанметильні похідні (КОР-6-7) при констрикції судин фенілефрином у концентрації 10^{-6} М виявилися неспроможними конкурувати з активністю препарату порівняння, саме з цієї причини було недоцільним встановлювати для них середньоефективні концентрації. Надбанням адамантилетиловмісних похідних стала одна з перспективних сполук (КОР-10, $EC_{50} = -\log 6,02$), яка м'яко, без циклі-

чних спастичних і дилататорних коливань ізольованої аорти, знімала спазм, індукований згаданим констриктором.

Більшість замісників досліджуваних сполук перебувала в третьому положенні, у зв'язку з чим можна зробити припущення, що розміщення радикала суттєво не впливає на специфічну активність вивчених похідних адамантану.

Відсутність циклічних впливів, притаманних блокаторам кальцієвих каналів першого покоління, внаслідок чого їх не застосовують при інфаркті міокарда, є позитивним фактом для нових найбільш перспективних синтезованих сполук. Отримані результати щодо їх спазмолітичної активності дозволили виділити серед похідних 1-алкокси-3-діалкіламіно-2-пропанолу найбільш перспективні, які містили адамантилетиловмісний (КОР-2) та адамантильний

Таблиця 1 – Значення ефективних концентрацій нових похідних адамантану на тлі констрикції судин



| Речовина | Радикал | Показник ефективних концентрацій, -log | | | | | |
|------------|--|--|------------------|------------------|--------------------|------------------|------------------|
| | | гіперкалієвий розчин, 60 мМ/л | | | фенілефрин 1 мкМ/л | | |
| | | EC ₁₆ | EC ₃₂ | EC ₅₀ | EC ₁₆ | EC ₃₂ | EC ₅₀ |
| Дротаверин | | - 5,48 | - 5,21 | - 4,86 | - 6,41 | - 6,17 | - 5,86 |
| КОР-1 | морфолін | - 4,89 | - 4,60 | - 4,33 | - 7,46 | * | * |
| КОР-2 | діетиламін | - 5,38 | - 5,01 | - 4,82 | - 10,1 | - 9,09 | - 8,20 |
| КОР-3 | N-метилморфоліній йодид | | | | - 8,35 | - 7,28 | - 5,80 |
| КОР-4 | N-метилдіетиламіно йодид | - 5,25 | - 4,16 | - 3,20 | - 8,18 | - 6,48 | * |
| КОР-5 | 4-метоксифенілпіперазин | - 5,83 | - 5,033 | - 4,48 | - 8,93 | - 7,38 | * |
| КОР-6 | морфолін-1-адамантилметил | - 4,85 | - 4,16 | - 3,46 | - 7,36 | * | * |
| КОР-7 | 3-Cl-фенілпіперазин-1-адамантилметил | - 3,98 | - 1,96 | - 0,25 | - 6,85 | - 5,71 | * |
| КОР-8 | 3-CF ₃ -фенілпіперазин-1-адамантилметил | - 3,33 | - 0,80 | 2,33 | - 4,96 | - 4,20 | - 3,33 |
| КОР-9 | 3-Cl-фенілпіперазин-1-адамантил | | | | - 6,60 | - 4,996 | - 2,03 |
| КОР-10 | 3-CF ₃ -фенілпіперазин-1-адамантил | - 4,85 | - 4,16 | - 3,46 | - 6,79 | - 6,37 | - 6,02 |

Примітка. * – спазм судин під впливом подальших концентрацій.

(КОР-10) радикали. Достатньо висока активність (EC_{50}) перспективних синтезованих дериватів адамантану стала підставою для визначення їх нешкідливості порівняно з препаратом-прототипом – дротаверином.

Доклінічна оцінка небезпечності будь-якої нової сполуки передбачає токсикологічні дослідження, як правило, багаторівневі, які базуються на результатах гострих та хронічних експериментів і проводяться на різних видах тварин. Первинні результати є розрахунковою базою для визначення меж токсичності, відтворення ознак та динаміки отруєння ре-

човинами тощо. Методично ці питання досить аргументовано викладено, зокрема в працях російських вчених [1, 4].

При вивченні рівня безпечності найбільш активних сполук відмічали дозозалежний характер початку, піку та віддаленого впливу речовин на комплекси ефектів. Визначали "особливі дози" (дози препарату, що викликали різку зміну психоветотропної активності тварин). Аналізуючи дозозалежні спектри змін функціонально-поведінкової активності тварин під дією похідних 1-алкокси-3-діалкіламіно-2-пропанолу в дозах, більших 630 мг/кг,

ми виявили перевагу таких ефектів: наростання рухливої активності мишей після введення речовин у шлунок починалось з 20-40 хв із поступовим подальшим її пригніченням, дихання ставало нерівномірним, у тварин розвивались судоми, які призводили до їх загибелі. При макроскопічному патоморфологічному обстеженні верхівка серцевого м'яза та коронарні судини були кровонаповненими, а легені – спалими.

Середньолетальні значення найбільш перспективних синтезованих сполук КОР-2 (LD_{50} , 564 мг/кг) та КОР-10 (LD_{50} , 890 мг/кг) дають можливість віднести адамантилвмісні похідні 1-алкокси-3-діалкіламіно-2-пропанолу до класу малотоксичних сполук.

Таким чином, результати проведених досліджень свідчать про те, що похідні адамантанвмісних аміноспиртів з адамантилетилмовим радикалом (КОР-2) та адамантильним замісником (КОР-10) в молекулі розслабляють смужки судин, індуковані як гіперкалієвою деполяризацією мембрани, так і розчином фенілефрину (10^6 М), але ступінь спазмолітичної актив-

ності сполук значно виразніший на тлі останньої констрикції (EC_{50} , КОР-2= $6,3 \cdot 10^{-9}$ М, EC_{50} , КОР-10= $9,6 \cdot 10^{-7}$ М). Зокрема, КОР-2 на два порядки активніше препарату порівняння усуває спастичний стан судин (аорта) при фенілефриновій констрикції, що може бути підставою для створення нового спазмолітичного засобу та впровадження його в охорону здоров'я.

ВИСНОВКИ. Експериментальний матеріал з вивчення нових синтезованих найбільш активних міотропних спазмолітиків з класу адамантанвмісних аміноспиртів визначив доцільність подальшого їх дослідження не тільки при патологічних станах серцево-судинної системи та супутніх з ними порушеннях, але й для встановлення окремих механізмів їх впливу на цілісний організм тварин.

Як свідчать отримані дані з визначення середньолетальних доз найбільш активних похідних адамантану, сполуки КОР-2 та КОР-10 належать до класу малотоксичних речовин, LD_{50} яких дорівнює, відповідно, 564 і 890 мг/кг.

ЛІТЕРАТУРА

1. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Ленинград: Медгиз, 1963. – 216 с.
2. Вринчану Н.О., Максимов Ю.М. Антимікробна активність нового похідного аміноадамантану // Медицина сьогодні і завтра. – 2004. – № 4. – С. 48-50.
3. Вринчану Н.А., Покас Е.В., Максимов Ю.Н. Антифунгальное действие 4-(адамантил-1)-1-(1-аминобутил) бензола в отношении клинических штаммов грибов // Журн. инфекц. патологии. – 2003. – **10**, № 4. – С. 33-34.
4. Голиков С.А., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия. – Ленинград: Медицина, 1986. – 280 с.
5. Коваль Е.А. От профилактики ишемической болезни сердца к профилактике сердечно-сосудистых заболеваний: новый взгляд на проблему медицины сегодня и завтра // Серце і судини. – 2004. – № 1 (5). – С. 12-16.
6. Короткий Ю.В. Синтез і утеростимулююча активність похідних 1-алкокси-3-діалкіламіно-2-пропанолу: Автореф. дис. ... канд. фармац. наук. – Харків, 2005. – 20 с.
7. Красницкий В.Б. Блокаторы медленных кальциевых каналов и их место в лечении артериальной гипертонии // Рус. мед. журн. – 2007. – **15**, № 2. – С. 79-85.

8. Пат. 75943, Україна. Застосування 1-адамантилетилокси-3-діалкіламіно-2-пропанолів як актопротекторів / Степанюк Г.І., Короткий Ю.В., Драчук О.П. та ін. – Опубл. 15.06.2006. Бюл. № 6. – 3.89 с.
9. Постникова С.А. Дигидропиридиновые блокаторы кальциевых каналов в лечении артериальной гипертонии // Рус. мед. журн. – 2007. – **15**, № 6. – С. 556-560.
10. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакол. и токсикоз. – 1978. – **41**, № 4. – С. 497-502.
11. Cai B., Hao Q., Greenberg S.S. et al. Differential effects of pinacidil and cromakalim on vascular relaxation and sympathetic neurotransmission // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1994. – **72**, № 7. – P. 801-810.
12. Calis U., Yarim M., Koksali M., Ozalp M. Synthesis and antimicrobial activity evaluation of some new adamantane derivatives // Arzneimittelforschung. – 2002. – **52**, № 10. – P. 778-781.
13. Maggi C.A., Manzini S., Parlani M. et al. The effect of nifedipine on spontaneous, drug-induced and reflexly-activated contractions of the rat urinary bladder: evidence for the participation of an intracellular calcium store to micturition contraction // Gen. Pharmacol. – 1988. – **19**, № 1. – P. 73-81.
14. Olson S., Aster S., Brown K. Adamantyl triazoles as selective inhibitors of 11beta-hydroxysteroid

dehydrogenase type 1 // Bioorganic and medicinal chemistry letters. – 2005. – **15**, № 19. – P. 4359-4362.

15. Sekiya M., Sato M., Funada J. et al. Effects of the long-term administration of nicorandil on vascular endothelial function and the progression of arteriosclerosis // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 2005. – **46**, № 1. – P. 63-67.

16. Sica D.A. Minoxidil: an underused vasodilator for resistant or severe hypertension // J. Clin. Hypertens. (Greenwich). – 2004. – **6**, № 5. – P. 283-287.

17. Willerson J., Kereiakes D. Endothelial dysfunction // Circulation. – 2003. – **108**, № 17. – P. 2060-2061.

МИОТРОПНЫЕ СПАЗМОЛИТИКИ СРЕДИ ПРОИЗВОДНЫХ АДАМАНТАНА

Т.П. Притула, Е.В. Пупишева, Н.А. Мохорт
ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ, КИЕВ

Резюме

Впервые изучали производные адамантилсодержащих солей 1-алкокси-3-диалкиламино-2-пропанола [КОР] на наличие у них миотропных спазмолитических свойств в опытах *in vitro* на изолированных сосудах. Адамантилсодержащие производные 1-алкокси-3-диалкиламино-2-пропанола ведут к релаксации изолированных сосудов, степень выраженности которых наблюдается до 10^8 М. Наиболее активные соединения содержат адамантилэтильный (КОР-2, $EC_{50}=6,3 \cdot 10^9$ М) и адамантильный (КОР-10, $EC_{50}=9,6 \cdot 10^7$ М) радикалы. Это малотоксичные соединения, LD_{50} которых находится в пределах 564-890 мг/кг.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: производные адамантана, сосуды, спазмолитики, аорта крыс, *in vitro*.

MYOTROPIC SPASMOLITICS AMONG THE ADAMANTAN DERIVATIVES

Т.П. Pritula, О.В. Pupyshva, М.А. Mokhort
INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF AMS OF UKRAINE, KYIV

Summary

In the *in vitro* experiences on the isolated vessels the 1-alkoxy-3-dialkylamino-2-propanol adamantyl - containing salts derivatives [KOP] were studied as myotropic spasmolitics. The 1-alkoxy-3-dialkylamino-2-propanol adamantyl - containing derivatives result in relaxation of the isolated vessels, the degree of the observed relaxation is up to 10^8 M. The most active compounds contain adamantyl ethyl (KOP -2, $ES_{50} = 6,3 \cdot 10^9$ M) and adamantyl (KOP -10, $EC_{50}=9,6 \cdot 10^7$ M) radicals. These are low toxic compounds, at LD_{50} within the limits of 564-890 mg/kg.

KEY WORDS: adamantan derivatives, vessels, spasmolitics, rat aorta, *in vitro*.

Отримано 10.06.2009 р.

Адреса для листування: Т.П. Притула, Інститут фармакології та токсикології АМН України, вул. Е. Потьє, 14, Київ, 03680, Україна.

ВПЛИВ МІГРЕПІНУ В РІЗНИХ ДОЗАХ НА ПЕРИФЕРИЧНИЙ КОМПОНЕНТ НОЦИЦЕПТИВНОЇ РЕАКЦІЇ

Г.О. Сирова

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Представлено матеріали з вивчення протибольової активності нового вітчизняного протизапального лікарського засобу під умовною назвою "Мігрепін" в різних дозах. Протибольові властивості досліджували за впливом на периферичний компонент больової реакції. Стан периферичної ланки болю вивчали на моделі "ацетилхолінових судом" у мишей і на моделі "оцтових судом" у щурів. Мігрепін (внутрішньошлунково одноразово) проявляє протибольову дію периферичного генезу в дозах 7; 17,5; 28 мг/кг у мишей, аналогічну Д-На (7 мг/кг), і в дозах 0,1; 1; 5; 12,5; 20 мг/кг у щурів, значно більшу, ніж Д-На (5 мг/кг).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мігрепін, протибольова активність.

ВСТУП. Біль – складний за структурою патологічний стан, який супроводжує різноманітні захворювання, тому питання фармакологічної його корекції важливе й актуальне. Фармакокорекція болю можлива шляхом впливу як на центральні, так і на периферичні механізми його розвитку [1, 3]. Відомо, що головне місце в анальгетичному ефекті ненаркотичних анальгетиків займає пригнічення синтезу простагландинів у головному мозку [11-14]. Також важлива роль відводиться взаємодії анальгетиків з моноамінергічними ланцюгами ендогенної антиноцицептивної системи [9]. Дослідники вивчили вплив ненаркотичних анальгетиків на центральні ланцюги передачі больових імпульсів [2], а також взаємодію протибольових засобів з опіатергічними механізмами в ЦНС [10].

Незважаючи на існування великої кількості протибольових засобів, створення нових, яким, поряд зі значною анальгетичною дією, притаманна мінімальна токсичність, є доцільним і актуальним. Дослідження, проведене нами з метою вивчення гострої [5] та хронічної токсичності [6], довело нетоксичність та нешкідливість комбінації під умовною назвою "Мігрепін". При внутрішньошлунковому введенні мишам і щурам він мав низьку гостру токсичність (ДЛ₅₀ для мишей складає 2,9 г/кг, для щурів – 6 г/кг). Досліджена комбінація в гострому досліді не викликала патоморфологічних змін внутрішніх органів тварин. У мишей і щурів була відсутня видова чутливість. Коefіцієнт видової чутливості складає 2,07, що дає можливість екстраполяції одержаних да-

них на людину. Мігрепін (2 г/кг внутрішньошлунково кожного дня протягом 1 місяця) не викликав загибель щурів, не впливав на загальний стан тварин, масу їх тіла і трофіку, роботу серця, ЦНС, клітинний склад крові, функції печінки і нирок, про що свідчать дані фізіологічних, біохімічних і патоморфологічних дослідів. При тривалому застосуванні (1 місяць) досліджена комбінація активувала природні процеси біотрансформації в печінці, шлунково-кишковому тракті та нирках.

Метою роботи було вивчити в експерименті на лабораторних тваринах (щури та миші) вплив мігрепіну в різних дозах на периферичний компонент ноцицептивної реакції.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для вивчення впливу мігрепіну на периферичний компонент ноцицептивної реакції використано модель "ацетилхолінових судом" у мишей у зв'язку з тим, що під впливом ацетилхоліну активується метаболізм арахідонової кислоти циклооксигеназою, в результаті чого збільшується синтез простагландинів, які викликають судоми.

Досліди проводили на 42 білих мишах обох статей масою 18-20 г, яких було поділено на сім груп по 6 тварин у кожній. Тваринам 1-5 груп внутрішньошлунково одноразово вводили мігрепін у вигляді 0,01-1 % зависі на 3 % крохмальному слизу в різних дозах (табл. 1).

Як референт-препарат використано Д-На (7 мг/кг) в аналогічних умовах (6-та група). Контрольні тварини одержували 3 % крохмальний слиз в еквівалентних дозах (7-ма група). Судоми викликали шляхом внутрішньочеревного введення 0,7 % розчину ацетилхоліну (0,2 мл на тварину), який вводили через 1 год

© Г.О. Сирова, 2010.

Таблиця 1 – Розподіл тварин за групами при вивченні протибольової дії периферичного генезу мігрепіну на моделі “ацетилхолінових судом” у мишей

| Група | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та | 5-та | 6-та | 7-ма |
|----------------|----------------------|---------------------|-------------------|----------------------|--------------------|---------------|----------------------------|
| Умови дослідів | мігрепін, 0,14 мг/кг | мігрепін, 1,4 мг/кг | мігрепін, 7 мг/кг | мігрепін, 17,5 мг/кг | мігрепін, 28 мг/кг | Д-На, 7 мг/кг | контроль, крохмальний слиз |

після дослідних речовин. За тваринами спостерігали 10 хв, і визначали кількість судом. Анальгетичну активність оцінювали за здатністю речовин зменшувати кількість судом в дослідних групах порівняно з контрольною.

Також для вивчення впливу мігрепіну на периферичний компонент ноцицептивної реакції використано модель “оцтовокислих судом” у щурів. У механізмі розвитку патології під впливом оцтової кислоти відбувається активація калікреїнкінінової системи, простагландинів, біогенних амінів, лейкотриєнів, які є ендогенними медіаторами запалення і сприяють розвитку судом черевних м’язів, це суп-

роводжується витягуванням задніх кінцівок і прогинанням спини. Судоми викликали 0,6 % розчином оцтової кислоти, яку вводили внутрішньочеревно (1 мл на 100 тварин). Мігрепін в різних дозах, крохмальний слиз, референт-препарат (Д-На) вводили внутрішньошлунково за 1 год до введення альгогену. За тваринами спостерігали протягом 20 хв після введення оцтової кислоти, і фіксували у них кількість судом. Досліди проводили на 42 щурах, яких було поділено на сім груп по 6 тварин у кожній. Мігрепін вводили одноразово внутрішньошлунково у вигляді 0,01-0,1 % зависі на 3 % крохмальному слизу в різних дозах (табл. 2).

Таблиця 2 – Розподіл тварин за групами при вивченні протибольової дії периферичного генезу мігрепіну на моделі “оцтовокислих судом” у щурів

| Група | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та | 5-та | 6-та | 7-ма |
|----------------|---------------------|-------------------|-------------------|----------------------|--------------------|---------------|----------------------------|
| Умови дослідів | мігрепін, 0,1 мг/кг | мігрепін, 1 мг/кг | мігрепін, 5 мг/кг | мігрепін, 12,5 мг/кг | мігрепін, 20 мг/кг | Д-На, 5 мг/кг | Контроль, крохмальний слиз |

Всі досліди виконано відповідно до існуючих рекомендацій [8]. Щурів та мишей утримували в умовах віварію згідно з правилами гуманного ставлення до лабораторних тварин. Усі втручання проводили з дотриманням принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), й ухвали Першого національного конгресу з біоетики (Київ, 2007).

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали з використанням загальноприйнятих методів [4].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Вивчення стану периферичної ланки болю. Досліди на

мишах. Мігрепін в дозах 7 (3-тя група), 17,5 (4-та група), 28 (5-та група) проявив значну анальгетичну активність. За здатністю пригнічувати ацетилхолінове ноцицептивне подразнення мігрепін в цих дозах діяв аналогічно Д-На (6-та група): кількість “ацетилхолінових судом” в 3-5 групах статистично вірогідно не відрізнялась від показника, що спостерігався при введенні референт-препарату. Разом із тим, відзначали статистично більшу кількість судом у мишей 1-2 груп відносно групи порівняння (6-та). При введенні мігрепіну в усіх досліджених дозах, крім 0,14 мг/кг (1-ша група), відмічено статистично вірогідні показники відносно контрольної групи (табл. 3).

Таблиця 3 – Вивчення впливу різних доз мігрепіну на периферичний компонент ноцицептивної реакції на моделі “ацетилхолінових судом” у мишей

| Група | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та | 5-та | 6-та | 7-ма |
|-----------------------------------|----------------------|---------------------|-------------------|----------------------|--------------------|---------------|----------|
| Умови дослідів | мігрепін, 0,14 мг/кг | мігрепін, 1,4 мг/кг | мігрепін, 7 мг/кг | мігрепін, 17,5 мг/кг | мігрепін, 28 мг/кг | Д-На, 7 мг/кг | Контроль |
| “Ацетилхолінові судом”, кількість | 6,7±0,2** | 5,2±0,3** | 4,2±0,3* | 3,0±0,6* | 2,7±0,4* | 3,3±0,2* | 7,5±0,4 |

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – різниця статистично вірогідна з контролем; ** – різниця статистично вірогідна з Д-На.

Досліди на щурах. Під час експериментального вивчення стану периферичної ланки болю відмічено, що кількість судом при введенні різних доз мігрепіну і Д-На (5 мг/кг) статистично вірогідно відрізнялась від контролю. Одержані дані свідчать про наявність у всіх дослідних доз мігрепіну протибольової дії пе-

риферичного характеру. Протибольова дія мігрепіну у всіх досліджених дозах перевищувала дію Д-На (5 мг/кг) (табл. 4). При введенні мігрепіну в дозах 1; 5; 12,5 та 20 мг/кг спостерігалось статистично вірогідне зменшення судом відносно групи порівняння – на 52, 55, 67, 68 % відповідно.

Таблиця 4 – Вивчення впливу різних доз мігрепіну на периферичний компонент ноцицептивної реакції на моделі “оцтових судом” у щурів

| Група | 1-ша | 2-га | 3-тя | 4-та | 5-та | 6-та | 7-ма |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------|----------|
| Умови дослідів | мігрепін, 0,1 мг/кг | мігрепін, 1 мг/кг | мігрепін, 5 мг/кг | мігрепін, 12,5 мг/кг | мігрепін, 20 мг/кг | Д-На, 5 мг/кг | Контроль |
| “Оцтові судом”, кількість | 6,5±0,9 ^{*,**} | 4,8±0,9 ^{*,**} | 4,5±0,4 ^{*,**} | 3,3±0,5 ^{*,**} | 3,2±0,5 ^{*,**} | 10,0±1,2 [*] | 14,8±1,5 |

ВИСНОВКИ. 1. Мігрепін впливає на периферичний компонент ноцицептивної реакції в мишей та щурів.

2. Протибольова дія мігрепіну в дозах 7; 17,5 та 28 мг/кг аналогічна такій Д-На (7 мг/кг) на моделі “ацетилхолінових судом” у мишей.

3. Протибольова дія мігрепіну в усіх досліджених дозах (0,1; 1,0; 5,0; 12,5; 20 мг/кг) перевищує таку Д-На (5 мг/кг) на моделі “оцтових судом” у щурів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Алексеев В.В. Основные принципы лечения болевых синдромов // Русский медицинский журнал. Человек и лекарство. – 2003. – **11**, № 5 (177). – С. 250-253.

2. Артемьев И.Ю., Даринский Ю.А., Сологуб М.И. Гипотеза о возможном механизме действия болеутоляющих средств на уровне нейрона // Эксперим. и клин. фармакол. – 1992. – **55**, № 1 – С. 16-18.

3. Бертрам Г. Катцунг. Базисная и клиническая фармакология. – М.: Бином, 1998. – Т. 1. – С. 361-378.

4. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

5. Звягинцева Т.В., Киричок Л.Т., Сирова Г.О. та ін. Вивчення гострої токсичності комбінації похідного 2,4-дихлорбензойної кислоти з карбамазепіном і кофеїном // Мед. хімія. – 2008. – **10**, № 1. – С. 59-62.

6. Звягинцева Т.В., Киричок Л.Т., Сирова Г.О. та ін. Вивчення хронічної токсичності комбінації 2,4-дихлорбензойної кислоти, кофеїну та карбамазепіну // Мед. хімія. – 2008. – **10**, № 2. – С. 83-86.

7. Лоуренс Д.Р., Беннит П.Н. Центральная нервная система: боль и анальгетические средства //

Клиническая фармакология: Руководство: Пер. с англ. – М.: Медицина, 1991. – Т. 2. – С. 6-27.

8. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації. – К., 2001. – 528 с.

9. Тринус Ф.П., Бухтиарова Т.А. Фармакологический анализ участия моноаминергических систем в механизме анальгезирующего действия НПВС // В кн.: Фармакология и токсикология. – К., 1989. – Вып. 24. – С. 89-92.

10. Hill R.G. Endogenous opioids and pain a review // J.R. Med. – 1981. – **74**, № 6. – P. 448-450.

11. Kolaczowska E. Cyclooxygenases I. Role in inflammation // Cell Biology. – 2002. – № 29. – P. 533-554.

12. Kolaczowska E. Cyclooxygenases II. Nonsteroidal antiinflammatory drugs as their inhibitor // Cell Biology. – 2002. – № 29. – P. 555-578.

13. Leveson D.I., Simmons C.E., Brenner B.M. Arachidonic acid metabolism, prostaglandins and the kidney // Am. J. of Med. – 1982. – **72**. – P. 354-374.

14. Vane I.R., Bakhle I.S., Botting R.M. Cyclooxygenases 1 and 2 // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1998. – № 38. – P. 97-120.

ВЛИЯНИЕ МИГРЕПИНА В РАЗНЫХ ДОЗАХ НА ПЕРИФЕРИЧЕСКИЙ КОМПОНЕНТ НОЦИЦЕПТИВНОЙ РЕАКЦИИ

А.О. Сырвая

ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Представлены материалы по изучению противоболевой активности нового отечественного противовоспалительного лекарственного средства с условным названием "Мигрепин" в различных дозах. Противоболевые свойства исследовали по влиянию на периферический компонент болевой реакции. Состояние периферического звена боли изучали на модели "ацетилхолиновых судорог" у мышей и модели "уксусных судорог" у крыс. Мигрепин (внутрижелудочно однократно) проявляет противоболевое действие периферического генеза в дозах 7; 17,5; 28 мг/кг у мышей, аналогичную D-Na (7 мг/кг), и в дозах 0,1; 1; 5; 12,5; 20 мг/кг у крыс, значительно превышающую D-Na (5 мг/кг).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мигрепин, противоболевая активность.

INFLUENCE OF MIGREPIN IN DIFFERENT DOSES ON THE PERIFERICAL COMPONENT OF NOCYCEPTIVE REACTION

H.O. Syrova

KHARKIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

Summary

The materials of studying analgetic periferical action of the Ukrainian resolvent with a code name "Migrepin" in the different doses (by rats- 0,1; 1,0; 5; 12,5; 20 mg/kg and by mounthes 0,14; 1,4; 7; 17,5; 28 mg/kg) and the reference medication diclofenac sodium (5 and 7 mg/kg). Studying of the properties was based on the influence on the peripheral component of the pain reaction. The condition of the peripheral link of the pain that was determined in rats on the model of "acetic-acid cramp" and in mounthes on the model "acetylholin cramp". Migrepin has (intragastrically, once) analgetic effect of the peripheral genesis by rats (Migrepin in all doses biggest of D-Na (5 mg/kg)). Analgetic affect of the Migrepin in the doses 7; 17,5; 28 mg/kg and D-Na (7 mg/kg) are the same on the mounthes.

KEY WORDS: migrepin, analgetic action.

Отримано 20.10.2009 р.

Адреса для листування: Г.О. Сырвая, Харківський національний медичний університет, просп. Леніна, 4, Харків, 61022, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ВИВЧЕННЯ ДИНАМІКИ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ЩУРІВ НА ФОНІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТЕРАПІЇ ПОСТТРАВМАТИЧНОГО ОСТЕОАРТРИТУ КОМПОЗИЦІЄЮ НА ОСНОВІ АМІНОЦУКРІВ – ПОХІДНИХ ГЛЮКОЗАМІНУ ТА ФЛАВОНОЇДУ КВЕРЦЕТИНУ

К.О. Зупанець

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Представлено результати дослідження динаміки біохімічних показників сироватки крові щурів під час експериментальної терапії посттравматичного остеоартриту композицією на основі суміші аміноцукрів – глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну та флавоноїду кверцетину. Узагальнюючи дані вивчення біохімічних показників, можна зробити висновок про сприятливий вплив досліджуваної композиції на біохімічні процеси обміну хрящової і кісткової тканин, що проявлялося в нормалізації біохімічних значень показників запального і дистрофічного процесів. За результатами дослідження, композиційний засіб на основі суміші аміноцукрів та кверцетину може бути рекомендований для подальшого доклінічного вивчення як протизапальний і хондропротекторний об'єкт.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: глюкозаміну гідрохлорид, N-ацетилглюкозамін, кверцетин, композиція, посттравматичний остеоартрит, біохімічні дослідження.

ВСТУП. Оптимізація лікування деструктивно-запальних захворювань суглобів, зокрема остеоартриту, є актуальною проблемою сучасної експериментальної та клінічної фармакології. Дана нозологія посідає одне з лідируючих місць у структурі ревматологічних захворювань [5].

В результаті взаємодії механічних та біологічних факторів при остеоартриті порушуються нормальні процеси синтезу та деградації в хондроцитах, матриці суглобового хряща та в субхондральній кістці. На сьогодні достеменно відомо, що основним патологічним механізмом, що руйнує хрящ, є порушення обміну протеогліканів – основної речовини, яка разом із хондроцитами утворює хрящову тканину. До ранніх ознак остеоартриту можна віднести порушення розподілу глікозаміногліканів (ГАГ) у суглобі. За однією з теорій, це відбувається внаслідок згасання біохімічних процесів у хондроцитах. Існують також дані про зниження загального рівня ГАГ в артрозних хрящах, особливо хондроїтинсульфатів, завдяки зменшенню довжини ланцюгів цих полісахаридів, зокрема за рахунок аміноцукрів [4, 8, 14]. Тому біохімічні дослідження займають вагомe місце в ході діагностики та терапії запально-деструктивних захворювань суглобів.

Для медикаментозної корекції захворювань сполучної тканини широко використовую-

ють нестероїдні протизапальні препарати (НПЗП) та повільно діючі симптоммодифікуючі засоби [9, 10].

Засоби хондропротекторної дії активують синтез хряща та сприяють регенерації матриксу сполучної тканини шляхом введення в організм профакторів синтезу кислих мукополісахаридів (глюкозаміну, хондроїтинсульфату чи гіалуронової кислоти).

Пошук перспективних поєднань існуючих хондропротекторних засобів з іншими активними субстанціями, як правило, в більшості випадків спрямований на потенціювання протизапальних властивостей аміноцукрів [6, 11, 13, 15].

Так, нами в раніше проведених дослідженнях експериментально обґрунтована доцільність сумісного поєднання аміноцукрів – похідних глюкозаміну (глюкозаміну гідрохлориду та N-ацетилглюкозаміну) з флавоноїдом кверцетином. Таке сполучення сприяє синергічності протизапального потенціалу отриманої композиції, зокрема завдяки впливу на цикло- та ліпооксигеназний шляхи реалізації запальної реакції.

Метою даної роботи стало вивчення динаміки біохімічних показників крові експериментальних тварин із посттравматичним остеоартритом на фоні експериментальної терапії композицією на основі суміші аміноцукрів – глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну та флавоноїду кверцетину.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження хондропротекторних властивостей композиції на основі суміші аміноцукрів – глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну та флавоноїду кверцетину проводили на моделі посттравматичного остеоартриту на 80 білих щурів-самцях віком 3 місяці масою 180-220 г [2].

Тваринам під загальним наркозом (аміназин – 10 мг/кг, кетамін – 50 мг/кг) в асептичних умовах робили розріз шкіри, заднім доступом відкривали голівку стегнової кістки та за допомогою зубного бору (діаметром 0,8 мм) виконували кістково-хрящовий дефект на глибину 1 мм. Рану пошарово ушивали (м'які тканини – кетгуттом, шкіру – шовком).

Через 1 добу після проведення операції тваринам починали вводити досліджувані об'єкти. Препарати вводили внутрішньощлунково спеціальним зондом впродовж 30 днів.

Оперованих щурів поділили на такі групи: 1-ша група – контрольні (неліковані) тварини, які одержували розчинник (фізіологічний розчин) в еквівалентній кількості, як і дослідні тварини; 2-га – тварини, які одержували досліджувану композицію у дозі 81,85 мг/кг; 3-тя – тварини, які одержували суміш аміноцукрів у дозі 61,39 мг/кг; 4-та – тварини, які одержували кверцетин у дозі 20,46 мг/кг.

Експерименти було виконано відповідно до правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [12].

Евтаназію щурів здійснювали шляхом передозування ефіру.

Для біохімічних досліджень забирали кров. У сироватці крові за Л.І. Слуцьким [8] визначали хондроїтинсульфати, а також досліджували глікопротеїни за реакцією з орциновим реактивом [3], сіалові кислоти – за методом Гесса [3]; також визначали суму ГАГ [1].

Одержані результати обробляли методами варіаційної статистики з використанням критеріїв Фішера–Стьюдента за допомогою комп'ютерних програм [7].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження біохімічних показників крові тварин проводили в динаміці лікування на 15 та 30 доби експерименту (табл. 1).

У ході вивчення біохімічних показників метаболізму сполучної тканини у щурів було відмічено, що на 15 добу після моделювання посттравматичного остеоартриту спостерігався виражений деструктивний процес у суглобовому хрящі тварин із контрольною патологією, що підтверджено достовірним підвищенням рівня досліджуваних біохімічних

показників даної групи щурів порівняно з інтактними. Лікувальне введення досліджуваних об'єктів чинило різного ступеня виразності терапевтичну дію, яку оцінювали за впливом на показники біохімічних маркерів запалення та деструкції. У тварин, лікованих досліджуваною композицією, в даний період експерименту відмічено найбільш чітку, порівняно з іншими експериментальними групами, тенденцію до нормалізації показників обміну сполучної тканини. Так, кількісна оцінка вмісту сіалових кислот, які є специфічними показниками запального процесу, в даній експериментальній групі не мала достовірних відмінностей від показників щурів групи інтактного контролю. За показниками вмісту глікопротеїнів, що є неспецифічними показниками інтенсивності запального та деструктивного процесів у суглобах, і показниками вмісту хондроїтинсульфатів та ГАГ (деструктивний компонент) щури, які одержували досліджувану композицію, не мали достовірних відмінностей від тварин групи інтактного контролю, за винятком вмісту ГАГ. Водночас спостерігалася достовірна відмінність у показниках тварин, які одержували композицію, порівняно зі щурами з контрольною патологією.

Аналізуючи показники щурів, яким вводили суміш аміноцукрів на 15 добу експерименту, відмічено достовірну відносно тварин з контрольною патологією тенденцію до нормалізації показників, що характеризують деструктивний компонент розвитку патології та незначний недостовірний вплив на рівень сіалових кислот (запальна ланка).

Майже протилежну закономірність відзначено при аналізі показників тварин, які отримували кверцетин. Більшою мірою нормалізувалися показники, що характеризують запалення, та незначний вплив чинився на нормалізацію деструктивних змін, що мали місце в даний період експерименту.

Таким чином, у даний період експерименту відмічено тенденцію до нормалізації показників біохімічного дослідження в оперованих та лікованих тварин, найбільш чітко та достовірно виражену в щурів, які одержували досліджувану композицію. Причому показники тварин, які отримували досліджувану композицію на основі суміші аміноцукрів та кверцетину, достовірно відрізнялися від показників щурів референс-груп уже в даний період експерименту.

На кінець експерименту – 30 добу – рівень досліджуваних показників у щурів із контрольною патологією дещо знизився, проте залишався достовірно відмінним від показників інтактних тварин.

Таблиця 1 – Динаміка біохімічних показників сироватки крові тварин, лікованих композицією на основі суміші аміноцукрів – N-ацетил-глюкозаміну, глюкозаміну гідрохлориду та флавоноїду кверцетину (n=80)

| Термін експерименту, доба | Група тварин | Сіалові кислоти, ммоль/л | Глікопротеїни, г/л | Хондроїтин-сульфати, г/л | ГАГ, од. |
|---------------------------|----------------------|--|--|--|--|
| 15 | Інтактний контроль | 3,347±0,245 | 0,533±0,028 | 0,616±0,011 | 19,500±0,925 |
| | Контрольна патологія | 4,895±0,331 $p_1 < 0,01$ | 0,903±0,046 $p_1 < 0,001$ | 0,995±0,029 $p_1 < 0,001$ | 36,175±1,415 $p_1 < 0,001$ |
| | Композиція | 3,821±0,108 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,05$ | 0,596±0,025 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,01$ | 0,685±0,084 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,05$ | 25,063±1,618 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,01$ |
| | Суміш аміноцукрів | 4,543±0,188 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ | 0,660±0,008 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ | 0,875±0,013 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$ | 29,725±0,999 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$ |
| | Кверцетин | 4,245±0,134 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ | 0,786±0,049 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ | 0,891±0,022 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ | 32,138±1,101 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ |
| 30 | Інтактний контроль | 2,525±0,296 | 0,460±0,020 | 0,657±0,024 | 21,250±0,937 |
| | Контрольна патологія | 3,706±0,127 $p_1 < 0,01$ | 0,654±0,021 $p_1 < 0,001$ | 0,895±0,031 $p_1 < 0,001$ | 30,450±1,261 $p_1 < 0,001$ |
| | Композиція | 2,873±0,081 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,01$ $p_4 < 0,01$ | 0,493±0,034 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,01$ | 0,696±0,028 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,01$ | 22,575±0,928 $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,05$ $p_4 < 0,001$ |
| | Суміш аміноцукрів | 3,333±0,127 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ | 0,598±0,023 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ | 0,764±0,012 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$ | 26,638±1,142 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$ |
| | Кверцетин | 3,301±0,106 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$ | 0,632±0,027 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ | 0,845±0,027 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ | 29,387±1,196 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ |

Примітка. p_1 – достовірність відмінностей відносно показників тварин групи інтактного контролю в аналогічний період експерименту; p_2 – достовірність відмінностей відносно показників тварин з контрольною патологією в аналогічний період експерименту; p_3 – достовірність відмінностей відносно показників тварин, які одержували суміш аміноцукрів, в аналогічний період експерименту; p_4 – достовірність відмінностей відносно показників тварин, які отримували кверцетин, в аналогічний період експерименту.

Біохімічні показники сироватки крові тварин, яким вводили досліджувану композицію, на 30 день експерименту відповідали показникам інтактних щурів і достовірно відрізнялися від показників контрольних тварин та тварин, лікованих препаратами порівняння – сумішшю аміноцукрів та власне кверцетином.

У даний період експерименту в групах щурів, які отримували власне суміш аміноцукрів та кверцетин, досліджувані біохімічні показники достовірно відрізнялися від показників тварин групи інтактного контролю. У щурів, лікованих сумішшю аміноцукрів, на кінець експерименту відмічали більш чітку тенденцію до нормалізації показників, що харак-

теризують деструктивний компонент розвитку патології. У тварин, які отримували кверцетин, спостерігалася протилежна закономірність, що ілюструвала тенденцію до нормалізації запального компонента у розвитку гонартрозу. Дані закономірності стосовно усіх дослідних груп узгоджувались з попереднім періодом експерименту.

Таким чином, узагальнюючи дані вивчення біохімічних показників, можна зробити висновки про виражений сприятливий вплив досліджуваної композиції на біохімічні показники обміну хрящової і кісткової тканин, що проявлялося в зниженні запального і дистрофічного процесів.

ВИСНОВКИ. 1. За умов експериментальної терапії посттравматичного остеоартриту встановлено виражену протизапальну і хондропротекторну активність композиції на основі суміші аміноцукрів та флавоноїду кверцетину.

2. Досліджувана композиція може бути рекомендована для подальших доклінічних досліджень як протизапальний і хондропротекторний засіб.

ЛІТЕРАТУРА

1. А.с. 960626 СССР, МКИ³ G 09 № 23/28. Способ определения гликозаминогликансульфатов в сыворотке крови / М.Р. Штерн, О.П. Тимошенко, Ф.С. Леонтьева, Г.Ф. Ключева. – Опубл. 23.09.82, Бюл. № 35. – 6 с.
2. Доклинические исследования лекарственных средств: Методические рекомендации / Под ред. А.В. Стефанова. – К.: Авиценна, 2002. – С. 311-326.
3. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: Справочник: В 2 т. – Т. 1. – 2-е изд. – Мн.: Интерпрессервис, 2003. – 495 с.; Т. 2. – 2-е изд. – Мн.: Интерпрессервис, 2003. – 463 с.
4. Маршалл В.Дж. Клиническая биохимия: Пер. с англ. – СПб.: БИНОМ, 2000. – 368 с.
5. Остеоартроз: консервативная терапия: Монография / Под ред. Н.А. Коржа, Н.В. Дедух, И.А. Зупанца. – Х.: Золотые страницы, 2007. – 424 с.
6. Попов С.Б., Шебеко С.К., Зупанец К.О. та ін. Модифікація фармакологічних властивостей нестероїдних протизапальних препаратів аміноцукром глюкозаміну гідрохлоридом: Методичні рекомендації. – Х., 2007. – 24 с.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. – 3-е изд. – М.: Медиа Сфера, 2006. – 312 с.
8. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. – Л.: Медицина, 1969. – 427 с.
9. Туляков В.О., Зупанец К.О., Шебеко С.К. Протекторні властивості глюкозаміну // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2009. – **10**, № 3. – С. 3-9.
10. Туляков В.О., Зупанец К.О., Шебеко С.К. Фармакологічні властивості глюкозаміну: мембраностабілізуючі, протизапальні, антиоксидантні і імунотропні // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2009. – **9**, № 2. – С. 3-8.
11. Chi Y.S., Jong H.G., Son K.H. et al. Effects of Naturally Occurring Prenylated Flavonoids on Enzymes Metabolizing Arachidonic Acid: Cyclooxygenases and Lipoxygenases // Biochemistry and Pharmacology. – 2001. – № 62. – P. 1185-1191.
12. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
13. Galisteo M., Garcia-Saura M.F., Jimenez R. et al. Effects of chronic quercetin treatment on antioxidant defence system and oxidative status of deoxycorticosterone acetate-salt-hypertensive rats // Molecular And Cellular Biochemistry. – 2004. – **259** (1-2). – P. 91-99.
14. Martin J.A., Buckwalter J.A. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair // J. Bone Joint Surg. Am. – 2003. – № 85-A, Suppl 2. – P. 106-110.
15. Xiao Chen, Ophelia Q.P. Yin, Zhong Zuo, Moses S.S. Chow Pharmacokinetics and Modeling of Quercetin and Metabolites // Pharmaceutical Research. – 2005. – **22** (6). – P. 892-901.

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРЫС НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО ОСТЕОАРТРИТА КОМПОЗИЦИЕЙ НА ОСНОВЕ АМИНОСАХАРОВ – ПРОИЗВОДНЫХ ГЛЮКОЗАМИНА И ФЛАВОНОИДА КВЕРЦЕТИНА

Е.А. Зупанец

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Представлены результаты исследования динамики биохимических показателей сыворотки крови крыс во время экспериментальной терапии посттравматического остеоартрита композицией на основе смеси аминсахаров – глюкозамина гидрохлорида, N-ацетилглюкозамина и флавоноида кверцетина. Обобщая данные изучения биохимических показателей, можно сделать вывод о благоприятном влиянии исследуе-

мой композиції на біохімічні процеси обміну хрящової і костної тканин, що проявлялось в нормалізації біохімічних значень показателів запального і дистрофічного процесів. По результатам дослідження, композиційне средство на основі суміші аміносахарів і кверцетину може бути рекомендовано для наступного доклінічного вивчення в якості протизапального і хондропротекторного об'єкта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глюкозамин гидрохлорид, N-ацетилглюкозамин, кверцетин, композиция, посттравматический остеоартрит, биохимические исследования.

STUDY OF BIOCHEMICAL INDEXES DYNAMICS IN RATS DURING EXPERIMENTAL POSTTRAUMATIC OSTEOARTHRITIS THERAPY WITH COMPOSITION CONTAINING AMINOSUGARS – THE DERIVATES OF GLUCOSAMINE AND FLAVONOID QUERCETINE

K.O. Zupanets

NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

There are presented the results of biochemical indexes dynamics in rats blood serum during the experimental therapy of posttraumatic osteoarthrosis with composition containing aminosugars mixture – glucosamine hydrochloride, N-acetylglucosamine and flavonoid quercetine. Summarizing the information about the biochemical indexes researches, it is possible to draw the conclusion that the investigated composition favourably affects the biochemical processes of cartilage and bone tissue exchange, that fact in normalization of biochemical indexes of inflammatory and dystrophic processes. According to the results of research the compositive remedy containing aminosugars mixture and quercetine can be recommended for the subsequent preclinical study as antiinflammatory and chondroprotective object.

KEY WORDS: glucosamine hydrochloride, N-acetylglucosamine, quercetine, composition, posttraumatic osteoarthritis, biochemical researches.

Отримано 07.12.2009 р.

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

ПОЛІФЕНОЛИ ВИНОГРАДНИХ ВИН ЗАПОБІГАЮТЬ НАКОПИЧЕННЮ НІТРОТИРОЗИНУ ТА АКТИВАЦІЇ PARP-1 У СІТКІВЦІ ОКА ЩУРІВ ІЗ СТРЕПТОЗОТОЦИНІНДУКОВАНИМ ЦУКРОВИМ ДІАБЕТОМ

**В.Р. Дрель¹, А.Р. Гнатуш¹, А.Я. Яланецький², В.І. Мізін², В.А. Загоруйко²,
В.Г. Гержикова², Н.О. Сибірна¹**
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА¹
НАЦІОНАЛЬНИЙ ІНСТИТУТ ВИНОГРАДУ І ВИНА "МАГАРАЧ"², ЯЛТА

Досліджено вплив поліфенолів червоного та білого вин на сітківку ока щурів за умов стрептозотоциніндукованого цукрового діабету. Встановлено, що та кількість поліфенолів, яка є у червоному і білому винах, не впливає на рівень глюкози у крові як контрольної групи, так і тварин, хворих на діабет. Експериментально виявлено зростання маси тіла здорових щурів і тварин із цукровим діабетом при споживанні червоного вина на 47 та 18 % відповідно. Показано, що активація полі-(ADP-рибозо)-полімерази-1, одного з маркерних показників ранніх пошкоджень мікросудин сітківки ока, за умов діабету знижується при споживанні червоного вина до рівня контролю. Виявлено також, що поліфеноли червоного та білого вин, які є скавенджерями активних форм кисню та азоту, частково або повністю нормалізують рівень нітротирозинмодифікованих білків сітківки ока. Отримані результати обґрунтовують доцільність застосування червоних вин та можливість створення препаратів поліфенолів для профілактики й лікування діабетичних ретинопатій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: поліфеноли, діабетична ретинопатія, оксидативно-нітрозативний стрес, полі-ADP-рибозильовані білки.

ВСТУП. За останні десятиліття захворюваність на діабет досягла епідемічних показників. Так, за даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), в 2009 р. на цукровий діабет хворіють вже більше 200 млн людей. За рівнем смертності захворюваність на діабет займає четверте місце, і даний показник складає понад 400 тис. людей на рік. Цукровий діабет підвищує ризик розвитку катаракти і глаукоми, проте найбільшу загрозу для зору становить ураження сітківки ока. Незалежно від типу діабету (1-го або 2-го) у більше 80 % хворих на діабет людей (із тривалістю захворювання понад 10 років) розвиваються ті чи інші форми ретинопатій (захворювання сітківки ока), які зазвичай можуть призводити до сліпоті. Показано, що вчасне виявлення погіршення зору за умов діабету та лікування цього ускладнення запобігають сліпоті у 90 % хворих з діабетичною ретинопатією [24]. Разом із тим, цукровий діабет є основною причиною сліпоті людей середнього віку (40-45 років) і становить 2 % серед пацієнтів з даним захворюванням. Лазерна фотокоагуляція,

ін'єкції тріамцінолону та хірургічні втручання (вітректомія) – головні методи лікування діабетичних ретинопатій. Вони спрямовані на уповільнення подальших патологічних перетворень сітківки ока і не є гарантією запобігання сліпоті надалі. На даний момент не запропоновано ліків, які б попереджували розвиток діабетичних ретинопатій та катарактогенезу на ранніх етапах їх розвитку та в цілому перешкождали їх формуванню. Пошук нових препаратів, що запобігатимуть появі діабетичних ретинопатій, як в цілому й інших хронічних уражень за умов цукрового діабету, є на сьогодні надзвичайно актуальним завданням.

Діабетичні ретинопатії розвиваються в результаті взаємодії комплексу різноманітних патологічних процесів, які виникають як у судинах, так і в нервах сітківки [9]. Найважливішими патогенетичними механізмами в розвитку ретинопатій є: зростання активності альдозоредуктази (з подальшою акумуляцією метаболічних продуктів поліольного шляху – фруктози та сорбітолу), інтенсифікація неферментативного глікозилювання, активація протейнінази С, оксидативно-нітрозативний стрес та активація полі-(ADP-рибозо)-полімерази-1 (PARP-1), які експериментально було виявле-

© В.Р. Дрель, А.Р. Гнатуш, А.Я. Яланецький,
В.І. Мізін, В.А. Загоруйко, В.Г. Гержикова,
Н.О. Сибірна, 2010.

но і досліджено на ранніх та пізніх стадіях розвитку захворювання на різних діабетичних моделях [9, 12]. В результаті гіперглікемії, викликаній діабетом як 1-го, так і 2-го типів, посилюється утворення вільних радикалів, перш за все супероксид-аніона, який відразу перетворюється в інші активні форми кисню, серед яких гідроксил-радикал, пероксид водню та пероксинітрид (ONOO⁻) [19]. Утворення пероксинітриду в результаті підвищення вмісту вільних радикалів є одним із ключових моментів, які характеризують початок оксидативно-нітрозативного стресу в клітині. Пероксинітрид, взаємодіючи з білками, нітрозилує їх за залишками тирозину, таким чином змінюючи їх біологічну роль. Рівень нітрозильованих білків прямо пов'язаний із хронічними патологіями, характерними для захворювання на діабет. Так, підвищений рівень нітрозильованих білків за умов гіперглікемії при діабеті як 1-го, так і 2-го типів було виявлено в сідничному нерві (шванівських клітинах), нирках (мезангіальних клітинах), сітківці ока [5, 19].

Виявлено також, що активація ензиму PARP-1, який, у відповідь на пошкодження ДНК, використовуючи NAD⁺ як субстрат, продукує нікотинамід і полі-(ADP)-рибозу, яку, у свою чергу, приєднує до ряду ядерних білків та полімеризує її, є важливим фактором у розвитку і регуляції процесів формування серцево-судинних захворювань, раку та цукрового діабету [11]. Показано, що активація PARP-1 за умов цукрового діабету призводить до переродження перицитів капілярів сітківки ока та наступної їх втрати, збільшує адгезивність лейкоцитів до ендотеліальних клітин, стимулює продукцію ендотеліального фактора росту (VEGF) та індукує початок неоваскуляризації [22].

Відомо, що ретинопатії за умов цукрового діабету на ранніх стадіях характеризуються частковим збільшенням проникності (частковою втратою кров'яного бар'єра сітківки), втратою перицитів судин з наступним потовщенням стінок останніх, їх дегенерацією, порушенням кровообігу в оці та гіпоксією. Зменшення перфузії капілярів і гіпоксія, у свою чергу, призводять до неоваскуляризації, надмірного розвитку аномального ендотелію з наступною проліферацією глії і накопиченням колагену. Ангіогенез супроводжується модифікацією ендотелію, деградацією базальної мембрани та новоутворенням капілярів. Усе це в кінцевому результаті призводить до мікроінфарктів та відшаровування сітківки [2]. Таким чином, вміст нітротирозину та активація PARP-1 є ранніми маркерами патологічних змін, характер-

них для тканин та органів, чутливих до гіперглікемії, зокрема для сітківки ока.

У ході досліджень останніх років виявлено важливу роль поліфенолів червоних вин, серед яких виділяють проантоціаніди, похідні флаван-3-олів та ряд інших похідних флавоноїдів, у запобіганні серцево-судинним захворюванням [16]. Відомо, що поліфеноли червоних вин здатні взаємодіяти з білками плазми та клітинними елементами крові, попереджувати передчасне окиснення їх молекулярних комплексів, яке спричинене оксидативним стресом. Також показано значну бактерицидну та антивірусну дію даних речовин [3]. Виявлено протекторну дію поліфенолів червоних вин на деякі системи та органи за умов оксидативного стресу при цукровому діабеті та при метаболічному синдромі [17, 18]. Однак питання про протекторну здатність поліфенолів вин за цукрового діабету на сьогодні є маловивченим і потребує наступних досліджень, зокрема щодо процесу нітрузування білків та механізму розвитку ретинопатій.

Метою даної роботи було дослідити і порівняти протекторний вплив поліфенолів червоного та білого вин на здатність запобігати утворенню нітротирозинмодифікованих білків та активації PARP-1 у сітківці ока щурів за умов експериментального цукрового діабету.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на щурах-самцях лінії Вістар масою 150-200 г. Експерименти виконували відповідно до Загальних принципів роботи на тваринах, затверджених на I Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погоджених з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей" (Страсбург, Франція, 1985).

В роботі застосовували кролячі антинітротирозинові антитіла ("Upstate", США), кролячі анти-GFAP антитіла ("Chemicon", США), мишачі анти-полі-ADP-рибоза антитіла ("Trevigen, Inc.", США), козячі антикролячі, мічені пероксидазою ("Vector Laboratories", США) (Avidine D - Biotine blocking kit, "Vector Laboratories", США), авідин-біотин-пероксидазний комплекс Vector Elite kit ("Vector Laboratories", США) набору реактивів з 3-амінобензидином (DAB substrate kit, "Vector Laboratories", США), реактив для посиленої хемілюмінесценції ("Amersham", Велика Британія).

Щурів було поділено на 6 груп: 1) контроль, 2) контроль + біле вино, 3) контроль + червоне вино, 4) діабет, 5) діабет + біле вино, 6) діабет

бет + червоне вино. Тварини споживали вино, розведене у питній воді, в дозі, що відповідає 300 мл вина на 70 кг маси тіла за добу (з моніторингом та корекцією об'єму кожної доби), протягом двох тижнів перед індукцією діабету та впродовж місяця після початку захворювання. Біле столове вино було виготовлено із сорту винограду "Ркацителі" за кахетинською технологією, червоне – із сорту винограду "Каберне-Совіньон" за класичною технологією. Вміст титрованих кислот становив, відповідно, 4,5 та 5,47 г/дм³, масова концентрація фенольних сполук складала, відповідно, 1700,00 та 2309,31 мг/дм³, масова концентрація барвників – 0 (для білого) та 443,8 мг/дм³ (для червоного вина), масова концентрація проціанідинів – 780,0 та 936,0 мг/дм³.

Для індукції діабету 1-го типу щурам внутрішньочеревно вводили стрептозотозин (50 мг/кг) в цитратному буфері (рН 5,5). Хворими на діабет вважали тих тварин, в яких рівень глюкози у крові становив $\geq 13,8$ мМ.

Після закінчення експериментів забій щурів здійснювали шляхом декапітації. Половину всього препаративного матеріалу, в тому числі сітківку ока, негайно заморожували в рідкому азоті для подальших експериментів з використанням імуноблот-аналізу, а іншу половину матеріалу, зокрема цілі очні яблука, фіксували у 4 % забуференому формаліні для імуногістохімічного аналізу.

Заморожені зразки тканин зважували, і додавали буфер екстракції білків з розрахунку (1:10 маса/об'єм), який містив 50 мМ Трис-НСІ, рН 7,2; 150 мМ NaCl; 0,1% додецилсульфат натрію; 1 % NP-40; 5 мМ EDTA; 1 мМ EGTA; 1 % дезоксихолат натрію та інгібітори протеаз і фосфатаз: 1 мМ фенілметансульфонілфторид (PMSF) ("Fluka", Швейцарія), 10 мМ бензамідин ("Sigma", США), 20 мкг/мл апротиніну ("Sigma", США), 10 мкг/мл лейпептину ("Sigma", США), 1 мкг/мл пепстатину ("Fluka", Швейцарія), 1 мМ Na₃VO₄ ("Sigma", США). Далі проводили гомогенізацію в скляному гомогенізаторі ("Kimble-Kontes", США) на льодяній бані при 4 °С. Гомогенат додатково обробляли на ультразвуковому дезінтеграторі (три рази по 10 с) та залишали екстрагуватись на льоді протягом 20 хв. Детергентнерозчинну фракцію осаджували шляхом центрифугування при 14 000 г протягом 20 хв за температури 4 °С. Концентрацію білка визначали за методом Петерсона [21]. Для наступного розділення білків у поліакриламідному гелі (ПААГ) загальний білок лізатів тканин (10-100 мкг) змішували з буфером для нанесення (62,5 мМ Трис-НСІ, 1 мМ EDTA, 2 % SDS, 5 % β-меркаптоетанол, 10 %

гліцерин, 0,025 % бромфеноловий синій, рН 6,8) у співвідношенні 1:1 (v/v) і прогрівали 5 хв на водяній бані при 95 °С [8]. Електрофорез в ПААГ проводили в буферній системі Леммлі [15]. Для визначення молекулярної маси білків на електрофореграмах використовували білкові стандарти Kaleidoscope prestained standards ("Bio-Rad Laboratories", США).

Після електрофорезу білки переносили з ПААГ під дією електричного струму [25] в камері для електрофорезу та електропереносу Mini-Protean III (Bio-Rad Laboratories, США) на нітроцелюлозну мембрану ("Whatman", Велика Британія) у буфері, що містив 25 мМ Трис-НСІ (рН 8,3), 20 % метанол, 192 мМ гліцин, протягом 2 год при 250 мА. Вільні центри зв'язування блокували впродовж 2 год 2 % бичачим сироватковим альбуміном (БСА) в забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 4,3 мМ Na₂HPO₄, 1,7 мМ KH₂PO₄, рН 7,3) з 0,05 % Tween-20. Мембрану інкубували з першими антитілами (поліклональними антинітротирозиновими в розведенні 1:1000) у блокуючому буфері протягом 2 год. Відмивання проводили у ЗФР з 0,1 % Tween-20 три рази по 5 хв. Відмиту мембрану інкубували з другими антитілами, міченими пероксидазою хрому: антикролячими у розведенні 1:2000 в блокуючому буфері протягом 1 год. Мембрану відмивали у ЗФР з 0,1 % Tween-20 три рази по 5 хв. Імунореактивні сигнали на мембрані виявляли за допомогою інкубації мембрани з набором реактивів для посиленої хемілюмінесценції згідно з протоколом виробника. Мембрану після інкубації з хемілюмінесцентними реактивами експонували на рентгенівській плівці. Плівку проявляли у стандартному фенідон-гідрохіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем. Для контролю однакового вмісту білків у пробах мембрану звільняли від перших та других антитіл у буфері, що містив 25 мМ гліцин-НСІ, рН 2,5, 1 % SDS, протягом 30 хв. Мембрану повторно блокували у блокуючому буфері 30 хв та повторно інкубували з анти-β-актиновими антитілами ("Sigma", США). Оцифрування інтенсивності сигналів на відсканованих рентгенівських плівках проводили за допомогою програми Gel Pro 3.1.

Зафіксовані тканини відмивали ЗФР та переносили у 70 % етиловий спирт з наступною дегідратацією і заливкою у парафінові блоки. Депарафінізацію 5 мкм зрізів тканини здійснювали шляхом інкубації препаративних скелець у ксилолі з наступним відмиванням та поступовою гідратацією у серії розчинів етанолу зі спадаючою концентрацією вмісту спир-

ту і дистильованій воді. Для відновлення антигензв'язуючих детермінант тканин препаративні скельця кип'ятили у 10 мМ цитратному буфері протягом 20 хв. Ендогенну пероксидазну активність нівелювали шляхом інкубації зрізів з 1 % H_2O_2 протягом 15 хв. Блокування вільних центрів зв'язування здійснювали за допомогою інкубування в 1 % розчині бичачого сироваткового альбуміну та 10 % розчині сироватки кози у ЗФР упродовж 1 год. Ендогенні авідин та біотин блокували із застосуванням набору реактивів Avidine D - Biotine blocking kit. Для детекції кислого фібрилярного білка глії (GFAP) та полі-ADP-рибозильованих білків секції інкубували з першими поліклональними анти-GFAP чи моноклональними анти-полі-ADP-рибоза антитілами у розведенні 1:500 або 1:250 у ЗФР, який містив 1 % БСА, протягом ночі при 4 °С. Після відмивання у ЗФР з 0,05 % тритоном X-100 секції інкубували з другими козячими антикролячими та козячими антимишачими антитілами, міченими біотином ("Vectors Laboratories", США). Після відмивання протягом 5 хв у ЗФР із 0,05 % тритоном X-100 та ЗФР зразки інкубували впродовж 30 хв з авідин-біотин-пероксидазним комплексом (Vector Elite kit). Кольорову реакцію по детекції позитивних сигналів проводили за допомогою 3-амінобензидину (DAB substrate-kit). Для підсилення чіткості зображення у випадку детекції полі-ADP-рибозильованих білків використовували розчин нікелю (DAB substrate-kit).

Спостереження світлової мікроскопії сітківки ока було зроблено з використанням х40 акропланового об'єктива мікроскопа Nikon Optiphot 2 ("Nikon", Японія) та відеокамери для мікроскопа (DCM310) з програмним забезпеченням (ScopePhoto). Інтенсивність сигналів на знімках визначали за допомогою програмного забезпечення ImageJ 1.32 software ("National Institutes of Health", США); результат імуногістохімічного аналізу оцінювали як $M \pm m$

для кожної експериментальної групи. З певної тканини для кожної тварини знімали 5-7 фотографій, середнє значення інтенсивності яких використовували при наступних статистичних підрахунках.

Статистичні підрахунки отриманих даних проводили загальноприйнятими методами параметричної і непараметричної варіаційної статистики. У випадку множинних співвідношень груп використовували критерії Стьюдента-Ньюмана-Кейля та багатофакторного дисперсійного аналізу ANOVA (F-значення). Дані представляли у вигляді $M \pm m$ для кожної експериментальної групи. Достовірно відмінними вважали результати при показах вірогідності $p \geq 0,95$ (рівень значимості $p < 0,05$). При статистичній обробці експериментальних даних використовували статистичні програми Origin 7.0, Biostat 2008, Excel-2003.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Після закінчення експерименту кінцева маса контрольних тварин і щурів, які споживали біле та червоне вина, збільшилась в середньому на 47 % порівняно з початком досліду (табл. 1). На відміну від контролю, маса тіла тварин у групах хворих на діабет і хворих на діабет, які споживали біле вино, незначно зменшилась (на 7 та 6 % відповідно). Разом із тим, маса тіла хворих на діабет щурів, які споживали червоне вино, достовірно ($p < 0,05$) збільшилась на 18 % порівняно з вихідними даними на момент початку експерименту. З результатів, наведених у таблиці 1, видно, що концентрація глюкози в групах хворих тварин зростала впродовж усього експерименту. Таким чином, виноградні вина не мали коригувального впливу на рівень глюкози як у контрольних, так і в діабетичних групах.

З літературних джерел відомо, що відносно високі дози ресвератролу, представника фітоалексинів, який входить в основному до

Таблиця 1 – Маса тіла і концентрація глюкози у крові контрольних та хворих на діабет щурів, які споживали червоне і біле вина ($M \pm m$, $n=5-7$)

| Група | Показники | | | |
|-------|---------------------|-------------|--------------|---------------|
| | Глюкоза у крові, мМ | | Маса тіла, г | |
| | Початкова § | Кінцева | Початкова § | Кінцева |
| К | 6,2±0,9 | 6,1±1,3 | 136,6±15,5 | 211,3±17,7 |
| К+БВ | 6,0±1,3 | 6,1±1,2 | 148,8±9,8 | 202,5±19,2 |
| К+ЧВ | 6,4±0,7 | 6,5±0,9 | 138,8±12,4 | 205,0±15,7 |
| Д | 14,5±1,4 ** | 23,2±2,4 ** | 141,0±11,7 | 131,7±12,9** |
| Д+БВ | 14,3±1,5 ** | 23,1±3,7 ** | 147,0±9,9 | 138,0±10,4** |
| Д+ЧВ | 14,1±1,7 ** | 24,4±4,8 ** | 144,0±13,9 | 170,0±15,6*.# |

Примітка. *.** – $p < 0,05$ та $p < 0,01$ відповідно проти контрольної групи; # – $p < 0,05$ проти групи щурів, хворих на діабет без споживання вина; § – 3-тя доба після індукції діабету.

складу поліфенолів червоних виноградних вин, достовірно знижують рівень глюкози до норми у щурів зі стрептозотоциніндукованим діабетом [20]. Було встановлено, що рівень ресвератролу в досліджуваних нами винах є недостатнім для зменшення глюкози в крові тварин, хворих на діабет.

Недостатність інсуліну за умов цукрового діабету 1-го типу та резистентність до нього при цукровому діабеті 2-го типу призводять до інтенсифікації глюконеогенезу в печінці (процес зазвичай заінгібований інсуліном). При цьому відбувається перетворення глюкози у сечовину, яка в результаті так званого процесу осмотичного діурезу виводиться з організму разом із необхідною для того кількістю води та електролітичних іонів K^+ і Na^+ [10]. Даний процес призводить до дегідратації організму, яка посилюється в подальшому в результаті індукції вивільнення вільних жирних кислот з адипоцитів та наступного перетворення у кетонові тіла (ацетоацетат і β -гідроксибутират), що викликає кетоацидоз. β -гідроксибутират може відігравати роль в енергетичному забезпеченні головного мозку в разі відсутності інсулініндукованого надходження глюкози до тканини і бути, таким чином, протектором від голодування, але, з іншого боку, кетонові тіла мають низьке значення рН, що в кінцевому рахунку спричиняє втрату ємності бікарбонатної буферної системи крові та посилення ацидозу. Кетонові тіла, у свою чергу, призводять до посилення осмотичного діурезу та втрати електролітів організму, що без вчасного виявлення та лікування можуть зумовлювати кетоацидозну кому і смерть [14].

Досліджуване червоне вино не знижувало рівня глюкози у крові щурів, хворих на діабет, які його споживали, але, разом із тим, забезпечувало достовірний приріст маси тіла ($p < 0,05$). Таким чином, можна стверджувати, що споживання вина мало загальний протекторний вплив на організм, попереджуючи явища дегідратації. Аналізуючи отримані результати, можна припустити, що протекція відбувалась за механізмами, незалежними від рівня глюкози у крові, ймовірно, шляхом зниження рівня кетонових тіл чи на етапі їх утилізації або виведення з організму системою клубочків і канальців нирок та стимуляції реадсорбції електролітів і води з первинної сечі. Встановлення молекулярних механізмів цих явищ потребує детального дослідження у майбутньому.

Роль потужного оксиданта – пероксинітриту – в патогенезі діабетичних ускладнень, включаючи ендотеліальні [19], периферичні та

автономні нейропатії [6], ретинопатії [8], є визначальною [6, 19]. Пероксинітрит спричиняє множинні цитотоксичні ефекти, зокрема активацію процесів перекисного окиснення ліпідів, нітросилування білків, ДНК-розриви, деполітизацію мітохондріальної мембрани, зміни у передачі клітинних сигналів, активацію PARP-1 та металопротеїназ, а також може призводити до некрозу та апоптозу [12].

Імуноблот-аналіз показав зростання вмісту нітротирозину в сітківці хворих на діабет тварин на 38 % порівняно з контролем (рис. 1). Нітрозативний стрес за умов приймання чер-

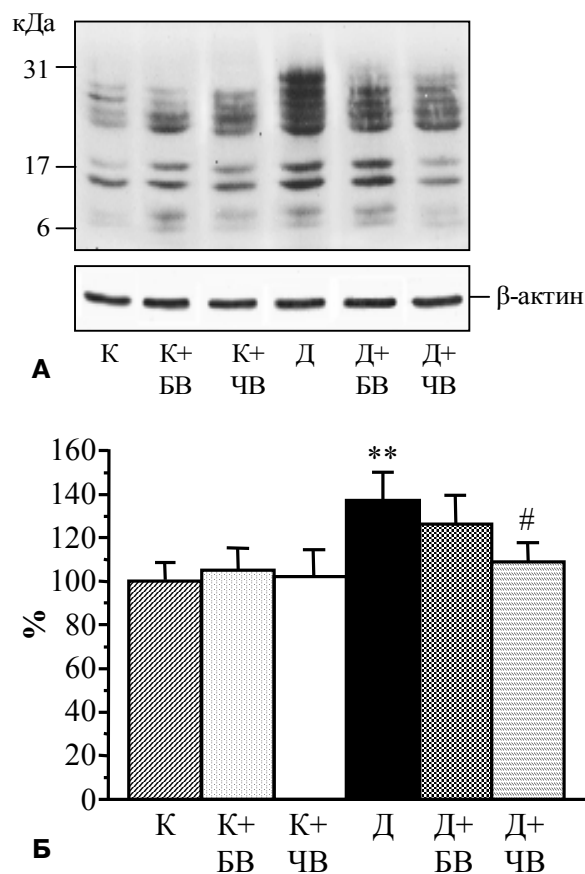


Рис. 1. Репрезентативний імуноблот-аналіз зразків сітківки ока щурів з використанням антинітротирозинових антитіл (А) та вміст нітротирозинмодифікованих білків (Б) (денситограма із застосуванням програми GelPro 3.1).

Примітка. Вміст нітротирозину в контрольній групі взято за 100 % ($M \pm m$, $n=5-7$); ** – $p < 0,01$ проти контрольної групи; # – $p < 0,05$ проти групи щурів, хворих на діабет без споживання вина.

воного вина хворими на діабет щурами частково нівелювався, і ми спостерігали відновлення рівня нітротирозину майже до рівня контролю ($p < 0,05$). Разом із тим, при споживанні білого вина тваринами, хворими на діа-

бет, мала місце лише незначна тенденція до зменшення рівня нітротирозину.

Оскільки зниження рівня пероксинітриту опосередковано через інгібування PARP-1 та альдозоредуктази (поліольний шлях) [4, 7] призводить до затримки/запобігання катарактогенезу і патологічним перетворенням у сітківці ока, можна зробити висновок, що поліфеноли червоного вина діють за подібними механізмами і, таким чином, відновлюють або стабілізують фізіологічні показники у сітківці ока шляхом зниження концентрації пероксинітриту.

Разом із тим, показано, що в окремих органах та тканинах тварин, хворих на діабет, активація PARP-1, найімовірніше, не відбувається внаслідок оксидативно-нітрозативного стресу, а є причиною його розвитку [23]. Ви-

явлено, що PARP-1 може активуватись незалежно від пошкоджень ДНК, шляхом фосфорилування кінази, регульованої зовнішньоклітинними сигналами (ERK-1) [13]. Таким чином, активація PARP-1 та оксидативно-нітрозативний стрес можуть бути взаємопідсилюючими, і визначення їх рівня є необхідним для оцінки ступеня пошкодження тканин за умов цукрового діабету. Вміст полі-(ADP)-рибозильованих білків, зафіксований на мікрофотографіях сітківки ока, зростав на 47 % у щурів, хворих на діабет, і дане зростання нівелювалося за приймання червоного вина (рис. 2). Разом із тим, біле вино призводило лише до часткового зменшення вмісту полі-(ADP)-рибозильованих білків у групі діабетичних тварин, які його споживали.

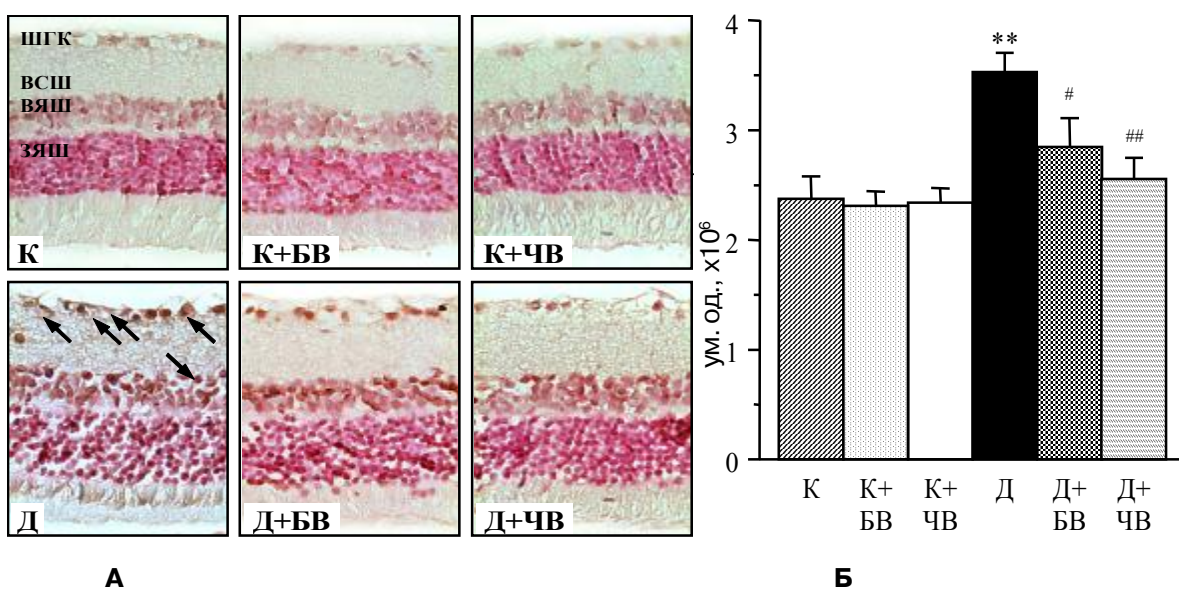


Рис. 2. Репрезентативні мікрофотографії імунофлуоресцентної мікроскопії зразків сітківки ока щурів з використанням анти-полі-(ADP)-рибози антитіл (А) та інтенсивність полі-(ADP)-рибозильованих білків (Б), виражена в умовних одиницях (ум. од.).

Примітка. Тут і на рисунку 3: ШГК – шар гангліозних клітин, ВСШ – внутрішній сітчастий шар, ВЯШ – внутрішній ядерний шар, ЗЯШ – зовнішній ядерний шар ($M \pm m$, $n=5-7$); ** – $p < 0,01$ проти контрольної групи; #, ## – $p < 0,05$ та $p < 0,01$ відповідно проти групи щурів, хворих на діабет без споживання вина.

Накопичення пероксинітриту та активація PARP-1 за умов короткотривалого (4-тижневого) стрептозотоциніндукованого цукрового діабету супроводжувались також втратою перичитів судин з наступним потовщенням стінок останніх, їх незначною дегенерацією, порушенням кровообігу в оці, зростанням гіпоксії та незначною індукцією ангіогенезу [13, 23]. Зростання вмісту кислого фібрилярного білка глії (GFAP) є маркером реактивації астроцитів та свідчить про активацію процесів ангіопатії [1]. Інтенсивність вмісту GFAP на мікрофотографіях сітківки ока зростала на 30 % у щурів, хворих на діабет, і даний показник повертав-

ся до значень норми за умов дії червоного вина (рис. 3). Разом із тим, біле вино призводило до часткового зменшення вмісту GFAP, яке мало тенденційний характер.

ВИСНОВКИ. Наші дослідження вказують на те, що вже на ранніх етапах цукрового діабету сітківка ока починає накопичувати нітротирозин та в ній активується PARP-1. Ці показники свідчать про розвиток процесів оксидативно-нітрозативного стресу, що може призводити до виникнення та розвитку ретинопатії. Поліфеноли червоного вина, порівняно з білим, володіють значним антидіабетичним ефектом, як

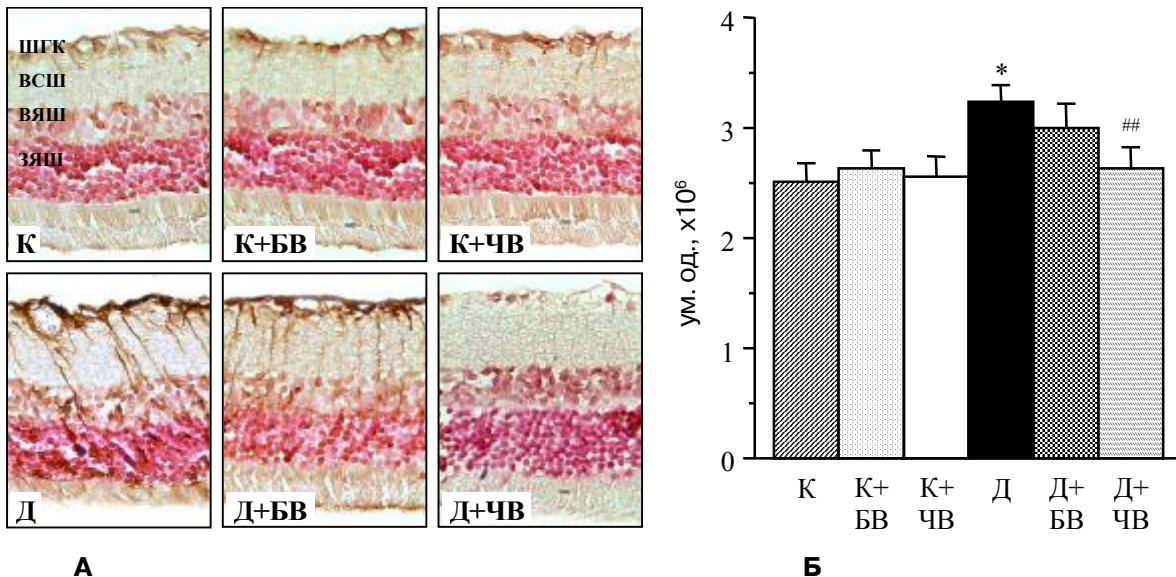


Рис. 3. Репрезентативні мікрофотографії імунофлуоресцентної мікроскопії зразків сітківки ока щурів з використанням анти-GFAP антитіл (А) та інтенсивність GFAP (Б), виражена в умовних одиницях (ум. од.).

на рівні цілого організму, захищаючи його від зневоднення, так і шляхом зниження вмісту нітритозину та полі-ADP-рибозильованих білків у сітківці ока, вже на ранніх етапах виникнення ретинопатії. Про протекторний вплив виноградних вин також свідчить факт зменшення вмісту кислого фібрилярного білка глії у хворих тварин при споживанні вин. Деталь-

не вивчення біохімічних механізмів дії поліфенолів червоних вин потребує наступних досліджень, проте, безсумнівно, як саме червоне вино, так і можливі препарати, отримані на його основі (екстракти поліфенолів), можна використовувати при лікуванні ускладнень цукрового діабету та створенні нових антидіабетичних ліків.

ЛІТЕРАТУРА

1. Asnaghi V., Gerhardinger C., Hoehn T. et al. A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat // *Diabetes*. – 2003. – **52**, № 2. – P. 506-511.
2. Crawford T.N., Alfaro D.V. 3rd, Kerrison J.B., Jablon E.P. Diabetic retinopathy and angiogenesis // *Curr. Diabetes Rev.* – 2009. – **5**, № 1. – P. 8-13.
3. Daglia M., Papetti A., Grisoli P. et al. Antibacterial activity of red and white wine against oral streptococci // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – **55**, № 13. – P. 5038-5042.
4. Drel V.R., Pacher P., Ali T.K. et al. Aldose reductase inhibitor fidarestat counteracts diabetes-associated cataract formation, retinal oxidative-nitrosative stress, glial activation, and apoptosis // *Int. J. Mol. Med.* – 2008. – **21**, № 6. – P. 667-676.
5. Drel V.R., Pacher P., Stevens M.J., Obrosova I.G. Aldose reductase inhibition counteracts nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic rat kidney and high-glucose-exposed human mesangial cells // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – **40**. – P. 1454-1465.
6. Drel V.R., Pacher P., Varenik I. et al. Evaluation

- of the peroxyxynitrite decomposition catalyst Fe(III) tetra-mesitylporphyrin octasulfonate on peripheral neuropathy in a mouse model of type 1 diabetes // *Int. J. Mol. Med.* – 2007. – **20**. – P. 783-792.
7. Drel V.R., Xu W., Zhang J. et al. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition counteracts cataract formation and early retinal changes in streptozotocin-diabetic rats // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2009. – **50**, № 4. – P. 1778-1790.
8. Du Y., Smith M.A., Miller C.M., Kern T.S. Diabetes-induced nitrosative stress in the retina, and correction by aminoguanidine // *J. Neurochem.* – 2002. – **80**. – P. 771-779.
9. Frank R.N. Diabetic retinopathy // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – **350**. – P. 48-58.
10. Gouni-Berthold I., Krone W. Diabetic ketoacidosis and hyperosmolar hyperglycemic state // *Med. Klin. (Munich)*. – 2006. – **101** (Suppl 1). – P. 100-105.
11. Jagtap P., Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2005. – **4**, № 5. – P. 421-440.
12. Kato N., Yashima S., Suzuki T. et al. Long-term

treatment with fidarestat suppresses the development of diabetic retinopathy in STZ-induced diabetic rats // J. Diabetes Complications. – 2003. – **17**. – P. 374-379.

13. Kauppinen T.M., Chan W.Y., Suh S.W. et al. Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2 // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2006. – **103**, № 18. – P. 7136-7141.

14. Kitabchi A.E., Umpierrez G.E., Fisher J.N. et al. Thirty years of personal experience in hyperglycemic crises: diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar state // Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. – 2008. – **93**, № 5. – P. 1541-1552.

15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – **227**, № 5259. – P. 680-684.

16. Marfella R., Cacciapuoti F., Siniscalchi M. et al. Effect of moderate red wine intake on cardiac prognosis after recent acute myocardial infarction of subjects with Type 2 diabetes mellitus // Diabet Med. – 2006. – **23**, № 9. – P. 974-981.

17. Montilla P., Barcos M., Munoz M.C. et al. Red wine prevents brain oxidative stress and nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats // J. Biochem. Mol. Biol. – 2005. – **38**, № 5. – P. 539-544.

18. Napoli C., Balestrieri M.L., Sica V. et al. Beneficial effects of low doses of red wine consumption on perturbed shear stress-induced atherogenesis // Heart

Vessels. – 2008. – **23**, № 2. – P. 124-133.

19. Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease // Physiol. Rev. – 2007. – **87**, № 1. – P. 315-424.

20. Palsamy P., Subramanian S. Resveratrol, a natural phytoalexin, normalizes hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide induced experimental diabetic rats // Biomed Pharmacother. – 2008. – **62**, № 9. – P. 598-560.

21. Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable // Anal. Biochem. – 1977. – **83**, № 2. – P. 346-356.

22. Rajesh M., Mukhopadhyay P., Godlewski G. et al. Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition decreases angiogenesis // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – **350**, № 4. – P. 1056-1062.

23. Szabo C., Biser A., Benko R. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors ameliorate nephropathy of type 2 diabetic Leprdb/db mice // Diabetes. – 2006. – **55**, № 11. – P. 3004-3012.

24. Tapp R.J., Shaw J.E., Harper C.A. et al. AusDiab Study Group. The prevalence of and factors associated with diabetic retinopathy in the Australian population // Diabetes Care. – 2003. – **26**, № 6. – P. 1731-1737.

25. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. 1979 // Biotechnology. – 1992. – **24**. – P. 145-149.

ПОЛИФЕНОЛЫ ВИНОГРАДНЫХ ВИН ПРЕДОТВРАЩАЮТ НАКОПЛЕНИЕ НИТРОТИРОЗИНА И АКТИВАЦИЮ PARP-1 В СЕТЧАТКЕ ГЛАЗА КРЫС С СТРЕПТОЗОТОЦИНИДУЦИРОВАННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

В.Р. Дрель¹, А.Р. Гнагуш¹, А.Я. Яланецкий², В.И. Мизин², В.А. Загоруйко²,
В.Г. Гержикова², Н.А. Сибирная¹

ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ИВАНА ФРАНКО¹
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИНСТИТУТ ВИНОГРАДА И ВИНА "МАГАРАЧ"², ЯЛТА

Резюме

Исследовано влияние полифенолов красного и белого вин на сетчатку глаза крыс с стрептозотоцинидуцированным сахарным диабетом. Установлено, что то количество полифенолов, которое есть в красном и белом винах, не влияет на концентрацию глюкозы в крови животных как контрольной группы, так и больных диабетом. Экспериментально обнаружено возрастание массы тела здоровых крыс и животных с сахарным диабетом при действии красного вина на 47 и 18 % соответственно. Показано, что активация поли-(ADP-рибозо)-полимеразы-1, одного из маркерных показателей ранних повреждений микрососудов сетчатки глаза, при сахарном диабете понижается вследствие приёма красного вина к уровню контроля. Обнаружено также, что полифенолы красного и белого вин, которые являются скавенжерами активных форм кислорода и азота, частично или полностью нормализуют уровень нитротирозинмодифицируемых белков сетчатки глаза. Полученные результаты обосновывают целесообразность применения красных вин и возможность создания препаратов полифенолов для профилактики и лечения диабетических ретинопатий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полифенолы, диабетическая ретинопатия, оксидативно-нитрозативный стресс, поли-ADP-рибозилируемые белки.

GRAPE WINE POLYPHENOLS PREVENTS NITROTYROSINE ACCUMULATIONS AND ACTIVATIONS OF PARP-1 IN THE RAT RETINA UNDER STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS

V.R. Drel¹, A.R. Hnatysh¹, A.Ya. Yalaneckyy², V.I. Mizin², V.A. Zagoruyko²,
V.H. Herzhykova², N.O. Sybirna¹

LVIV NATIONAL UNIVERSITY BY IVAN FRANKO¹
NATIONAL INSTITUTE OF GRAPE AND VINE "MAGARACH", YALTA

Summary

It was established the effects of red and white wines on the rat's retina under streptozotocin-induced diabetes mellitus. It was determined, that the polyphenols level in the both red and white wines did not change the blood glucose concentrations as in control and diabetic groups of animals. It was found also that during the experiment the body weight of control group and diabetic groups of rats with consumption of red wine was significantly increased by 47 and 18 % accordingly. It was shown that activity of poly-(ADP-ribose)-polymerase-1, the one of the early markers of retina's microvessel injury under diabetes mellitus conditions is reduced to control level after treatment with red wine. It was also revealed, that both red and white wine polyphenols, which acts as scavengers for reactive oxygen and nitrogen species are completely or partially decrease the level of nitrotyrosine modified proteins in the retina. The present results allow us to assume an important role of red wine and its polyphenols preparation in applications for prevention and treatment of diabetes retinopathy.

KEY WORDS: **polyphenols, diabetes retinopathy, oxidative-nitrosative stress, poly-ADP-ribosylated proteins.**

Отримано 10.11.2009 р.

Адреса для листування: В.Р. Дрель, Львівський національний університет імені Івана Франка, вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна.

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСКРЕЦІЇ МЕТАБОЛІТІВ СІРКИ ІЗ СЕЧЕЮ ПРИ НАВАНТАЖЕННІ ЩУРІВ СІРКОВМІСНИМИ АМІНОКИСЛОТАМИ

А.В. Мельник

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ М.І. ПИРОГОВА

Встановлено, що при одноразовому введенні метіоніну, гомоцистеїну та цистеїну в дозах 500, 200, 250 мг/кг відповідно посилюються окиснювальний, десульфуразний та кон'югаційний шляхи деградації цих амінокислот, що проявляється зростанням екскреції із сечею, відповідно, сульфатів, сульфідів та тіосульфатів і тіоефірів. При 4-тижневому введенні гомоцистеїну та цистеїну в дозах 200 і 250 мг/кг переважно активується окиснювальний шлях деградації сірковмісних амінокислот та посилюється елімінація цистеїну при одночасному зменшенні частки метаболітів десульфуразного та кон'югаційного шляхів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гомоцистеїн, метіонін, цистеїн, метаболіти сірки, сеча.

ВСТУП. Відомо, що порушення обміну сірковмісних амінокислот і, перш за все, надлишок гомоцистеїну та цистеїну є важливим фактором ризику серцево-судинних захворювань та інших патологічних станів [1]. Однак залишається невідомим, як змінюються шляхи утилізації цих амінокислот при їх надмірному надходженні в організм.

Основні шляхи катаболізму сірковмісних амінокислот наведені на рисунку 1. Метіонін після активації до S-аденозилметіоніну використовують для метилування гуанідинацетату, фосфатидилетаноламіну, норадреналіну, карнозину та численних інших субстратів. Утворений при цьому S-аденозилгомоцистеїн гідролізується до гомоцистеїну та аденозину. Гомоцистеїн з участю двох піридоксальзалежних ферментів цистатіонін-β-синтетази (КФ 4.2.1.22) та цистатіонін-γ-ліази (КФ 4.4.1.1) перетворюється на цистатіонін і цистеїн [1]. Таким чином, деградація метіоніну та гомоцистеїну пов'язана з їх перетворенням до цистеїну.

Цистеїн утилізується різноманітними шляхами [15]. Окиснення цистеїну каталізується цистеїндіоксигеназою (КФ 1.13.11.20) і призводить до утворення цистеїнсульфінату, який після трансамінування перетворюється до β-сульфінілпірувату, подальший розпад якого завершується утворенням сульфату. Цистеїнсульфінат може також перетворюватись до таурину.

Шлях десульфуровування цистеїну з участю цистатіонін-γ-ліази (КФ 4.4.1.1), цистатіонін-β-синтетази (КФ 4.2.1.22) та цистеїнаміотрансферази (КФ 2.6.1.3) призводить до утворення вазоди-

лататора H₂S [10]. Крім того, гідроген сульфід може синтезуватись з тіосульфату з участю тіосульфатсульфуртрансферази (КФ 2.8.1.5).

Цистеїн також використовують для синтезу глутатіону [15]. Останній з участю глутатіон-S-трансферази (КФ 2.5.1.18) може кон'югуватись з електрофільними метаболітами ксенобіотиків та ендогенних субстратів. Утворені глутатіонові кон'югати далі перетворюються на тіоефіри – меркаптурові кислоти, які й екскретуються із сечею [9].

Оскільки надлишок гомоцистеїну, цистеїну та метіоніну є фактором ризику ураження судин, то вивчення того, як змінюються шляхи їх утилізації за умов перевантаження організму цими амінокислотами, могло б сприяти кращому розумінню патогенетичних механізмів захворювань, асоційованих з порушеннями обміну даних амінокислот.

Метою роботи було дослідити шляхи катаболізму сірковмісних амінокислот при одноразовому та тривалому навантаженні щурів гомоцистеїном, цистеїном та метіоніном.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В експерименті використано 35 білих щурів-самців масою 150-200 г, які перебували на стандартному сухому раціоні, збалансованому за всіма нутрієнтами, виробництва НВП Ф.У.Д. (м. Київ). Досліди проведено в літній сезон, а всі процедури та маніпуляції виконували з 8 до 10 год ранку.

Гострі порушення обміну сірковмісних амінокислот викликали шляхом одноразового інтрагастрального введення щурам гомоцистеїну тіолактону в дозі 200 мг/кг, L-метіоніну - в дозі 500 мг/кг чи L-цистеїну в дозі 250 мг/кг,

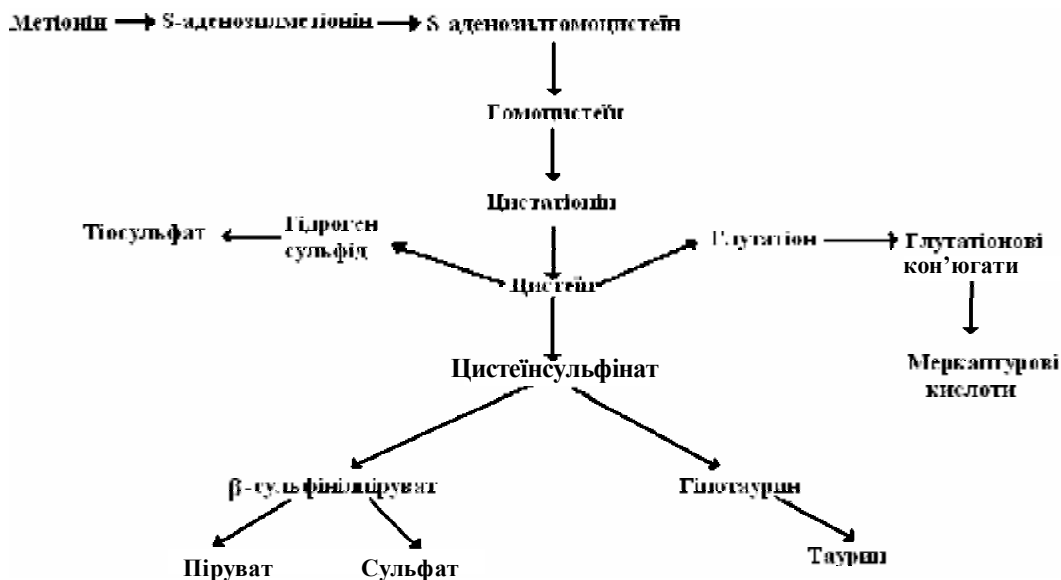


Рис. 1. Шляхи утилізації метіоніну, гомоцистеїну та цистеїну.

хронічні – щоденного (протягом 4-х тижнів) інтрагастрального введення тваринам гомоцистеїну тіолактону в дозі 200 мг/кг чи L-цистеїну в дозі 200 мг/кг. Як свідчать дані літератури, в таких дозах і при такій тривалості введення цих амінокислот у тварин розвивається гіпергомоцистеїнемія чи гіперцистеїнемія, які проявляються ураженням судин та іншими розладами [2, 8, 13]. Інтактним щурам інтрагастрально вводили воду (1 мл/100 г маси).

Сечу збирали протягом 12 год. Рівень загального цистеїну (сума цистеїну та цистину) визначали за реакцією з нінгідринним реактивом у кислому середовищі після переведення цистину в цистеїн шляхом 30-хвилинної інкубації сечі з дитіотреїтолом [6]. Вміст загальних сульфатів – за реакцією з барієвим реактивом [3] в сечі, яку попередньо піддавали кислотному гідролізу (2М соляна кислота, 100 °С, 30 хв). Вміст тіоефірів (меркаптурових кислот) визначали в сечі, яку попередньо піддавали лужному гідролізу (2М гідроксид натрію, 100 °С, 1,5 год), за приростом тіольних груп, вміст яких оцінювали за реакцією з реактивом Елмана [16]. В негідролізованій сечі визначали вміст сульфідів та тіосульфатів. Кількість сульфідів визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном [3]. Рівень тіосульфатів визначали розробленим нами ферментативним методом за каталізованою тіосульфатсульфуртрансферазою [11] реакцією перетворення тіосульфату на гідроген сульфід. Джерелом ферменту слугував пост'ядерний гомогенат печінки, інкубаційне середовище містило дитіотреїтол 2,3 мМ, трис-буфер 0,09 М (рН 8,5).

До 0,5 мл сечі додавали 0,5 мл цієї інкубаційної суміші та 2 мг білка пост'ядерного гомогенату печінки, інкубували 30 хв при 37 °С. Утворений гідроген сульфід визначали за реакцією з N,N-диметил-пара-фенілендіаміном [3]. Активність цистатіонін-γ-ліази та цистатіонін-β-синтази визначали в пост'ядерному гомогенаті нирок, як описано раніше [3, 14].

В роботі використані L-цистеїн та L-метіонін фірми "Sigma" (США), D,L-гомоцистеїн тіолактон, дитіотреїтол, піридоксальфосфат фірми "Fluka" (Німеччина). Тіосульфат натрію, сульфід натрію, N,N-диметил-пара-фенілендіамін, реактив Елмана та інші реактиви були вітчизняного виробництва. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми "MS Excel XP".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На початку дослідження ми визначили базальну екскрецію із сечею сірковмісних метаболітів (загального цистеїну, тіоефірів, сульфідів, тіосульфатів та сульфатів) у щурів, які перебували на стандартному раціоні (табл. 1). Встановлено, що у тварин із сечею найбільше екскретувалося загальних сульфатів, які склали 94,84 % від кількості всіх досліджуваних сірковмісних метаболітів. Таке переважання сульфатів над іншими метаболітами свідчило про достатньо повне окиснення сірковмісних сполук в організмі щурів до максимального ступеня окиснення (+6). Екскреція метаболітів з більш низькими ступенями окиснення сірки (тіоефірів, цистеїну, сульфідів та тіосульфатів) була невеликою і становила менше 6,0 % від за-

Таблиця 1 – **Метаболіти сірковмісних амінокислот у сечі щурів за умов одноразового введення гомоцистеїну тіолактону, L-метіоніну чи L-цистеїну (n=5, M±m)**

| Показник | | Інтактні щури | Гомоцистеїн (200 мг/кг) | L-цистеїн (250 мг/кг) | L-метіонін (500 мг/кг) |
|---------------------|-----------------------|---------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Загальний цистеїн | ммоль/моль креатиніну | 6,15±0,66 | 8,92±0,57* | 10,25±1,33* | 11,75±1,01* |
| | % | 0,52±0,04 | 0,35±0,04* | 0,29±0,02* | 0,27±0,02* |
| Тіоефіри | ммоль/моль креатиніну | 49,41±6,4 | 80,80±5,82* | 86,57±8,22* | 90,06±4,87* |
| | % | 4,33±0,61 | 3,10±0,29 | 2,50±0,13* | 2,10±0,08* |
| Сульфідиди | ммоль/моль креатиніну | 1,50±0,10 | 1,89±0,15* | 2,01±0,12* | 2,06±0,2* |
| | % | 0,13±0,01 | 0,07±0,01* | 0,06±0,01* | 0,05±0,01* |
| Тіосульфатиди | ммоль/моль креатиніну | 2,75±0,19 | 3,74±0,23* | 4,17±0,17* | 4,51±0,29* |
| | % | 0,24±0,01 | 0,15±0,02* | 0,12±0,17* | 0,10±0,01* |
| Загальні сульфатиди | ммоль/моль креатиніну | 1,10±0,05 | 2,59±0,26* | 3,39±0,30* | 4,24±0,22* |
| | % | 94,78±0,64 | 96,33±0,32* | 97,03±0,15* | 97,48±0,07* |

Примітка. Тут і в наступній таблиці:

1. Відносний вміст метаболітів вираховано у % щодо суми досліджуваних сірковмісних метаболітів.
2. * – достовірна відмінність відносно інтактних щурів (p<0,05).

гальної кількості метаболітів сірки в сечі (в тому числі частка тіоефірів, цистеїну, сульфідів і тіосульфатів складала, відповідно, 4,59, 0,55, 0,13 та 0,24 %).

Таким чином, у щурів окиснювальний шлях катаболізму сірковмісних сполук суттєво переважав над іншими, кон'югаційний шлях метаболізму кількісно перебував на другому місці (екскреція тіоефірів із сечею більш ніж на порядок менша, ніж екскреція сульфатів), а виведення сірки у вигляді цистеїну та цистину – на третьому. Найменш потужним виявився десульфуразний шлях катаболізму сірковмісних амінокислот, оскільки частка сульфідів і тіосульфатів у сечі була найменшою.

Одноразове введення тваринам гомоцистеїну, цистеїну чи метіоніну (табл. 1) викликало зростання екскреції із сечею сірковмісних спо-

лук. Зокрема, у щурів, які отримували гомоцистеїн, виведення загальних сульфатів, порівняно з контролем, зросло на 135 %, екскреція цистеїну збільшувалась на 45 %, тіоефірів – на 64 %, сульфідів – на 26 %, тіосульфатів – на 36 %. У тварин, яким вводили цистеїн, виведення загальних сульфатів зросло на 208 %, екскреція цистеїну збільшувалась на 67 %, тіоефірів – на 75 %, сульфідів – на 34 %, тіосульфатів – на 52 %. У щурів, які отримували метіонін, виведення загальних сульфатів зросло на 284 %, цистеїну – на 91 %, тіоефірів – на 82 %, сульфідів – на 37 %, тіосульфатів – на 64 %.

Який шлях деградації сірковмісних амінокислот за цих умов посилюється найбільшою мірою? Аналіз співвідношень між метаболітами показав (табл. 1), що при навантаженні щурів сірковмісними амінокислотами зроста-

Таблиця 2 – **Метаболіти сірковмісних амінокислот у сечі щурів за умов тривалого введення тіолактону гомоцистеїну чи L-цистеїну (n=5, M±m)**

| Показник | | Інтактні щури | Гомоцистеїн (200 мг/кг) | L-цистеїн (250 мг/кг) |
|---------------------|-----------------------|---------------|----------------------------|--------------------------|
| Загальний цистеїн | ммоль/моль креатиніну | 6,42±0,66 | 12,27±1,37* | 14,9±1,09* |
| | % | 0,62±0,07 | 0,58±0,04 | 0,57±0,06 |
| Тіоефіри | ммоль/моль креатиніну | 46,0±2,47 | 38,4±2,90* | 35,01±2,96* |
| | % | 4,40±0,30 | 1,85±0,13* | 1,31±0,08* |
| Сульфідиди | ммоль/моль креатиніну | 1,60±0,09 | 1,22±0,11* | 1,66±0,11 |
| | % | 0,15±0,012 | 0,06±0,003* | 0,06±0,002* |
| Тіосульфатиди | ммоль/моль креатиніну | 2,85±0,15 | 2,38±0,09* | 2,99±0,23 |
| | % | 0,27±0,02 | 0,12±0,01* | 0,11±0,01* |
| Загальні сульфатиди | моль/моль креатиніну | 1,00±0,04 | 2,03±0,11* | 2,63±0,17* |
| | % | 94,56±0,32 | 97,39±0,13* | 97,95±0,12* |

ла лише відносна частка сульфатів, а частка цистеїну, тіоефірів, сульфідів та тіосульфатів навіть дещо знижувалась (хоча в абсолютних вимірах їх екскреція зростала). Тобто при одноразовому навантаженні тварин сірковмісними амінокислотами найбільшою мірою посилювався окиснювальний шлях їх метаболізму.

Встановлено, що 4-тижневе введення щурів гомоцистеїну призводило до зростання (порівняно з контролем) екскреції із сечею сульфатів на 103 %, цистеїну – на 91 %, але викликало вірогідне зниження екскреції тіоефірів на 12 %, сульфідів – на 24 % та тіосульфатів – на 16 % (табл. 2). При цьому частка сульфатів у сечі збільшувалась, цистеїну – не змінювалась, а тіоефірів, сульфідів та тіосульфатів – зменшувалась у 2,4, 1,3 і 2,3 рази відповідно.

У щурів, які отримували цистеїн протягом 4-х тижнів, порівняно з інтактними тваринами, виведення загальних сульфатів зростало на 163 %, цистеїну – на 132 %. Разом із тим, екскреція тіоефірів знижувалась на 13 %, а виведення сульфідів та тіосульфатів достовірно не змінювалось. Відносна частка сульфатів зростала, цистеїну – не змінювалась, а тіоефірів, сульфідів та тіосульфатів – достовірно зменшувалась.

Отримані нами дані свідчать про те, що при гострому навантаженні щурів сірковмісними амінокислотами відбувалось як посилення окиснювального, кон'югаційного та десульфуразного шляхів деградації цих амінокислот, так і зростання частки цистеїну, яка екскретувалась із сечею в неметаболізованому вигляді. Найбільшою ємністю характеризувався окиснювальний шлях деградації амінокислот, а кон'югаційний і десульфуразний шляхи мали обмежені можливості для руйнування надлишкової кількості сірковмісних амінокислот.

Низька пропускна здатність кон'югаційного та десульфуразного шляхів деградації сірковмісних амінокислот особливо чітко проявилась при тривалому введенні гомоцистеїну та цистеїну. Якщо екскреція із сечею сульфатів та цистеїну за цих умов зростала, що свідчить про посилення окиснювального шляху метаболізму амінокислот та їх виведення у вигляді неметаболізованого цистеїну, то активність десульфуразного шляху або не підвищувалась (при введенні цистеїну), або гальмувалась (при введенні гомоцистеїну). Зокрема, в щурів на фоні навантаження цистеїном не відбувалося посилення екскреції сульфідів та тіосульфатів, а на фоні навантаження гомоцистеїном виведення даних метаболітів навіть зменшувалось. Активність кон'югаційного шляху деградації амінокислот галь-

мувалась як за умов тривалого введення гомоцистеїну, так і при введенні цистеїну, про що свідчило зниження екскреції тіоефірів.

Вищенаведені дані свідчать про те, що тривале введення гомоцистеїну та цистеїну здатне порушувати звичайні співвідношення між шляхами деградації цих амінокислот. Несприятливим наслідком тривалого перевантаження організму цими амінокислотами є пригнічення десульфуразного шляху їх обміну, адже саме такий шлях постачає вазодилатори – гідроген сульфід та діоксид сірки [5, 10]. Зменшення утворення гідроген сульфідів та діоксиду сірки деякою мірою може пояснити, чому гіпергомоцистеїнемія та гіперцистеїнемія викликають вазоконстрикцію [1, 12].

Безпосередньою причиною гальмування десульфуразного шляху обміну сірковмісних амінокислот може стати пригнічення активності ферментів цього шляху – цистатіонін-β-синтази і цистатіонін-γ-ліази. В дослідях *in vitro* встановлено, що каталізовані даними ферментами реакції десульфурування цистеїну та конденсації гомоцистеїну з цистеїном у нирках інгібувались надлишком цистеїну і гомоцистеїну відповідно (рис. 2). При цьому концентрації цистеїну та гомоцистеїну, при яких наставало інгібування продукції H₂S, перебували в одному порядку, що і звичайні рівні гомоцистеїну та цистеїну в тканинах організму. Можна думати, що при гострому перевантаженні гомоцистеїном, цистеїном та метіоніном саме субстратне інгібування і є головною причиною обмеження потоку метаболітів по десульфуразному шляху. Разом із тим, при хронічному перевантаженні щурів гомоцистеїном та цистеїном до субстратного інгібування, очевидно, приєднується ще і суїцидальне. Зокрема, відомо [4, 7], що в процесі каталітичного циклу цих ферментів утворюються реакційно-здатні інтермедіати (персульфіди, політіонати, нестабільні епісульфонієві та тіолатні іони й ін.), які ковалентно модифікують молекули ферментів і спричиняють їх інактивацію.

Таким чином, наслідком перевантаження щурів сірковмісними амінокислотами є порушення співвідношень між шляхами їх метаболізму. Пригнічення десульфуразного шляху обміну сірковмісних амінокислот може слугувати причиною зменшення продукції вазодилаторуючих молекул і відігравати патогенетичну роль у формуванні судинних розладів при гіпергомоцистеїнемії та гіперцистеїнемії.

ВИСНОВКИ. 1. При одноразовому введенні гомоцистеїну, метіоніну та цистеїну активують-

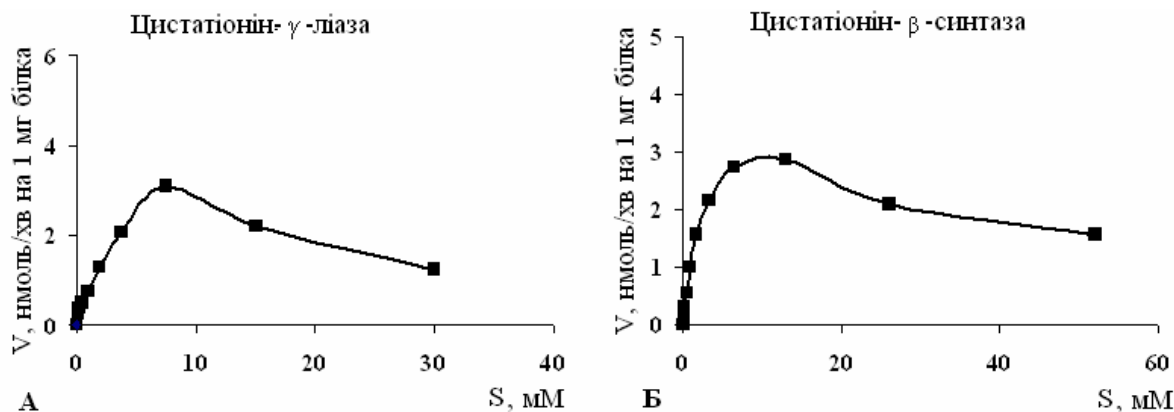


Рис. 2. Кінетика утворення гідроген сульфиду в реакції десульфування цистеїну (А) та в реакції конденсації цистеїну з гомоцистеїном (Б).

ся окиснювальний, кон'югаційний та десульфуразний шляхи катаболізму цих амінокислот, що підтверджується зростанням екскреції із сечею, відповідно, сульфатів, тіоефірів, сульфідів та тіосульфатів.

2. Тривале введення гомоцистеїну та цистеїну викликає активацію окиснювального шляху деградації цих амінокислот (про що свідчить зростання екскреції із сечею сульфатів), поси-

лення елімінації із сечею неметаболізованого цистеїну, але пригнічення кон'югаційного шляху їх метаболізму (на що вказує зниження екскреції тіоефірів). Тривале введення цистеїну не впливає на екскрецію сульфідів та тіосульфатів, тоді як тривале введення гомоцистеїну спричиняє пригнічення десульфуразного шляху метаболізму, зокрема зниження екскреції сульфідів та тіосульфатів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пентюк О.О., Луцьок М.Б., Андрушко І.І., Поставітенко К.П. Метаболізм гомоцистеїну та його роль у патології // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, № 1. – С. 5-17.
2. Пентюк О.О., Луцьок М.Б., Артемчук М.А. та ін. Доклінічні дослідження гіпергомоцистеїнемічної дії потенційних лікарських засобів: Методичні рекомендації. – К., 2007. – 30 с.
3. Уильямс У.Дж. Определение анионов: Справочник: Пер. с англ. – М.: Химия, 1982. – 624 с.
4. Anders M.W. Chemical toxicology of reactive intermediates formed by the glutathione-dependent bioactivation of halogen-containing compounds // Chem Res Toxicol. – 2008. – **21**, № 1. – P. 145-159.
5. Du S.X., Jin H.F., Bu D.F. et al. Endogenously generated sulfur dioxide and its vasorelaxant effect in rats // Acta Pharmacol Sin. – 2008. – **29**, № 8. – P. 923-930.
6. Gaitonde M.K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids // Biochem. J. – 1967. – **104**, № 2. – P. 627-633.
7. Iciek M., Wiodek L. Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur // Pol J Pharmacol. – 2001. – **53**, № 3. – P. 215-225.
8. Kim Y.G., Kim S.K., Kwon J.W. et al. Effects of cysteine on amino acid concentrations and transsulfuration enzyme activities in rat liver with protein-calorie malnutrition // Life Sci. – 2003. – **72**, № 10. – P. 1171-1181.
9. Lash L.H. Role of renal metabolism in risk to toxic chemicals // Environ Health Perspect. – 1994. – **102**, № 11. – P. 75-79.
10. Jowicka E., Beitowski J. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists // Pharmacological Reports. – 2007. – **59**, № 1. – P. 4-24.
11. Papenbrock J., Schmidt A. Characterization of a sulfurtransferase from Arabidopsis thaliana // Eur J Biochem. – 2000. – **267**, № 1. – P. 145-154.
12. Parodi O., De Chiara B., Baldassarre D. et al. Plasma cysteine and glutathione are independent markers of postmethionine load endothelial dysfunction // Clin Biochem. – 2007. – **40**, № 3-4. – P. 188-193.
13. Stangl G.I., Weisse K., Dinger C. et al. Homocysteine thiolactone-induced hyperhomocysteinemia does not alter concentrations of cholesterol and SREBP-2 target gene mRNAs in rats // Exp. Biol. Med (Maywood). – 2007. – **232**, № 1. – P. 81-87.
14. Stipanuk M.H., Beck P.W. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat // Biochem. J. – 1982. – **206**, № 2. – P. 267-277.
15. Stipanuk M.H., Dominy JE Jr, Lee J.I. et al. Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism // J. Nutr. – 2006. – **136**, № 6. – P. 1652-1659.
16. Vainio H., Savolainen H., Kilpikari I. Urinary thioether of employees of a chemical plant // Br J Ind Med. – 1978. – **35**, № 3. – P. 232-234.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСКРЕЦИИ МЕТАБОЛИТОВ СЕРЫ С МОЧОЙ ПРИ НАГРУЗКЕ КРЫС СЕРОСОДЕРЖАЩИМИ АМИНОКИСЛОТАМИ

А.В. Мельник
ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА

Резюме

Однократное введение метионина, гомоцистеина и цистеина в дозах 500, 200 и 250 мг/кг соответственно вызывает активацию окислительного, десульфуразного и конъюгационного путей деградации этих аминокислот, что подтверждается увеличением экскреции с мочой, соответственно, сульфатов, сульфидов и тиосульфатов, а также тиоэфиров. При 4-недельном введении гомоцистеина и цистеина в дозах 250 и 500 мг/кг активируется преимущественно окислительный путь деградации серосодержащих аминокислот и усиливается элиминация цистеина при одновременном уменьшении доли метаболитов десульфуразного и конъюгационного путей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **гомоцистеин, метионин, цистеин, метаболиты серы, моча.**

RESEARCH OF EXCRETION OF SULFUR METABOLITES WITH URINE AT LOADING SULFUR-CONTAINING AMINO ACID OF RATS

A.V. Melnik
VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY M.I. PIROGOV

Summary

A single administration of methionine, homocysteine and cysteine in doses 500, 200 and 250 mg/kg, accordingly, initiated the activation of oxidative, desulfurative and conjugative pathways of their degradation. The illustration of it is the increase of urinary excretion of sulfates, thioethers, sulfides and thiosulfates, accordingly. After four weeks of homocysteine and cysteine administrations in doses 200 and 250 mg/kg, mainly oxidative pathway of degradation of sulfur-containing amino acid is activated and cysteine elimination is increased, simultaneously a percentage of metabolites desulfur(iz)ative and conjugative pathways are decreased.

KEY WORDS: **homocysteine, methionine, cysteine, urine, metabolites of sulfur.**

Отримано 19.05.2009 р.

Адреса для листування: А.В. Мельник, Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21018, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ВСМОКТУВАННЯ, ТРАНЗИТ ТА РЕАБСОРБЦІЯ ¹⁴C-БУТАНОЛУ В ОРГАНІЗМІ БЛИХ МИШЕЙ

М.Я. Головенко, І.Ю. Борисюк, О.Б. Ліхота
 ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О.В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, ОДЕСА

Результати дослідів показали, що бутанол всмоктується в тонкій, товстій та прямій кишках. Надходження ¹⁴C-бутанолу в кров після інтрагастрального введення супроводжується його транспортом вздовж шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Отримані результати свідчать про значну швидкість надходження сполуки та її метаболітів у всі відділи ШКТ, що, у свою чергу, призводить до швидкого розподілу в організмі експериментальних тварин.

Показано, що при внутрішньовенному введенні ¹⁴C-бутанолу спостерігається його проникнення в різні відділи ШКТ (шлунок, тонка, товста, пряма кишки). Зроблено висновок про можливість реабсорбції бутанолу в процесі його всмоктування в ШКТ і продемонстровано його зв'язок з процесами всмоктування і транзиту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ¹⁴C-бутанол, всмоктування, транспорт, реабсорбція.

ВСТУП. Серед чотирьох ізомерів бутанолу 1-бутанол широко використовують як інгредієнт і ароматичний компонент у парфумерії [9], для отримання натуральних барвників, масел, фенолів, олігосахаридів [14] і як розчинник для фарб, покриттів, натуральних і синтетичних гум [6, 9], як проміжний продукт у виробництві бутилацетату, ефірів та гербіцидів [6, 9]. Застосовують його також як агент в текстильній промисловості, компонент гальмівної рідини, мийних засобів [11, 13], покриття скла [5], екстрагент у виробництві антибіотиків, гормонів і вітамінів [6, 9, 19], в системах деревообробки [4]. Поряд із такими сполуками, як бутилацетат, бутиральдегід та масляна кислота, 1-бутанол використовують у хімічній промисловості в окисно-відновних реакціях.

З огляду на це, в токсикології та фармакології значну увагу приділяють кінетичним показникам всмоктування, розподілу та елімінації бутанолу в організмі експериментальних тварин і людини, оскільки вони дозволяють визначити їх роль в механізмах біологічної токсикації/детоксикації речовини та створити моделі, що уможливають прогнозування токсичної дії сполуки.

Вважається доведеним [10, 15, 17], що бутанол всмоктується безпосередньо крізь шкіру, шлунково-кишковий тракт (ШКТ) та легені. Метаболізм сполуки каталізується алкогольдегідрогеназою з утворенням масляного альдегіду, який, у свою чергу, перетворюється в альдегіддегідрогеназній реакції в масляну кислоту [17]. Серед мінорних метаболітів ферментативного перетворення бутанолу зустрі-

чаються такі кислоти: масляна, кротонова, β-оксимасляна, ацетооцтова та оцтова [18].

1-бутанол є попередником масляної кислоти, тобто одним із представників коротколанцюжкових жирних кислот [18]. Їх натуральне походження бере початок з некрохмальних полісахаридів, які після проходження в тонкій кишці піддаються ферментуванню анаеробними бактеріями в товстій з утворенням оцтової, пропіонової та масляної кислот. Їх загальна концентрація складає 60-150 ммоль відповідно у пропорції 60-70, 15-20 та 10-15 % [16].

Отже, значна частина бутанолу в організмі утворює масляну кислоту, яка є компонентом живлення епітеліальних клітин кишечника (особливо вистілки товстої кишки), що забезпечує їх проліферацію [3], необхідність вивчення транспортних процесів бутанолу в ШКТ стає очевидним. Зазначене дає можливість розробити та використовувати спосіб фармакологічної корекції пошкодження поверхні кишечника.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. ¹⁴C-Бутанол (3,2 Кю/моль) вводили мишам (22-24 г) внутрішньовенно (5 ммоль/кг) та інтрагастрально (5, 10 і 20 ммоль/кг) в розчині 0,9 % NaCl за проміжки часу (0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4 і 6 год) до відбору біологічного матеріалу (плазма крові, ділянки ШКТ). Тварин утримували в умовах вільного доступу до води і добової депривації їжі. Для відбору біологічного матеріалу мишей попередньо наркотизували і декапітували, збираючи кров у гепаринізовані центрифужні пробірки. Визначення вмісту радіоактивного матеріалу в плазмі крові (4 тис. об./хв, 15 хв) проводили, відбираючи аліквоту (0,2 см³) в

© М.Я. Головенко, І.Ю. Борисюк, О.Б. Ліхота, 2010.

сцинтиляційні флакони, додаючи 0,5-1 см³ три-тону X-100, 10 см³ толуольно-спиртового сцинтилятора. Вміст радіоактивного матеріалу у відділах ШКТ (шлунок, тонка, товста і пряма кишки) визначали після попереднього розчинення в 1 см³ мурашиної кислоти на водяній бані (об'єм відібраної аліквоти – 0,2 см³). Жовчний міхур відокремлювали від печінки шляхом накладання лігатури, після чого поміщали у флакони і проколювали голкою для вивільнення вмісту. Кількість радіоактивного матеріалу в пробах визначали на рідинному сцинтиляційному фотометрі Canberra PACKARD TRI CARB 2700. Дані представлено як 10⁴ імп/хв/мл (г), що стосується жовчного міхура, то розрахунки проводили на його об'єм та обробляли за допомогою статистичного пакета програм MS Excel.

Білих мишей утримували відповідно до Правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Використання бутанолу в наших дослідженнях зумовлене тим, що ця сполука не розчиняється в олії та жирах, але, як і вода, добре проникає кризьклітинним шляхом у системний кровотік. Молекула бутанолу має незначний заряд, тому після всмоктування досить легко розподіляється у відповідних органах і тканинах. Концентрація бутанолу та його метаболітів швидко збільшується, доки не досягне рівня його концентрації у крові. Елімінація спирту здійснюється шляхом метаболізму (бутанол → масляний альдегід → масляна кислота) – 95 % та екскреції (ренальної та з повітрям, що видихається) – 2,8 % [12].

Всмоктування препаратів у ШКТ включає такі основні шляхи перенесення речовини: 1) міжклітинний (парацелюлярний); 2) кризьклітинний (трансцелюлярний). Вони відбуваються завдяки простій дифузії, а кризьклітинний – ще й за допомогою переносників. Цей процес залежить від низки фізіологічних або хімічних факторів. Одними з головних чинників, що дають можливість прогнозувати механізм проникнення сполуки міжклітинним або кризьклітинним шляхом у процесі всмоктування, є будова та деякі фізико-хімічні характеристики сполуки.

Теоретично можна припустити, що проникнення бутанолу в кров здійснюється міжклітинним шляхом. Про це свідчать такі факти: 1) молекулярна маса – 74,12 (для кризьклітинного транспорту даний показник повинен мати значення, більше 190); 2) добре розчиняється у воді; 3) рКа 15,9 [2]; 4) є аліфатичним спиртом, а етиловому спирту притаманна міжклітинна дифузія.

Всмоктування бутанолу.

Отримані результати (рис. 1) демонструють високу швидкість надходження ¹⁴C-бутанолу в плазму крові при всіх схемах його інтрагастрального введення, і його максимальна концентрація досягається за 5 хв досліді, відмічено дозозалежне надходження спирту в кров. У експериментальних тварин, яким було введено 5 та 10 ммоль/кг сполуки, спостерігається двофазний характер процесу елімінації з крові, де швидка її фаза триває приблизно 1 год, а потім має місце стаціонарна фаза, де елімінація ¹⁴C-бутанолу з плазми крові відбувається з майже постійною швидкістю. При надмірній концентрації (20 ммоль/кг) пік максимальної концентрації припадає на 2 год експозиції. Зареєстроване зниження концентрації ¹⁴C-бутанолу в плазмі крові у всіх випадках свідчить про досить високу швидкість розподілу в організмі експериментальних тварин.

У роботі [7] було відмічено, що 1-бутанол швидко елімінує з крові щурів. Після перорального введення дози 2000 мг/кг максимальна концентрація 500 мг/л в крові була досягнута через 2 год, а вже через 4 год концентрація знизилась до 150 мг/л. Це підтверджують отримані нами результати.

Фармакокінетичні параметри проникнення та елімінації бутанолу з плазми крові представлено в таблиці 1. Двофазний характер розподілу бутанолу при внутрішньовенному введенні підтверджено високим значенням об'єму розподілу периферичної камери ((418±123) см³/кг). Окрім того, відсутність петлі гістерезису дає можливість віднести плазму крові до центрального відсіку кінетичної схеми, припускаючи лінійність фармакокінетичних процесів, що перебігають. Дещо великий об'єм розподілу периферичної камери при інтрагастральному введенні ((4291±1177) см³/кг) для плазми крові зумовлений, можливо, більш рівномірним розподілом бутанолу в організмі експериментальних тварин при даному способі введення і меншою швидкістю елімінації з центральної камери (k₁₃ складає (0,162±0,053) год⁻¹). Також досить великий стаціонарний об'єм розподілу бутанолу (приблизно (535±351) см³) при внутрішньовенному введенні вказує на високий ступінь його надходження в периферичний відсік організму. Це підтверджено і константою надходження із центральної камери в периферичну (k₁₂ становить для плазми крові (2,20±1,116) і (3,22±1,502) год⁻¹ при внутрішньовенному та інтрагастральному введенні відповідно). Разом із тим, обмін між центральною та периферичною камерами перебігає досить інтенсивно (константа переходу бутанолу для плазми

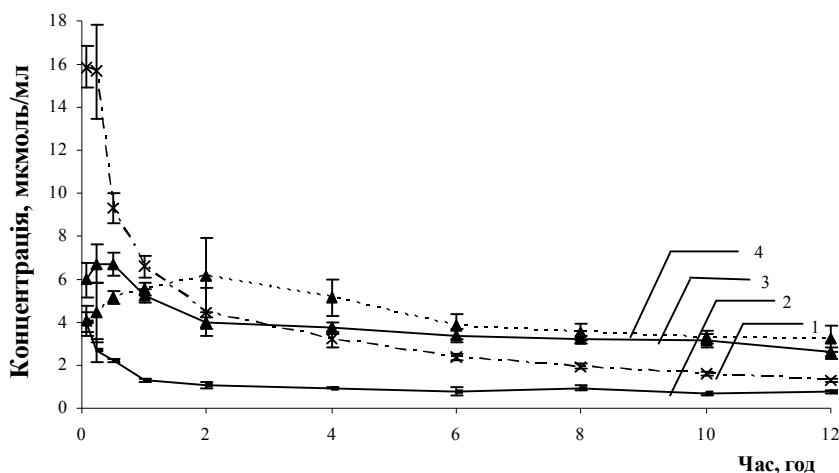


Рис. 1. Вміст загального радіоактивного матеріалу в плазмі крові при:
1 – внутрішньовенному введенні 5 ммоль/кг, 2-4 – інтрагастральному введенні ¹⁴С-бутанолу (5, 10, 20 ммоль/кг відповідно).

крові з периферичної камери в центральну k_{21} складає $(0,683 \pm 0,200)$ год⁻¹ при внутрішньовенному введенні й $(0,693 \pm 0,186)$ год⁻¹ при інтрагастральному. Процес елімінації бутанолу з організму перебігає з досить високою швидкістю при інтрагастральному введенні (період напіввведення $t_{\beta 1/2}$ становить $(16,77 \pm 2,18)$ год) і в три рази швидше при внутрішньовенному введенні. Визначений позамоделним методом (методом статистичних моментів) середній час перебування (MRT) бутанолу в організмі при внутрішньовенному введенні складає приблизно 7 год, тоді як при інтрагастральному – приблизно 23 год. При співвідношенні площ під кривими “концентра-

ція–час” за умов внутрішньовенного та інтрагастрального введення було встановлено, що в плазму крові надходить до 60 % введеної дози. Також, зіставляючи площі під фармакокінетичними кривими, нами було відмічено різницю при внутрішньовенному та інтрагастральному введенні. З огляду на отримані результати, припускається можливість метаболізму бутанолу в кишечнику експериментальних тварин.

Транзит бутанолу вздовж ШКТ.

З метою підтвердження нашого припущення про механізм двофазної абсорбції ¹⁴С-бутанолу було проведено дослідження його транспорту (транзиту) вздовж ШКТ (рис. 2). При інтрагастральному введенні сполуки в дозах

Таблиця 1 – Кінетичні параметри проникнення та елімінації ¹⁴С-бутанолу залежно від концентраційного градієнта в системі ШКТ–кров

| Фармакокінетичний параметр | внутрішньовенно 5 ммоль/кг | інтрагастрально 5 ммоль/кг |
|--|-------------------------------|-------------------------------|
| Константа швидкості перенесення з периферичної камери в центральну, k_{21} , год ⁻¹ | $0,683 \pm 0,200$ | $0,693 \pm 0,186$ |
| Константа швидкості перенесення з центральної камери в периферичну, k_{12} , год ⁻¹ | $2,2 \pm 1,116$ | $3,22 \pm 1,502$ |
| Константа елімінації з центральної камери, k_{13} , год ⁻¹ | $0,395 \pm 0,142$ | $0,162 \pm 0,053$ |
| Кінетичний об'єм розподілу, V_c , см ³ /кг | 127 ± 27 | 1096 ± 216 |
| Стаціонарний об'єм розподілу, V_{dss} , см ³ /кг | 535 ± 351 | 6196 ± 3744 |
| Загальний кліренс, Cl_{zar} , см ³ /год·кг | 50 ± 34 | 177 ± 110 |
| Період напіврозподілу, $t_{\alpha 1/2}$, год | $0,308 \pm 0,03$ | $0,256 \pm 0,04$ |
| Період напівелімінації, $t_{\beta 1/2}$, год | $5,78 \pm 1,04$ | $16,77 \pm 2,18$ |
| Площа під кривою, AUC_{zar} , мкмоль/см ³ ·год | $50,95 \pm 10,12$ | 170387 ± 15216 |
| Середній час утримання, MRT, год | $7,4 \pm 2,03$ | $23,65 \pm 5,49$ |
| Біодоступність, F | | $0,6 \pm 0,15$ |

5, 10 та 20 ммоль/кг відмічено дозозалежний вміст радіоактивного матеріалу в окремих ділянках ШКТ. Найбільшу концентрацію зареєстровано в шлунку тварин, де протягом досліду відбувалися елімінація та транспорт у

відповідні відділи кишечника. Так, у шлунку високий вміст ¹⁴С-бутанолу відмічено через 5 хв досліду, з часом він знижується до стаціонарного рівня (2-12 год. досліду). Однак треба відзначити, що найбільша концентрація

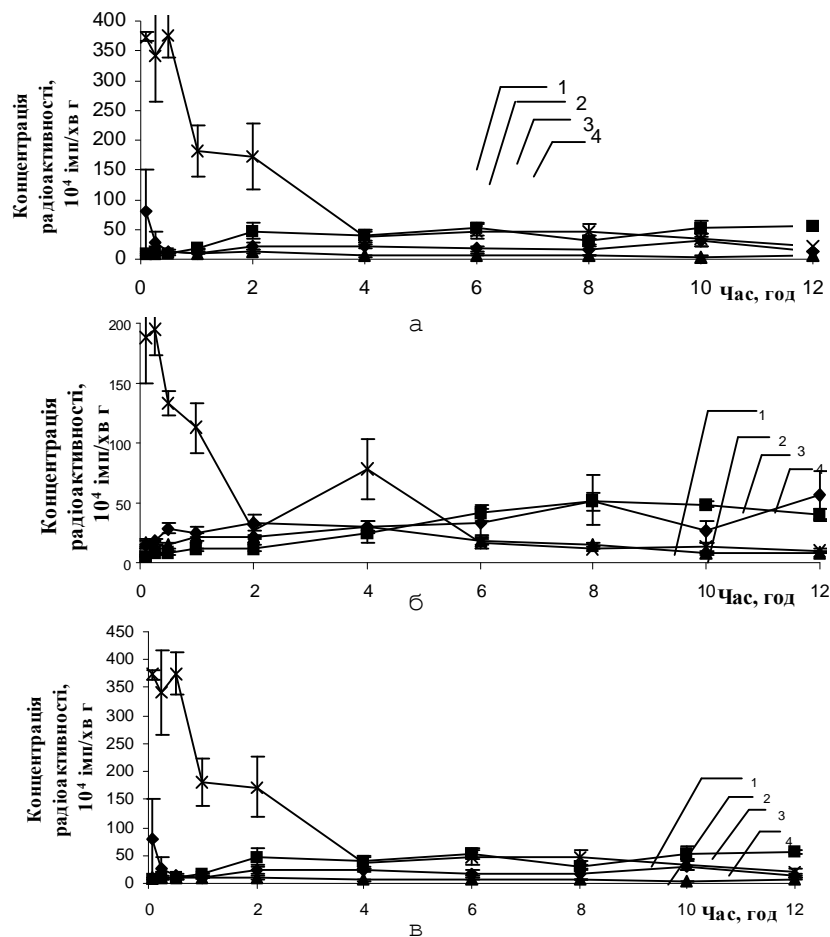


Рис. 2. Вміст загальної радіоактивності у відділах ШКТ (1 – шлунок, 2 – тонка кишка, 3 – товста кишка, 4 – пряма кишка) при інтрагастральному введенні ¹⁴С-бутанолу (а – 5 ммоль/кг, б – 10 ммоль/кг, в – 20 ммоль/кг).

¹⁴С-бутанолу має місце при концентрації 5 ммоль/кг, а найменша – 20 ммоль/кг, що підтверджує можливість всмоктування саме шляхом простої дифузії. Рівномірність концентрацій в тонкій кишці з максимумом через 1 год свідчить про постійну швидкість надходження спирту в цей відділ кишечника. Для товстої та прямої кишок через 1 год спостерігається достовірне підвищення концентрації радіоактивного матеріалу, що дозволяє припустити високу швидкість надходження метаболітів у ці відділи ШКТ. У всіх, без винятку, випадках на частку товстої та прямої кишок припадає більша частина радіоактивного матеріалу, що реєструвалася в кишечнику. Отже, крім тонкої кишки, товсту та пряму кишки можна віднести до альтернативних “вікон всмоктування” бутанолу. Останній показник є дуже важливим при інтерпретації даних щодо подвійних піків сполук та їх метаболітів у плазмі крові [1].

У дослідях на кролях [8] було встановлено, що аліфатичні спирти (до яких належить і бутанол) метаболізують і виводяться з організму шляхом:

1) окиснення і виведення продуктів (кислот, альдегідів, кетонів і вуглекислого газу) із сечею та повітрям, що видихається;

2) зв'язування у вигляді глюкуроніду чи сульфату й елімінації продуктів із сечею;

3) елімінації незмінного спирту з повітрям, що видихається, чи із сечею.

Реабсорбція бутанолу.

Метаболізм бутанолу в організмі, а також розподіл його і метаболітів в окремих відділах кишечника можуть призвести до перевищення концентрацій в циркулюючій крові відносно вмісту в ШКТ. Згідно із законом Фіка, наявність високої концентрації в одному відсіку (плазма крові) сприяє появі та її вирівнюванню в іншому, наприклад у ШКТ. З метою перевірки цього припущення ми створили високі концентрації бутанолу в крові на фоні відсутності його в ШКТ (внутрішньовенне введення).

За вмістом бутанолу в різних відділах ШКТ при його внутрішньовенному введенні (рис. 3) їх можна розташувати таким чином: пряма кишка > товста кишка > тонка кишка > шлунок. Згідно з концепцією “вікно всмоктування”,

найбільший вміст сполуки зареєстровано в прямій кишці. При інтрагастральному введенні концентраційний градієнт може виникнути тільки в особливих умовах, якими є патологічні. Зіставлення концентрацій сполуки в плазмі крові й шлунку у визначенні відрізки часу досліджу підтверджує наявність процесу реабсорбції (кров → ШКТ).

Зазначимо, що процес реабсорбції залежить від багатьох факторів: ступеня зв'язування з білками сироватки крові, об'єму розподілу, ліпофільності, рKa, молекулярного розміру молекули й інтенсивності потоку крові в судинах травного каналу. Наявність радіоактивного матеріалу в різних відділах ШКТ при внутрішньовенному введенні ^{14}C -бутанолу мишам може бути опосередкована також і “кишково-

печінковою” циркуляцією. Не виключена можливість, що і в нашому випадку значний вміст радіоактивного матеріалу в кишечнику мишей є наслідком його проникнення у жовчний міхур (рис. 4), тобто сполука бере участь в “кишково-печінковій” циркуляції. Незважаючи на деякі відмінності кривих, що характеризують кінетику масопереносу сполуки, слід відмітити дозозалежне надходження її у жовчний міхур після інтрагастрального введення, що зумовлено значною кількістю бутанолу в крові (див. рис. 1). Порівняння вмісту бутанолу в жовчному міхурі та окремих відділах ШКТ дає можливість припустити, що “кишково-печінкова” циркуляція сполуки та її метаболітів є суттєвою складовою, але не вирішальною в процесі транспорту (реабсорбції).

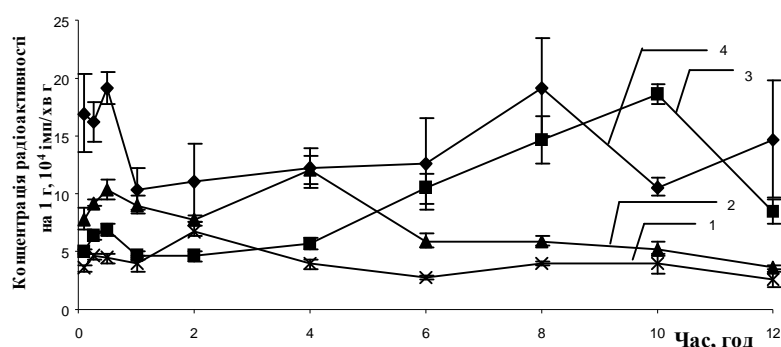


Рис. 3. Вміст радіоактивного матеріалу у відділах ШКТ при внутрішньовенному введенні ^{14}C -ацетату в дозі 5 ммоль/кг (1 – шлунок, 2 – тонка кишка, 3 – товста кишка, 4 – пряма кишка).

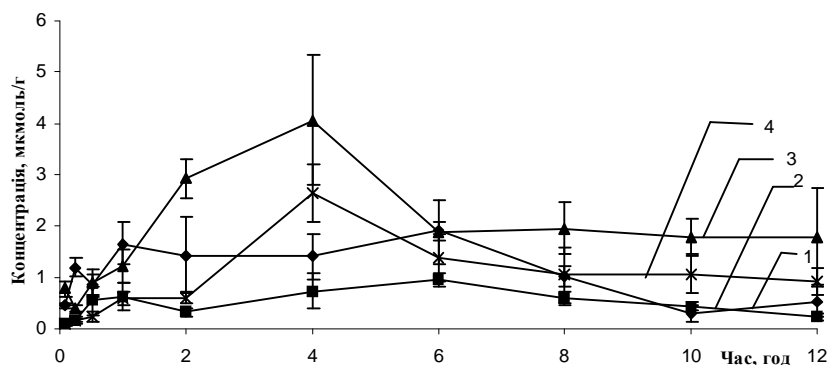


Рис. 4. Вміст загальної радіоактивності у жовчному міхурі при: 1 – внутрішньовенному введенні 5 ммоль/кг, 2-4 – інтрагастральному введенні ^{14}C -бутанолу (5, 10, 20 ммоль/кг відповідно).

ВИСНОВОК. При обговоренні даних щодо всмоктування ксенобіотиків у ШКТ необхідно враховувати механізми такого всмоктування (транзит та реабсорбцію), що зумовлює не-

обхідність доповнення відповідними показниками токсикокінетичних характеристик ксенобіотиків. Особливо це стосується фізіологічних кінетичних моделей.

ЛІТЕРАТУРА

1. Головенко М., Борисюк І. Концепція “вікно всмоктування” в загальній фармацевтичній стратегії // Вісник фармакології та фармацевції. – 2008. – №3. – С. 43-49.
2. Тюкавкина Н.А., Бауков Ю.И. Биоорганическая химия. – М.: Медицина, 1991. – 528 с.

3. Хотимченко Ю.С., Ермак И.М., Бедняк А.Е. и др. // Вестник ДВО РАН. – 2005. – № 1. – С. 72.
4. Amundsen J., Goodwin R.J., Wetzel W.H. Water-soluble pentachlorophenol and tetrachlorophenol wood-treating systems // S. African. – 1979. – 78. – P. 1031.
5. Artigas Gimenez G., Urdangaray Arguelles V., Gonzales Blasquez I., Alonso Rodriguez J. Protective

coating for glass objects // Fr. Demande. – 1979. – 2. – P. 410.

6. Doolittle A.K. The technology of solvents and plasticizers. – New York: John Wiley and Sons, 1954. – P. 644-645.

7. Gaillard D., Derache R. Metabolisation de differents alcools presents dans les boissons alcooliques chez le rat // Trav. Soc. Pharmacol. Montpellier. – 1965. – 25. – P. 51-62.

8. Kamil I.A., Smith J.N., Williams R.T. Studies in detoxication. The metabolism of aliphatic alcohols. The glucuronic acid conjugation of acyclic aliphatic alcohols // Biochem. J. – 1953. – 53. – P. 129-136.

9. Mellan I. Industrial solvents. – New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1950. – P. 482-488.

10. Merritt A.D., Tomkins G.M. Reversible oxidation of cyclic secondary alcohols by liver alcohol dehydrogenase // J. Biol. Chem. – 1959. – 234. – P. 2778.

11. Monich J.A. Alcohols: their chemistry, properties, and manufacture. – New York, Amsterdam, London, Chapman and Reinhold. Cited In: WHO, 1987.

12. Rumyanstev A.P., Geer V.G., Ostroumova N.A. et al. Cumulative properties of butyl alcohol // Gig. i Sanit. – 1975. – 10. – P. 112-113.

13. Sitanov V.S., Bandik K.A., Enakaeva V.G., Baranova R.K. Composition for removing grease and oil from textiles // Otkrytiya, Izobert., Prom. Obraztsy, Tovaznye Znaky. – 1979. – 38. – P. 90.

14. Sodini G., Canella M. Extraction of phenols and oligosaccharides from plant tissues Cited In: WHO, 1987.

15. Theorell H., Bonnichsen R. Studies on liver alcohol dehydrogenase I. Equilibria and initial reaction velocities // Acta Chem. Scand. – 1951. – 5. – P. 1105-1126.

16. Titus E., Ahearn G. Vertebrate gastrointestinal fermentation: transport mechanisms for volatile fatty acids // Am. J. Physiol. – 1992. – 262. – P. 547-553.

17. Wartburg J.P., Von Bethane J.L., Vallee B.L. Human liver alcohol dehydrogenase: kinetic and physiochemical properties // Biochemistry. – 1964. – 3. – P. 1775-1782.

18. Winer A.D. A note of the substrate specificity of horse liver alcohol dehydrogenase // Acta Chem. Scand. – 1958. – 12. – P. 965.

19. Yamazaki Y., Kato K. Penicillins or cephalosporins // Jpn. Kokai Tokkio Koho. – 1978. – 78. – P. 107-484.

ВСАСЫВАНИЕ, ТРАНЗИТ И РЕАБСОРБЦИЯ ¹⁴C-БУТАНОЛА В ОРГАНИЗМЕ БЕЛЫХ МЫШЕЙ

М.Я. Головенко, И.Ю. Борисюк, Е.Б. Лихота
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ О.В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ, ОДЕССА

Резюме

Результаты исследований показали, что бутанол всасывается в тонкой, толстой и прямой кишках. Поступление ¹⁴C-бутанола в кровь после интрагастрального введения сопровождается его транспортом вдоль желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Полученные результаты свидетельствуют о значительной скорости поступления соединения и его метаболитов во все отделы ЖКТ, что, в свою очередь, приводит к быстрому распределению в организме экспериментальных животных.

Показано, что при внутривенном введении ¹⁴C-бутанола наблюдается его проникновение в разные отделы ЖКТ (желудок, тонкая, толстая, прямая кишки). Сделан вывод о возможности реабсорбции бутанола в процессе его всасывания в ЖКТ и продемонстрирована его связь с процессами всасывания и транзита.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ¹⁴C-бутанол, всасывание, транспорт, реабсорбция.

ABSORPTION, TRANSIT AND REABSORPTION OF ¹⁴C-BUTANOL IN WHITE MICE ORGANISM

М.Я. Holovenko, I.Yu. Borysyuk, O.B. Likhota
PHYSICAL-CHEMICAL INSTITUTE BY O.V. BOHATSKY OF NAS OF UKRAINE, ODESSA

Summary

Research results demonstrated that butanol is absorbed in small and large bowels and in colon. Intake of ¹⁴c-butanol into the blood following intragastral administration is accompanied with its transportation through gastro-intestinal tract (GIT). Received results prove a significant intake rate of compound and its metabolites to GIT, which, in turn, results in fast distribution in the bodies of experimental animals.

It is shown, that permeation of ¹⁴C-butanol into different compartments of GIT (stomach, small and large intestine and colon) follows after its intravenous administration. It is concluded that reabsorption of ¹⁴C-butanol during its absorption in GIT is possible, and its connection with processes of transportation and absorption is demonstrated.

KEY WORDS: ¹⁴C-butanol, absorption, transportation, reabsorption.

Отримано 11.02.2009 р.

Адреса для листування: І.Ю. Борисюк, вул. Дніпропетровська дорога, 93, кв. 3, Одеса, 65111, Україна.

АНТИГРИБКОВА АКТИВНІСТЬ ЛІПОСОМАЛЬНОГО ТЕРБІНАФІНУ

Н.М. Іванова, В.М. Васильченко

ІНСТИТУТ ДЕРМАТОЛОГІЇ ТА ВЕНЕРОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ, ХАРКІВ

У результаті визначення мінімально пригнічуючої концентрації (МПК) ліпосомальних препаратів відносно грибів *Candida albicans* та *Candida parapsilosis* було встановлено, що ліпосоми, отримані на основі яєчного лецитину й тербінафіну, більш ефективні при підвищенні концентрації лецитину. Фосфатидилхолінові ліпосоми, які містять олеїнову кислоту й тербінафін, знижують МПК тербінафіну при дії на планктонні гриби *Candida parapsilosis* та гриби *Malassezia furfur* у 7 разів. Використання негативно заряджених ліпосом, одержаних на основі полярних ліпідів і тербінафіну, збільшує відсоток включення тербінафіну в ліпосоми та істотно зменшує його МПК відносно планктонних грибів *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* і *Malassezia furfur* у 6-14 разів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ліпосоми, мінімально пригнічуюча концентрація, гриби *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Malassezia furfur*.

ВСТУП. За даними ВООЗ, в усьому світі кожного року збільшується частота кандидозів та інших мікозів, значно зростає частота випадків грибкової сенсibiliзації, наслідком якої є поширення алергічних захворювань [7, 14].

Значного розповсюдження набули штами мікроорганізмів, резистентні майже до всіх доступних антибіотиків, складається враження, що можливості розробки нових антимікробних препаратів з новими унікальними механізмами дії майже вичерпалися [4]. Крім того, тривале використання високих терапевтичних доз антимікотиків впливає на організм через токсичність застосовуваних речовин.

Перехід до нанорозмірів у медицині відкриває перед нею нові можливості. Ліки, упаковані в наноконтейнери, стають більш ефективними і безпечними, влучно потрапляють в органи-мішені й дозволяють зменшити терапевтичні дози препаратів, які використовують для лікування грибкових інфекцій, а також скоротити терміни лікування, знизити токсичність лікарських засобів, упакованих у ліпосоми і нановезикули. Наночастки та ліпосоми на основі природних ліпідів є перспективним напрямком у медицині через їх нетоксичність, біодеградацію, доступність. Ліпосомальні та наночасткові форми препаратів мають більш пролонговану дію, ніж розчини, за певних умов поглинаються клітинами, їх мембрана може зливатися з клітинною мембраною, що призводить до внутрішньоклітинної доставки їх вмісту. Ліпосоми також

підвищують солюбілізацію важкорозчинних антимікотичних препаратів.

Поява багатьох грибкових інфекцій пов'язана з формуванням біоплівок, стійких до антимікробних агентів. Однією з найважливіших властивостей біоплівок є їх надзвичайна стійкість до антибіотиків і антисептиків. Так, мінімально пригнічуюча концентрація (МПК) деяких антимікотиків для біоплівок *Candida albicans* (*C. albicans*) може в 30-2000 разів перевищувати їх МПК для планктонних клітин. У зв'язку з особливою трудністю лікування захворювань, що супроводжуються формуванням біоплівок мікроорганізмів, виникає необхідність в розробці нових підходів до лікування таких інфекцій. З огляду на збільшення кількості інвазивних мікозів і одночасне зростання резистентності їх збудників, питання створення нових лікарських антимікотиків стає все актуальнішим [12].

З метою вивчення можливості створення наночасткових та ліпосомальних форм антимікотичних препаратів для лікування дерматозів було вибрано похідну аліламінів – тербінафін. Це зумовлено, по-перше, тим, що через високу терапевтичну ефективність та низьку токсичність його широко застосовують для лікування деяких форм шкірних і системних мікозів, по-друге, накопичений позитивний досвід використання в клінічній практиці ліпосомальних форм амфотерицину В та ністатину стимулює розробку ліпосомальних форм інших антимікотичних засобів для системного застосування флуконазолу, інтраконазолу, міконазолу [9, 13]. Крім того,

© Н.М. Іванова, В.М. Васильченко, 2010.

тербінафін є ліпофільною речовиною, тому накопичується в органах, багатих на жирову тканину, отже, повинен добре включатися в ліпідні везикули.

Було зроблено перші спроби створити ліпосомальну форму тербінафіну [3]. Наведено деякі фізико-хімічні властивості одержаного ліпосомального тербінафіну. Показано, що при співвідношенні ліпід:антимікотик 15-200:1 90 % тербінафіну інкапсулюються в ліпідні бішари ліпосом. Однак в цих досліджах не вивчали вплив ліпосомального тербінафіну на інші, крім *Candida* та *Aspergillus*, збудники мікозів, перш за все маласезіозів, при яких знайшли широке застосування різні лікарські форми тербінафіну.

Мета дослідження даної роботи – отримання ліпосомальних форм антимікотичних препаратів на прикладі тербінафіну, вивчення їх антимікотичних властивостей відносно планктонних клітин та біоплівки в досліджах *in vitro*, впливу складу, розміру, заряду ліпосом на включення в них антимікотиків, оцінка переваги перед існуючими препаратами.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі було використано: спиртовий 10 % розчин яєчного лецитину і 0,5 % спиртовий розчин кардіоліпіну (ЗАТ “Біолік”, Україна); холестерин (“Sigma”, США); олеїнову кислоту (“Fluka”, Італія); ДМСО (Росія), суміш полярних ліпідів з негативним зарядом, отриману за оригінальною технологією, розробленою Н.М. Івановою [11]; субстанцію антигрибкового препарату тербінофіну гідрохлориду (“Hetero Labs limited”, Індія) та сефарозу-4В (“Sigma”, США). Штам *Candida albicans* 885/653 ATCC 10231 отримано з Інституту епідеміології і мікробіології (Київ). Штам *Candida parapsilosis* 1862 ізольовано зі шкіри хворого на екзему та ідентифіковано за допомогою молекулярно-генетичних методів [1]. Штам *Malassezia furfur* 1169 й 973 виділено від хворих на atopічний дерматит та ідентифіковано згідно з методичними рекомендаціями [1]. Культуру *Malassezia* вирощували на модифікованому агарі Лімінг-Нотман від 2 до 14 днів при 32 °С [10]. Для проведення дифузії використовували середовище Сабуро (фірма “Н. Media”, Індія) та рідке модифіковане середовище RPMI-1640 “Sigma” Лізування ліпосом здійснювали триномом X-100 або твіном 20.

Одержання ліпосом. Ліпосоми отримували методом випарювання ліпідів на вакуумному ротаційному випарювачі (Vakuum-Rotation, Німеччина) з наступним суспендуван-

ням у забуференому фізіологічному розчині з рН 7,4 і озвучуванням на диспергаторі УЗДН-А (Росія). Озвучування ліпосом проводили при охолодженні до 2-4 °С.

Одержання ліпосомальної форми антигрибкових препаратів. Субстанцію тербінафіну гідрохлориду розчиняли у хлороформі у зв'язку з його поганою розчинністю у водяних розчинах і додавали до спиртових або хлороформних розчинів ліпідів у співвідношенні антигрибковий препарат:ліпід 1:10, 1:20. Далі суміш випарювали й одержували ліпосоми, як зазначено вище.

Визначення розміру ліпосом. Розмір ліпосом визначали методом турбодиметрії за виміром оптичної щільності досліджуваної ліпідної суспензії в діапазоні хвиль 450-700 нм [5].

Очищення антимікотиків, які були інтеркольовані, від неінтеркольованих здійснювали шляхом хроматографії на колонці із сефарозою 4В та за допомогою ультрацентрифугування (центрифуга MSE-Superspeed 65, Англія) протягом години при 100 000 г. Вихід ліпосом визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 450 нм. Концентрацію тербінафіну визначали після його екстракції сумішшю хлороформ:спирт (3:2) спектрофотометрично при довжині хвилі 285 нм.

Визначення МПК тербінафіну в ліпосомальних препаратах проводили мікротитраційним способом. У плоскодонні планшети розливали по 100 мкл відповідного живильного середовища (рідке середовище RPMI-1640 або Сабуро) – додавали у 1-шу лунку препарат в обсязі 10-100 мкл і далі титрували перекатом до 11-ї лунки, у 12-ту лунку вносили інтактний тербінафін, розчинений в диметилсульфоксиді. У кожну лунку додавали по 10 мкл культури й інкубували при 34 °С протягом 24 год для *C. Candida*, 48 год – для *C. parapsilosis*, 72 год – для *Malassezia furfur*. Ступінь мутності визначали при довжині хвилі 450 нм. МПК вважали найменшу концентрацію, що затримує ріст грибів протягом періоду інкубації. Вплив антимікотиків на біоплівки вивчали або при додаванні на початку їх утворення, або після утворення, відмивання і подальшої інкубації у свіжому живильному середовищі.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Спочатку було отримано ліпосоми (Лс) на основі яєчного лецитину (ФХя), що є м'яким ліпідом і традиційно використовується в ліпосомології. Співвідношення тербінафін: лецитин складало 1:10 й 1:20. Встановлено, що відсоток включення тербінафіну в лецитинові ліпосоми зале-

жить від розміру ліпосом і складу ліпідів (рис. 1). На рисунку 1 видно, що при зменшенні розміру ліпосом збільшується вміст інтерколюваного тербінафіну.

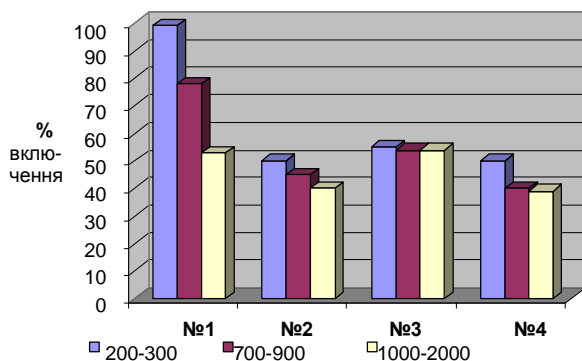


Рис. 1. Відсоток включення тербінафіну в ліпосоми залежно від їх складу і розміру.

Примітка. № 1 – 1 % Лс: ФХя + тербінафін; № 2 – 1 % Лс: ФХя + Хол (4:1) + тербінафін; № 3 – 1 % ФХя + Кард. (4:1) + тербінафін; № 4 – 1 % ФХя + Ол. к-та (5:1) + тербінафін.

Для надання ригідності ліпосомам нами до лецитину був доданий холестерин (Хол) (рис. 1, № 2) у співвідношенні тербінафін:ліпіди 1:20. Також до лецитинових ліпосом додали кардіоліпін (Кард.) (рис. 1, № 3) у співвідношенні тербінафін:ліпіди 1:20. Крім того, відомо [8], що олеїнова кислота (Ол. к-та) добре утилізується дріжджами, а також її наявність в ліпосомах полегшує доставку препаратів, які використовують у дерматології, до вогнищ ураження, тому до складу лецитинових ліпосом ми додавали олеїнову кислоту в співвідношенні олеїнова кислота:лецитин 1:10 (рис. 1, № 4). Співвідношення тербінафін:ліпіди складало 1:10. Як видно на рисунку 1, кардіоліпін, холестерин і олеїнова кислота зменшували відсоток включення тербінафіну в лецитинові ліпосоми. Крім того, їх присутність у ліпосомах з тербінафіном призводила до агрегації і нестабільності ліпосом при збереженні. Ми припустили, що, можливо, кардіоліпін і холестерин “видавлюють” тербінафін з ліпосом, який у процесі приготування ліпосом адсорбується з водного розчину на мембрані ліпосом і агрегує їх, тому що тербінафін є ліпофільною речовиною.

У наступному експерименті для одержання ліпосом ми використовували суміш полярних ліпідів (фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, цереброзиди, сульфатцереброзид, сфінгомієлін) з великим негативним зарядом, тому що в наших попередніх роботах було показано, що негативний заряд ліпосом

істотно збільшує відсоток включення антибіотиків у ліпосоми [6]. Крім того, відомо, що негативно заряджені ліпосоми швидше потрапляють у клітини. Співвідношення тербінафін:ліпіди складало 1:10, 1:20. У цьому експерименті використовували невеликі Лс розміром 180-200 нм. Як видно на рисунку 2, при зростанні кількості ліпідів у ліпосомах у співвідношенні тербінафін:ліпіди з 1:10 до 1:20 відсоток включення тербінафіну збільшувався як у лецитинових ліпосомах (до 99 %), так і в негативно заряджених ліпосомах на основі полярних ліпідів (до 95 %).

Найбільш стабільні, гетерогенні ліпосоми було отримано на основі негативно заряджених полярних ліпідів (рис. 2).

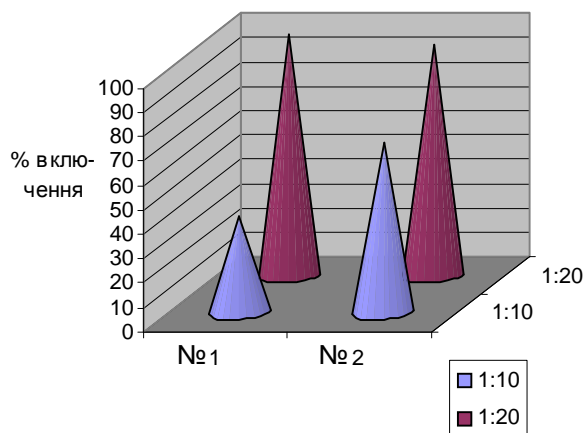


Рис. 2. Відсоток включення тербінафіну в негативно заряджені ліпосоми.

Примітка. № 1 – Лс на основі ФХя, співвідношення тербінафін:ФХя 1:10, 1:20; № 2 – Лс на основі негативно зарядженої суміші ліпідів, співвідношення тербінафін:ліпіди 1:10, 1:20.

Наступним етапом роботи було визначення МПК ліпосомальних форм тербінафіну залежно від складу ліпосом, їх розміру і заряду при інгібуванні дії грибів *S. albicans* і *S. parapsilosis*, а також *Malassezia furfur*.

У результаті визначення МПК ліпосомальних препаратів було встановлено, що ліпосоми, отримані на основі яєчного лецитину й тербінафіну, більш ефективні при підвищенні концентрації лецитину. Так, при співвідношенні тербінафін:лецитин 1:20 МПК ліпосом знижувалась, порівняно з МПК інтактного тербінафіну, приблизно в 3 рази відносно як грибів *S. albicans*, так і грибів *S. parapsilosis* (табл. 1, № 2), тоді як при співвідношенні 1:10 МПК фосфатидилхолоїнових ліпосом була меншою МПК тербінафіну у 2 рази. Лецитинові ліпосоми, які містили олеїнову кислоту у співвідношенні олеїнова кислота:лецитин 1:10 та тербінафін у співвідношенні тербінафін:ліпіди

Таблиця 1 – МПК ліпосомальних препаратів відносно грибів *C. albicans* і *C. parapsilosis*

| № з/п | Найменування препаратів | МПК, мкг/мл, відносно <i>C. albicans</i> 885/653 | МПК, мкг/мл, відносно <i>C. parapsilosis</i> 1862 |
|-------|--|--|---|
| 1 | Лс: лецитин + тербінафін, очищені від неінтерколюваного тербінафіну, співвідношення тербінафін:лецитин 1:10 | 1,8 | 3,6 |
| 2 | Лс: лецитин + тербінафін, співвідношення тербінафін:лецитин 1:20 | 1,47 | 1,48 |
| 3 | Лс: суміш полярних ліпідів з негативним зарядом + тербінафін, очищені від неінтерколюваного тербінафіну, співвідношення тербінафін:ліпіди 1:10 | 0,66 | 0,33 |
| 4 | Лс: суміш полярних ліпідів з негативним зарядом + тербінафін, співвідношення тербінафін:ліпіди 1:10 | 2,5 | 3,0 |
| 5 | Лс: лецитин + олеїнова кислота + тербінафін, співвідношення тербінафін:ліпіди 1:10 | 5,8 | 1,45 |
| 6 | Тербінафін, контроль | 4,0 | 4,8 |

ди 1:10, зменшували МПК інтактного тербінафіну в 3 рази тільки при дії на планктонні гриби *C. parapsilosis* (табл. 1, № 5).

У наступному експерименті для визначення МПК відносно грибів *C. albicans* і *C. parapsilosis* ми використовували суміш полярних ліпідів (фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, цереброзиди, сульфатцереброзид, сфінгомієлін) з великим негативним зарядом, тому що в наших попередніх роботах було показано, що негативний заряд ліпосом збільшує ефективність антибіотиків при внутрішньоклітинній інфекції [2]. Було з'ясовано, що ліпосоми цього складу та заряду є найефективнішими відносно *C. albicans* і *C. parapsilosis*. Так, МПК ліпосом, отриманих на основі негативно заряджених полярних ліпідів, після видалення тербінафіну, що не включився, була меншою МПК інтактного тербінафіну в 6 разів відносно *C. albicans*, а відносно *C. parapsilosis* – у 14 разів (табл. 1, № 3). Крім того, встановлено, що негативно заряджені ліпосоми, отримані на основі полярних ліпідів, інгібують утворення біоплівки *C. parapsilosis*.

Наступним етапом роботи було визначення МПК ліпосомальних форм тербінафіну при інгібуванні дії грибів *Malassezia furfur*, тому що практично в кожній людини шкіра, особливо верхні частини тіла, колонізована грибами роду *Malassezia*. Визначення МПК ліпосомальних форм тербінафіну проведено залежно від складу ліпосом, їх розміру і заряду. В результаті визначення МПК ліпосомальних препаратів відносно грибів *Malassezia furfur* встановлено, що найбільш ефективними були ліпосоми, отримані на основі яєчного лецитину, які містили олеїнову кислоту у співвідношенні олеїнова кислота:лецитин 1:10 і тербінафін у співвідношенні тербінафін:ліпіди 1:10. Ліпосо-

ми, які містили олеїнову кислоту, зменшували МПК інтактного тербінафіну в 7 разів. Отже, олеїнова кислота добре утилізується дріжджами, а її наявність в ліпосомах полегшує доставку препаратів, що особливо актуально для грибів *Malassezia*, бо це єдиний представник мікрофлори людини, для життєдіяльності якого необхідні жири. Але потрібно відзначити, що при додаванні до лецитину олеїнової кислоти солюбілізація антимікотичних препаратів утруднюється. Також було встановлено, що негативно заряджені ліпосоми, отримані на основі полярних ліпідів, зменшували МПК тербінафіну відносно грибів *Malassezia furfur* у 6 разів.

ВИСНОВКИ. У результаті визначення МПК ліпосомальних препаратів встановлено, що ліпосоми, отримані на основі яєчного лецитину й тербінафіну, ефективніші при підвищенні концентрації лецитину, відносно як грибів *C. albicans*, так і *C. parapsilosis*. Також виявлено, що негативно заряджені ліпосоми збільшують ефективність тербінафіну відносно грибів *C. albicans* і *C. parapsilosis*. У результаті визначення МПК ліпосомальних препаратів відносно грибів *Malassezia furfur* встановлено, що найефективнішими були ліпосоми, отримані на основі яєчного лецитину, що містили олеїнову кислоту, та негативно заряджені ліпосоми, одержані на основі полярних ліпідів. Крім того, виявлено, що негативно заряджені ліпосоми, отримані на основі полярних ліпідів, інгібують утворення біоплівки *Candida parapsilosis*. Отримані результати дають можливість прогнозувати використання ліпосомальних форм антимікотичних препаратів для підвищення ефективності фармакологічної дії лікування шкірних та системних мікозів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Використання секвенування внутрішніх транс-крибованих спейсрбосомальних РНК для ідентифікації грибів: Методичні рекомендації / За ред. І.І. Маврова, О.П. Білозерова, І.А. Безрученко та ін. – К., 2008. – 15 с.
2. Мавров И.И., Иванова Н.Н., Кутовая В.В., Гончаренко В.В. Экспериментальное обоснование комбинированного применения липосом и антибиотиков для их рационального использования при хламидиозе // Дерматология и венерология АМН Украины. – 2008. – № 1. – С. 15-19.
3. Пат. США 6623753, МКИ А 61 К 9/127. Allylamine-containing liposomes / Bodmer D., Kissel T., Richter F., Tiemessen H. (Швейцария). – Опубл. 23.09.2003. – НКИ 424/450.
4. Сидоренко С.В. Есть ли будущее у антибактериальной терапии? // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – № 1. – С. 3-5.
5. Фосфолипиды. Методы их выделения, обнаружения и изучения физико-химических свойств липидных дисперсий в воде: Учебно-методическое пособие по биоорганической химии / Под ред. Г.М. Сорокумова, А.А. Селищева, А.П. Каплун. – М., 2000. – 105 с.
6. Циганенко А.Я., Алмакаева Л.Г., Коваленко Н.І. та ін. Вітчизняний антибіотик ципрофлоксацин для інфузій: протимікробні властивості та створення на його основі ліпосомальної форми // Вісник Вінницького державного медичного університету. – 2002. – 6. – С. 367-368.
7. Bieber T. Atopic Dermatitis // NE J Med. – 2008. – 358. – P. 1483-1494.
8. Dawson TL Jr, DeAngelis Y.M., Treadway R. et al. Dandruff. Part II: Dandruff and seborrheic dermatitis result from oleic acid released from sebum by Malassezia lipase activity // Poster present at Am Acad Dermatol Meeting. – 2002.
9. De Logu A., Fadda A.M., Anchisi C. et al. Effects of in-vitro activity of miconazole and ketoconazole in phospholipid formulations // J. Antimicrob. Chemother. – 1997. – 40. – P. 889-893.
10. Faergemann J. Atopic dermatitis and fungi // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – 15, № 4. – P. 545-563.
11. Ivanova N.N., Kaplun A.P., Shvets V.I. et al. Hard charged liposomes inhibit complement - induced haemolysis // 24th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Proceeding. Abstracts. – Stokgolm, 1997. – P. 757-758.
12. Shahi S.K., Patra M. Microbially synthesized bioactive nanoparticles and their formulation active against human pathogenic fungi // Rev. Adv. Mater. Sci. – 2003. – № 5. – P. 501-509.
13. Singh M., Singh M.P., Maiti S.N. et al. Preparation of liposomal fluconazole and in vitro antifungal activity // Microencapsulation. – 1993. – 10, № 2. – P. 229-236.
14. World Health Organization, Global programme on AIDS. An overview of selected curable sexually transmitted diseases. – 1995. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

АНТИГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ТЕРБИНАФИНА

Н.Н. Иванова, В.Н. Васильченко

ИНСТИТУТ ДЕРМАТОЛОГИИ И ВЕНЕРОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ, ХАРЬКОВ

Резюме

В результате определения минимально подавляющей концентрации (МПК) липосомальных препаратов в отношении грибов *Candida albicans* и *Candida parapsilosis* было установлено, что липосомы, полученные на основе яичного лецитина и тербинафина, более эффективны при повышении концентрации лецитина. Фосфатидилхолиновые липосомы, содержащие олеиновую кислоту и тербинафин снижают МПК интактного тербинафина при действии на планктонные грибы *Candida parapsilosis* и грибы *Malassezia furfur* в 7 раз. Использование отрицательно заряженных липосом, полученных на основе полярных липидов и тербинафина, увеличивает процент включения тербинафина в липосомы и существенным образом уменьшает его МПК в отношении планктонных грибов *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* и *Malassezia furfur* в 6-14 раз.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **липосомы, минимально подавляющая концентрация, грибы *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Malassezia furfur*.**

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF LIPOSOMAL TERBINAFINE

N.M. Ivanova, V.M. Vasilchenko

INSITUTE OF DERMATOLOGY AND VENEROLOGY OF ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES OF UKRAINE, KHARKIV

Summary

As the result of the determination minimum inhibitory concentration (MIC) of the liposomal preparations concerning fungal infections caused by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* it has been found that the

liposomes received on the basis of egg lecithin and terbinafine are more effective at increase in concentration of lecithin. The phosphatidylcholine liposomes containing oleic acid and terbinafine reduce MIC terbinafine at action by planktonic fungus Candida parapsilosis and Malassezia furfur in 3-7 times. The using of negatively charged liposomes received on the basis of polar lipids and terbinafine increases the percent of inclusion of terbinafine in liposomes and significantly reduces MIC of terbinafine concerning planktonic fungus Candida albicans, Candida parapsilosis and Malassezia furfur in 6-14 time.

KEY WORDS: liposomes, minimum inhibitory concentration, fungus Candida albicans, Candida parapsilosis and Malassezia furfur.

Отримано 26.10.2009 р.

Адреса для листування: Н.М. Іванова, Інститут дерматології та венерології АМН України, вул. Чернишевська, 7/9, Харків, 61057, Україна.

ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СІРКОВМІСНИХ ХІНАЗОЛІНІВ ТА ОЦІНКА МОЖЛИВОСТЕЙ ЇХ ПРОГНОЗУВАННЯ

А.І. Авраменко, В.О. Нікітін, С.І. Коваленко
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Досліджено фізико-хімічні властивості ряду 2-*R*-хіназолін-4(3*H*)-тіонів та їх *S*-похідних: *pKa* – спектрофотометрично та шляхом потенціометричного титрування у змішаному розчиннику, Rm_o – із застосуванням зворотnofазової хроматографії. Дані було зіставлено з розрахунковими величинами $\log P$ та $\log D$, отриманими за допомогою різних комп'ютерних програм. Програмний пакет *ACD_Labs* дає значення, найбільш близькі до експериментальних, та може бути використаний для прогнозування фізико-хімічних параметрів елементів віртуальної комбінаторної бібліотеки 2-*R*-хіназолін-4(3*H*)-тіонів та їх *S*-похідних.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: сірковмісні хіназоліни, *pKa*, ліпофільність, прогнозування властивостей.

ВСТУП. Одним з етапів пошуку структури-лідера серед елементів комбінаторної бібліотеки є оцінка їх фізико-хімічних параметрів. Серед найважливіших виокремлюють ті, що безпосередньо зумовлюють здатність сполуки потрапляти до біологічних мішеней шляхом пасивної дифузії, – це насамперед ліпофільність ($\log P$) та, для сполук, здатних до іонізації, *pH*-залежна ліпофільність ($\log D$), що є похідною від $\log P$ і *pKa* [4].

Досліджуючи комбінаторну бібліотеку 2-*R*-хіназолін-4(3*H*)-тіонів та їх *S*-похідних, ми поставили за мету визначити ліпофільність та здатність останніх до іонізації, а також оцінити якість прогнозування цих величин за допомогою існуючих програмних пакетів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження був ряд похідних 2-*R*-хіназолін-4(3*H*)-тіонів та їх *S*-похідних, які синтезовано на кафедрі фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету (завідувач кафедри професор, доктор фармацевтичних наук І.А. Мазур).

Зважаючи на розчинність, *pKa* було вирішено визначати двома альтернативними шляхами: титруванням у змішаному розчиннику та спектрофотометрично [2].

Для визначення ліпофільності використано методику зворотnofазової тонкошарової хроматографії [3]. Як нерухому фазу застосовували хроматографічні пластини для зворотnofазової хроматографії марки RP-18F_{254s}

(20x20) виробництва Німеччини. Рухома фаза складалась з водно-ацетонової суміші. Концентрацію ацетону підбирали залежно від розчинності досліджуваної сполуки, і вона становила 20-95 %. Досліджувані сполуки у концентрації 2 мг/мл розчиняли у диметилформаміді. Одержані розчини з інтервалом 1,5 см наносили на лінію старту хроматографічної пластини та хроматографували. Висушували пластини при кімнатній температурі та проявляли для кожної концентрації ацетону за формулою:

$$Rm = \log(1/R_f - 1) \quad (1)$$

Одержані значення Rm екстраполювали на нульову концентрацію ацетону за рівнянням лінійної регресії:

$$Rm = a C_{\text{ацетон}} + Rm_o \quad (2)$$

де $C_{\text{ацетон}}$ – концентрація ацетону; Rm_o – параметр, що експериментально характеризує ліпофільність сполук.

Теоретичні розрахунки значень *pKa* та $\log D$ було проведено за допомогою пакета *ACD_Labs* [5], значення $\log P$ – також з використанням *Hyperchem 7.5* [6], *Dagon* [7] та *ChemOffice* [8].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дані щодо *pKa*, отримані шляхом титрування у 80 % водному розчині ДМФА та спектрофотометрично (табл. 1), було піддано кореляційному аналізу. Для прямого зіставлення результатів двох методів деякі сполуки послідовно відтитровано у розчинах із різною концентрацією ДМФА, дані екстраполювали на нульову концентрацію органічного розчинника.

© А.І. Авраменко, В.О. Нікітін, С.І. Коваленко, 2010.

Таблиця 1 – Експериментальні та прогнозовані значення рКа досліджуваних сполук

| Сполука | рКа спектрофотометр. | рКа 80 % ДМФА – вода | рКа екстраполяція | рКа прогнозоване (ACD_Labs) |
|---------|-------------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 1.2 | 2,89 | 6,8 | 3,02 | 3,06 |
| 1.3 | 3,03 | 7,1 | | 3,11 |
| 1.4 | 2,99 | 7,85 | 2,97 | 3,07 |
| 1.5 | 3,02 | 7,4 | | 3,09 |
| 1.6 | 4,31 | 7,3 | | 4,05 |
| 2.2 | 2,92 | 7,0 | | 3,01 |
| 2.3 | 2,96 | 8,6 | | 3,05 |
| 2.4 | 2,98 | 8,65 | | 3,07 |
| 2.5 | 3,01 | 8,95 | | 3,09 |
| 2.6 | 4,33 | 7,7 | | 4,05 |
| 6.1 | 6,36 | 6,0* | 3,32* | 6,57 |
| 7.1 | 7,37 | 8,4* | 7,53* | 7,55 |
| 3.1 | –** | 9,5 | | 8,09 |
| 5.1 | 7,80 | 9,8* | 4,6* | 8,28 |
| 1.1 | 7,82 | 10,5* | 7,3* | 7,69 |
| 2.1 | 8,66 | 12,2* | 9,75* | 8,84 |
| 6.2 | 2,91 | 6,95 | | 2,88 |
| 3.2 | 3,04 | 7,35 | | 2,97 |
| 5.2 | 2,97 | 7,2 | | 3,11 |
| 7.2 | 2,64 | 5,5 | | 2,59 |

Примітка. * – дані відповідають літературі [2]; ** – сполука не розчинилась.

Аналіз отриманих даних показав, що, хоча на певному відтинку концентрацій і спостерігається лінійна залежність значень рКа – С%ДМФА, екстраполяція на вісь ординат не дає значень, які одержано спектрофотометрично. Це пояснюється описаним в літературі [1] ефектом сольватації, що викликає суттєве відхилення від лінійності в ділянці низьких концентрацій органічного розчинника. На жаль, через відносно низьку розчинність у воді досліджуваних сполук в більшості випадків нам не вдалося одержати прямого експериментального підтвердження даного ефекту, проте у випадку зі сполукою 2.2 його було отримано (рис. 1). У світлі цих фактів, логічно припустити неможливість перерахунку значень рКа, отриманих шляхом титрування у 80 % ДМФА, на рКа водного розчину, проте кореляційний аналіз дозволив виявити ще одну цікаву закономірність: при відсутності лінійного взаємозв'язку в загальній вибірці існує дуже добра кореляція у підвибірках, зокрема в рядах відповідних тіонів (1.1, 2.1, 3.1, 5.1, 6.1, 7.1) та ацетатних кислот (1.2, 2.2, 3.2, 5.2, 6.2, 7.2, рис. 2 та 3). Це можна пояснити тим, що характер відхилення від лінійності в ділянці низьких концентрацій органічного розчинника залежить від безпосереднього структурного оточення фрагмента молекули, що іонізується. Причому більш віддалені від кислотного центру фрагменти молекули впливають тільки на значення рКа та не діють на кривизну відхи-

лення. Це, у свою чергу, дозволяє для рядів з однаковою структурою кислотного центру знехтувати даним відхиленням та користуватись лінійними рівняннями для перерахунків:

рКа спектрофотометр. = $4,0 + 0,355 \cdot \text{рКа}$
80 %ДМФА для тіонів

рКа спектрофотометр. = $1,52 + 0,2 \cdot \text{рКа}$
80 %ДМФА для ацетатних кислот

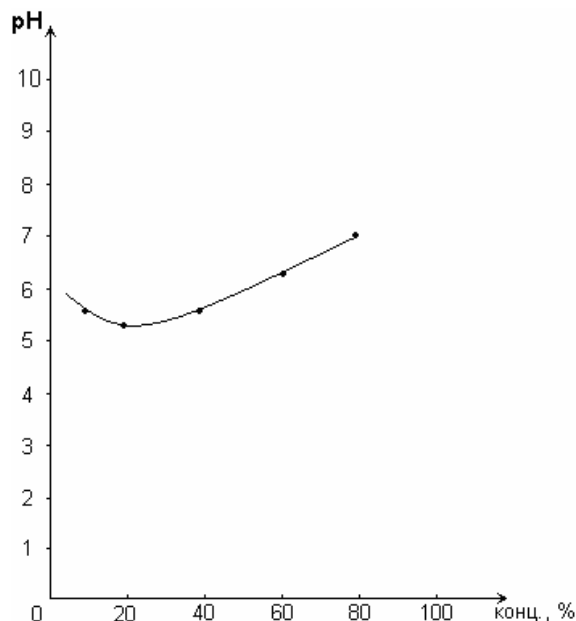


Рис. 1. Залежність рН в точці напівнейтралізації від концентрації ДМФА для сполуки 2.2.

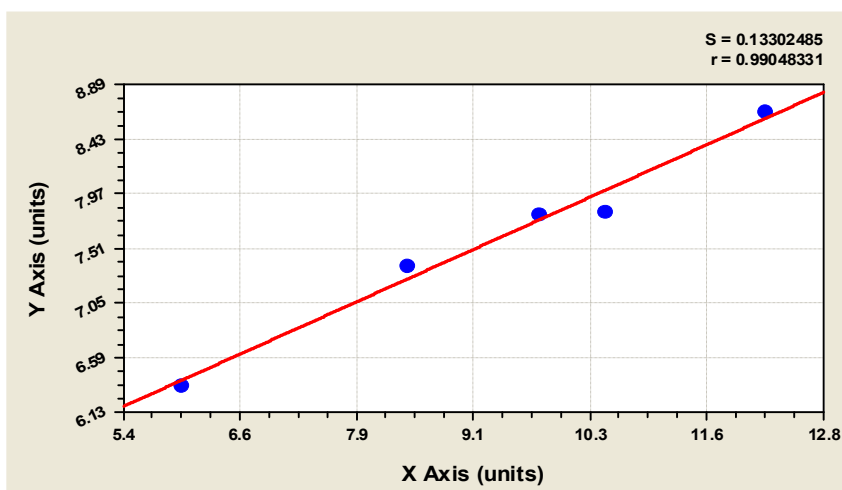


Рис. 2. Залежність рКа спектрофотометр. = f(рКа 80 %ДМФА) для ряду тіонів (1.1, 2.1, 3.1, 5.1, 6.1, 7.1).

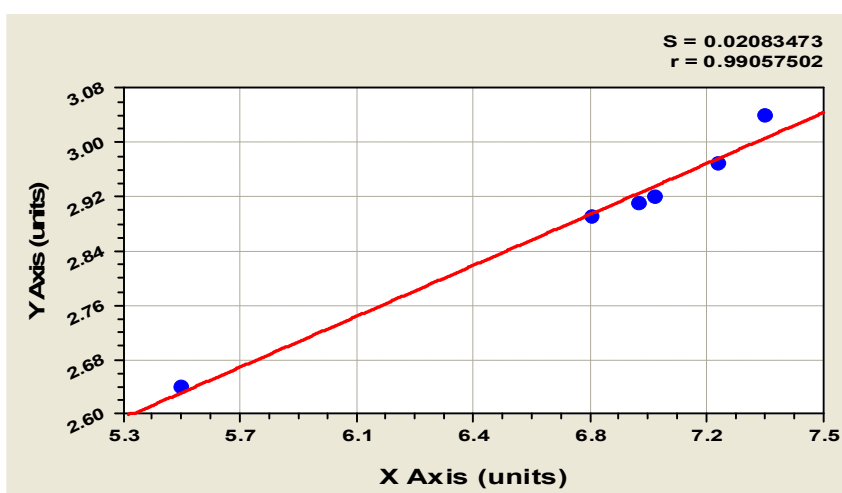
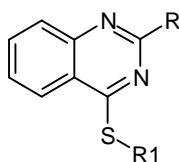


Рис. 3. Залежність рКа спектрофотометр. = f(рКа 80 %ДМФА) для ряду ацетатних кислот (1.2, 2.2, 3.2, 5.2, 6.2, 7.2).

Дані щодо експериментальних величин ліпофільності ряду сірковмісних хіназолінів (табл. 2) зіставлено з розрахунковими величинами $\log P$ для оцінки коректності прогнозування. Для сполук, здатних до дисоціації, також було розраховано значення $\log D$ (табл. 3).

Аналіз отриманих результатів (табл. 4) дозволяє зробити висновок, що найкраща кореляція з експериментальними даними спостерігається для величин, розрахованих за допомогою пакета ACD_Labs, причому врахування рН дає можливість поліпшити цю кореляцію.

Таблиця 2 – Величини Rm_0 досліджуваних похідних 4(3H)-хіназолінтіону



| Сполука | R | R ₁ | Rm ₀ |
|---------|---|---|-----------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1.2 | H | CH ₂ COOH | 0,3 |
| 1.3 | H | CH(CH ₃)COOH | 0,6 |
| 1.4 | H | CH(C ₂ H ₅)COOH | 0,79 |
| 1.5 | H | CH(<i>i</i> -C ₃ H ₇)COOH | 1,14 |
| 1.6 | H | (CH ₂) ₂ COOH | 1,10 |

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----|--|---|------|
| 2.2 | CH ₃ | CH ₂ COOH | 0,28 |
| 2.3 | CH ₃ | CH(CH ₃)COOH | 0,39 |
| 2.4 | CH ₃ | CH(C ₂ H ₅)COOH | 0,61 |
| 2.5 | CH ₃ | CH(<i>i</i> -C ₃ H ₇)COOH | 0,77 |
| 2.6 | CH ₃ | (CH ₂) ₂ COOH | 1,00 |
| 6.1 | CF ₃ | H | 0,97 |
| 7.1 | N-морфоліл | H | 1,70 |
| 3.1 | C ₆ H ₅ | H | 1,74 |
| 5.1 | CH=CH-C ₆ H ₅ | H | 2,29 |
| 1.1 | H | H | 1,23 |
| 2.1 | CH ₃ | H | 0,88 |
| 6.2 | CF ₃ | CH ₂ COOH | 1,03 |
| 3.2 | C ₆ H ₅ | CH ₂ COOH | 1,47 |
| 5.2 | CH=CH-C ₆ H ₅ | CH ₂ COOH | 1,75 |
| 7.2 | N-морфоліл | CH ₂ COOH | 0,83 |
| 1.6 | H | CH ₂ COO-C ₆ H ₅ | 2,74 |
| 2.6 | CH ₃ | CH ₂ COO-C ₆ H ₅ | 2,42 |
| 6.3 | CF ₃ | CH ₂ COO-C ₆ H ₅ | 2,77 |
| 5.3 | CH=CH-C ₆ H ₅ | CH ₂ COO-C ₆ H ₅ | 1,97 |
| 3.3 | C ₆ H ₅ | CH ₂ COO-C ₆ H ₅ | 2,88 |
| 4.2 | CH ₂ -C ₆ H ₅ | CH ₂ COO-C ₆ H ₅ | 2,65 |
| 7.3 | N-морфоліл | CH ₂ COO-C ₆ H ₅ | 2,23 |

Таблиця 3 – Значення LogD для pH 7,4, розраховані за допомогою програми ACD_Labs

$$\log D = \log P - \log(1 + 10^{pH - pKa})$$

| Сполука | LogD _{pH 7,4} | Сполука | LogD _{pH 7,4} | Сполука | LogD _{pH 7,4} |
|------------|------------------------|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 1.2 | -2,24 | 2.6 | -1,92 | 5.2 | -0,13 |
| 1.3 | -1,88 | 6.1 | -0,62 | 7.2 | -1,78 |
| 1.4 | -1,36 | 7.1 | -1,13 | 1.6 | 3,31 |
| 1.5 | -1,01 | 3.1 | 1,13 | 2.6 | 2,81 |
| 1.6 | -1,42 | 5.1 | 1,67 | 6.3 | 3,72 |
| 2.2 | -2,75 | 1.1 | -1,47 | 5.3 | 5,44 |
| 2.3 | -2,39 | 2.1 | -0,95 | 3.3 | 4,89 |
| 2.4 | -1,86 | 6.2 | -1,87 | 4.2 | 4,59 |
| 2.5 | -1,51 | 3.2 | -0,68 | 7.3 | 2,63 |

Таблиця 4 – Кореляція експериментальних значень Rm₀ із величинами ліпофільності, розрахованими за допомогою різних програм

| Комп'ютерна програма | Рівняння регресії | r | S |
|---------------------------------|--|--------|-------|
| ALogP ² Dragon | Rm ₀ = 8,087·ALogP ² + 0,382 | 0,827 | 4,677 |
| ALogP Dragon | Rm ₀ = 1,103·ALogP + 1,695 | 0,813 | 0,673 |
| MLogP ² Dragon | Rm ₀ = 0,879·MLogP ² + 5,597 | 0,826 | 3,254 |
| MLogP Dragon | Rm ₀ = 0,888·MLogP + 1,579 | 0,827 | 0,515 |
| CLogP Chem Office | Rm ₀ = 1,057·CLogP + 1,257 | 0,6635 | 1,016 |
| LogP Chem Office | Rm ₀ = 1,06·LogP + 2,133 | 0,691 | 0,946 |
| LogP Hyperchem | Rm ₀ = 0,606·LogP + 2,124 | 0,468 | 0,976 |
| LogP ACD_Labs | Rm ₀ = 1,531·LogP + 0,609 | 0,928 | 0,488 |
| LogD _{pH 7,4} ACD_Labs | Rm ₀ = 0,344·LogD + 1,409 | 0,964 | 0,274 |

ВИСНОВКИ. 1. За допомогою потенціометричного титрування у змішаному розчиннику і спектрофотометрично було вивчено рKa ряду 2-R-хіназолін-4(3H)-тіонів та деяких їх S-похідних. Шляхом зіставлення результатів визначено кореляційні взаємозв'язки між одержаними значеннями.

2. Експериментальні величини ліпофільності (Rm_0) було досліджено за допомогою зворотnofазової хроматографії.

3. Проведено кореляційний аналіз між розрахунковими значеннями LogP і LogD досліджуваного ряду сполук та експериментальними даними. Програмний пакет ACD_Labs дає значення, найбільш близькі до експериментальних, і може бути використаний для прогнозування фізико-хімічних параметрів елементів віртуальної комбінаторної бібліотеки 2-R-хіназолін-4(3H)-тіонів та їх S-похідних.

ЛІТЕРАТУРА

1. Альберт А. Константы ионизации кислот и оснований / А. Альберт, Е. Сергент; пер. с англ. Б.А. Порай-Кашице. – М. : Химия, 1964. – 180 с.

2. Визначення констант іонізації 2R-4(3H)хіназолінтіонів у змішаному розчиннику методом потенціометричного титрування / [А.І. Авраменко, Т.М. Калугіна, В.О. Нікітін та ін]. //Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки : зб. наук. праць. – Запоріжжя, 2008. – С. 6-10.

3. Огурцов В.В. Використання розрахункових

методів для прогнозування ліпофільності 3,7-дитіа-5-азатетрагетероцикло[9.2.1.0^{2,10}.0^{4,8}] тетрадецен 4(8)-онів-6^{*} / [В.В. Огурцов, І.І. Олійник, Д.В. Атаманюк, Р.Б. Лесик] // Фармац. журн. – 2007. – № 4. – С. 57-63.

4. Орлов В.Д. Медицинская химия / В.Д. Орлов. – Х., 2005. – 460 с.

5. <http://www.acdlabs.com>

6. <http://www.hyper.com>

7. <http://www.qsar.it>

8. <http://www.vcclab.org>

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ ХИНАЗОЛИНОВ И ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТЕЙ ИХ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ

А.И. Авраменко, В.А. Никитин, С.И. Коваленко
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Исследованы физико-химические свойства ряда 2-R-хиназолин-4(3H)-тионов и их S-производных: рKa – спектрофотометрически и путём потенциометрического титрования в смешанном растворителе, Rm_0 – с применением обратnofазной хроматографии. Данные были сопоставлены с расчётными величинами LogP и LogD, полученными при помощи различных компьютерных программ. Программный пакет ACD_Labs даёт значения, наиболее близкие к экспериментальным, и может быть использован для прогнозирования физико-химических параметров элементов виртуальной комбінаторной бібліотеки 2-R-хіназолін-4(3H)-тіонів и их S-производных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: серосодержащие хиनाзолины, рKa, липофільність, прогнозування свойств.

STUDY OF SULFUR-CONTAINING QUINAZOLINES' PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND EVALUATION OF THEIR PREDICTION POSSIBILITY

A.I. Avramenko, V.O. Nikitin, S.I. Kovalenko
ZAPORIZHYAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Summary

Physico-chemical properties of 2-R-quinazoline-4(3H)-thiones and their S-derivatives were studied: pKa – spectrophotometrically and with potentiometric titration in mixed solvent, Rm_0 – with reversed-phase chromatography. Data were compared with LogP and LogD calculated by different computer programs. ACD_Labs gives results the most close to experimental and can be used to predict the physico-chemical properties of new 2-R-quinazoline-4(3H)-thiones and their S-derivatives.

KEY WORDS: sulfur-containing quinazolines, pKa, lipophilicity, prediction of properties.

Отримано 10.12.2009 р.

Адреса для листування: А.І. Авраменко, Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.

АНАЛІЗ ПІГМЕНТНОГО СКЛАДУ ТРАВИ ЗМІЄГОЛОВНИКА ВЕЛИКОКВІТКОВОГО (*DRACOSERPHALUM GRANDIFLORUM L.*)

Ю.А. Пасемків, М.І. Шанайда

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

На основі використання методу тримірної флуоресцентної спектроскопії здійснено аналіз пігментного складу трави *Dracoserphalum grandiflorum L.* В екстракті 1 (розчинник хлороформ-метанол у співвідношенні 97:3) виявлено суміш хлорофілів, каротиноїдів та агліконів флавонів, у екстракті 2 (розчинник метанол) – суміш хлорофілів, каротиноїдів, флавонолів, флавонів та антоціанінів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: *Dracoserphalum grandiflorum L.*, каротиноїди, хлорофіли, флавоноїди.

ВСТУП. Змієголовник великоквітковий (*Dracoserphalum grandiflorum L.*) належить до родини *Lamiaceae*, представники якої широко використовуються в офіциальній та народній медицині. Попередньо здійснивши аналіз кількісного вмісту та якісного складу ефірної олії, фенольних сполук, макро- і мікроелементів у траві *Dracoserphalum grandiflorum L.* [7], нами було визначено необхідність у вивченні пігментного складу надземної частини рослини. Як відомо, пігменти відіграють значну роль у життєдіяльності рослинного організму та знайшли застосування у медичній практиці [2, 5].

Одним із найважливіших пігментів на Землі є хлорофіл, який забезпечує вловлювання енергії сонячного світла і здійснення рослинами фотосинтезу. В організмі людини спожитий хлорофіл укріплює клітинні мембрани, сприяє регенерації сполучної тканини, підсилює імунну функцію організму тощо [5].

До групи рослинних пігментів належать також каротиноїди та деякі флавоноїди [2, 9]. Каротиноїди здатні трансформувати захоплену світлову енергію та виконують мембраностабілізуючу функцію. Одна з найважливіших функцій каротиноїдів – провітамінна активність, оскільки вони є попередниками ретинолу. Завдяки наявності подвійних зв'язків у молекулах каротиноїди здатні також інгібувати утворення вільних радикалів, запобігаючи їх негативній дії на організм.

Серед флавоноїдів найбільш відомими пігментами є антоціани, які надають органам рослин червоного чи синьо-фіолетового забарвлення, та жовті чи оранжеві флавоони, флавоноли, аурони і халкони. Науковці вва-

жають, що завдяки здатності поглинати ультрафіолетове випромінювання флавоноїди захищають рослинні клітини від впливу надлишкової радіації, а також беруть участь в окисно-відновних реакціях [3, 5]. В організмі людини вони проявляють антиоксидантну, протирадіаційну, Р-вітамінну та інші види активності.

У зв'язку з тим, що в літературних джерелах відсутня інформація стосовно вивчення вмісту пігментів у сировині представників роду *Dracoserphalum*, нами було сформульовано мету досліджень – проаналізувати якісний склад та кількісний вміст пігментів у траві *Dracoserphalum grandiflorum L.*

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Аналіз пігментного складу надземної частини *Dracoserphalum grandiflorum L.* проведено з використанням методу тримірної флуоресцентної спектроскопії (3DF-спектроскопія). Цей метод застосовують для якісного аналізу багатоконпонентних сумішей, які містять флуоресціюючі сполуки. 3DF-спектри реєстрували в ультрафіолетовому та видимому діапазонах за допомогою флуориметра Hitachi F4010. Вимірювання проводили в інтервалі довжин хвиль збудження (excitation) 250-750 нм; в інтервалі довжин хвиль флуоресценції (emission) 250-800 нм; крок сканування складав 10 нм, щільності збудження/флуоресценція – 5/5 нм. Для одержання екстракту 1 використано розчинник хлороформ-метанол (97:3), екстракту 2 – метанол. Тривимірні графіки було побудовано із застосуванням пакета програмного забезпечення Spekta Data Lab, розробленого на базі науково-дослідного інституту хімії Харківського національного університету імені М. Каразіна [6].

© Ю.А. Пасемків, М.І. Шанайда, 2010.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На основі аналізу отриманих тривимірних спектрів скануючої спектрофлуориметрії в екстракті 1 трави змієголовника великоквіткового встановлено наявність таких пігментів (рис. 1): агліконів флавонів, яким притаманні піки у ділянках $\lambda_{exc}=300-390$ нм, $\lambda_{em}=390-470$ нм, та

суміші хлорофілів, для яких характерні піки в ділянках $\lambda_{exc}=300-430, 450-520, 610-690$ нм, $\lambda_{em}=650-750$ нм. В екстракті 2 (рис. 2) виявлені піки у ділянках $\lambda_{exc}=240-270, 270-400$ нм, $\lambda_{em}=400-480$ нм, які характерні для флавонолів і флавонів, та $\lambda_{exc}=300-430, 450-520, 610-690$ нм, $\lambda_{em}=650-750$ нм, що властиві суміші хлорофілів.

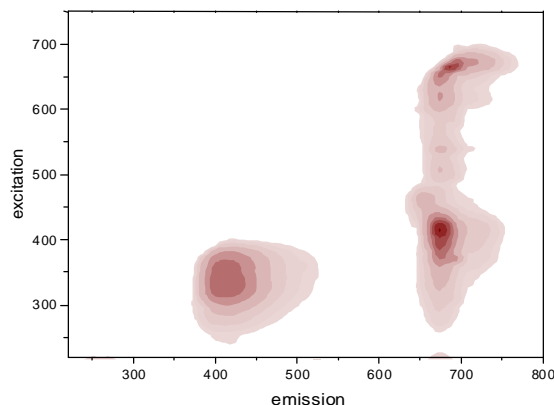
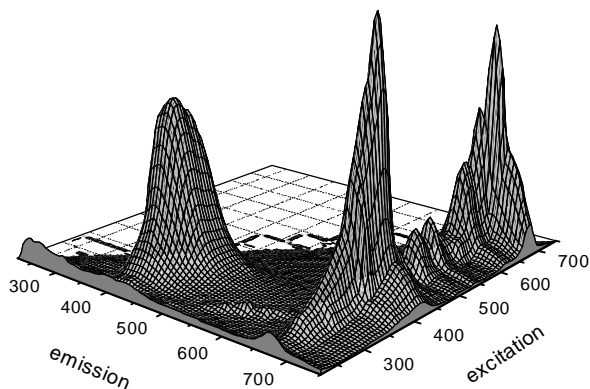


Рис. 1. Тривимірний спектр та проекція на площину ($\lambda_{exc}, \lambda_{em}$) екстракту 1 трави *Dracoscephalum grandiflorum* L.

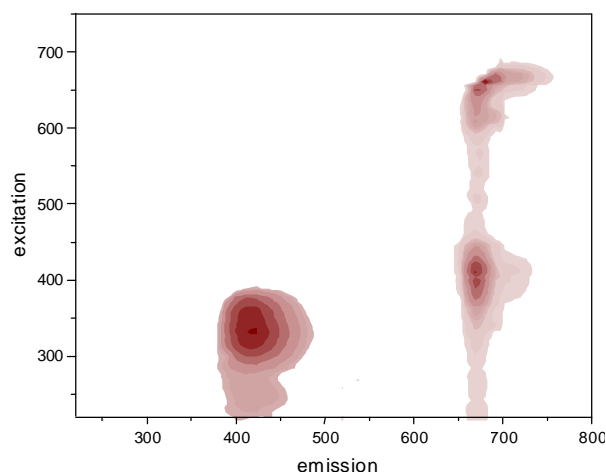
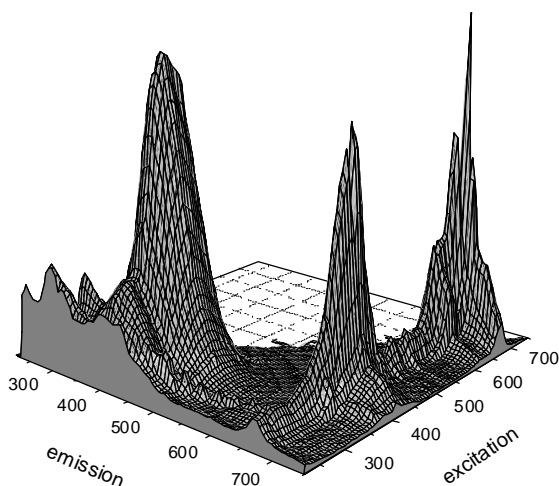


Рис. 2. Тривимірний спектр та проекція на площину ($\lambda_{exc}, \lambda_{em}$) екстракту 2 трави *Dracoscephalum grandiflorum* L.

У ході дослідження кількісного вмісту пігментів (у перерахунку на повітряно-суху сировину) в надземній частині *Dracoscephalum grandiflorum* L. отримано такі результати. В екстракті 1 вміст каротиноїдів становив 6,12 мг/г, хлорофілів – 11,47 мг/г. В екстракті 2 виявлено 1,52 мг/г каротиноїдів та 3,30 мг/г хлорофілів. Таким чином, в екстракті 1 каротиноїдів було в 4,03 раза більше, ніж в екстракті 2. Що стосується хлорофілів, то в екстракті 1 містилося у 3,48 раза більше цих сполук порівняно з екстрактом 2.

На основі порівняння отриманих нами даних із літературними відомостями [4] було з'ясовано, що в ліпофільних екстрактах (розчинник хлороформ) червоного листа винограду дикого методом спектрофотометрії виявлено 1,70 мг/г каротиноїдів і 1,57 мг/г хло-

рофілів. У досліджуваному нами екстракті 1 трави змієголовника великоквіткового міститься у декілька разів більше каротиноїдів, що вказує на перспективність подальших досліджень цієї сировини. На основі фотоколориметричного аналізу ацетонового екстракту листків кульбаби лікарської науковцями [8] було встановлено наявність 0,627 мг/г суми каротиноїдів, що також менше, ніж у досліджуваних нами екстрактах. Разом із тим, у ліпофільному екстракті трави пирію повзучого виявлено [1] значно вищу концентрацію каротиноїдів та хлорофілів порівняно з досліджуваною нами рослиною.

Що стосується вмісту флавоноїдів, то на основі аналізу отриманих спектрів скануючої спектрофлуориметрії в екстракті 1 трави *Dracoscephalum grandiflorum* L. (див. рис. 1)

встановлено наявність агліконів флавонів. Крім того, похідні флавону (апігенін та лютеолін) було ідентифіковано на основі наших попередніх досліджень [7] з використанням методу високоефективної рідинної хроматографії. В екстракті 2 ідентифіковано похідні флавонолів, флавонів та антоціанінів (див. рис. 2). Кількісний вміст флавонолів у екстракті 2 становив 26,49 мг/г, антоціанінів – 0,038 мг/г. У зв'язку з тим, що в надземній частині більшості представників родини *Lamiaceae* серед флавоноїдів домінують похідні флавону [3], отримані дані стосовно досить високого вмісту

флавонолів заслуговують подальшого поглибленого дослідження.

ВИСНОВОК. Отримані результати щодо вмісту пігментів у надземній частині зм'яголовника великоквіткового є надзвичайно цікавими в напрямку вивчення антиоксидантних властивостей досліджуваної рослини та можуть бути використані при розробці АНД на вказану сировину, а також нових лікарських речовин та біологічно активних добавок на основі лікарської рослинної сировини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Калушка О.Б., Марчишин С.М., Лукієнко О.В. Аналіз ліпофільної фракції надземних та підземних органів пирію повзучого // Мед. хімія. – 2008. – № 3 (7). – С. 89-91.
2. Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. – М.: Высшая школа, 1988. – С. 192-197.
3. Клышев Л.К., Бандюкова В.А., Алюкина Л.С. Флавоноиды растений. – Алма-Ата: Наука, 1978. – С. 96.
4. Кузнецова В.Ю., Кисличенко В.С., Адаменко К.В. Аналіз ліпофільних фракцій листя винограду дико-го // Фармац. часопис. – 2007. – № 2 (2). – С. 44-46.
5. Лебедева И.С., Сытник К.М. Пигменты растительного мира. – К.: Наукова думка, 1986. – С. 85-92.
6. Параніч В.А., Дорошенко А.О., Рошаль О.Д. та ін. Визначення видового походження рослинних олій // Фармац. журн. – 2000. – № 5. – С. 86-90.
7. Пасемків Ю., Шанайда М. Фармакогностичне вивчення трави *Dracosephalum grandiflorum* L. // Матер. XIII Міжнар. медичного конгресу студентів та молодих вчених (27-29 квітня 2009 р.). – Тернопіль: Укрмедкнига, 2009. – С. 222.
8. Цаль О.Я., Бензель Л.В. Дослідження каротиноїдів кульбаби лікарської // Мед. хімія. – 2006. – № 8, № 4. – С. 104-105.
9. Goodwin T.W. The Biochemistry of the Carotenoids // Plants. – 1980. – 1. – P. 1-377.

АНАЛИЗ ПИГМЕНТНОГО СОСТАВА ТРАВЫ ЗМЕЕГОЛОВНИКА КРУПНОЦВЕТКОВОГО (*DRACOSEPHALUM GRANDIFLORUM* L.)

Ю.А. Пасемків, М.И. Шанайда
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

На основании использования метода трехмерной флуоресцентной спектроскопии осуществлен анализ пигментного состава травы *Dracosephalum grandiflorum* L. В экстракте 1 (растворитель хлороформ-метанол в соотношении 97:3) обнаружена смесь хлорофиллов, каротиноидов и агликонов флавонов, в экстракте 2 (растворитель метанол) – смесь хлорофиллов, каротиноидов, флавонолов, флавонов и антоцианинов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Dracosephalum grandiflorum*, каротиноиды, хлорофиллы, флавоноиды.

ANALYSIS OF PIGMENTS CHEMICAL COMPONENTS OF *DRACOSEPHALUM GRANDIFLORUM* HERB

Yu.A. Pasemkiv, M.I. Shanayda
TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I. YA. HORBACHEVSKY

Summary

The result of research of the pigment composition of *Dracosephalum grandiflorum* L. herb by method based on three-dimensional spectroscopy are presented. There were revealed a mixture of chlorophyll, carotene and some flavones in the extract 1 (solvent chloroform-methanol in correlation 96:3). We also revealed a mixture of chlorophyll, carotene, flavones, flavonols and antocyanins in the extract 2 (solvent: methanol).

KEY WORDS: *Dracosephalum grandiflorum*, carotenoids, chlorophyll, flavonoids.

Отримано 27.11.2009 р.

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

ВИВЧЕННЯ БІЛОК-БІЛКОВИХ ВЗАЄМОДІЙ У СИСТЕМІ ГЕМОСТАЗУ З ВИКОРИСТАННЯМ МЕТОДУ ЕНЗИМ-ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

О.М. Савчук

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

У статті автор показав можливості й переваги використання методу ензим-електрофорезу для вивчення білок-білкових взаємодій між компонентами системи гемостазу. Проведено порівняльну характеристику практично здорових донорів, пацієнтів із карциномою Льюїс, регматогенним відшаруванням сітківки, а також після внутрішньовенного введення тромболітичного препарату – стрептокінази. На ряді прикладів продемонстрована можливість вирішення різноманітних завдань із застосуванням даного методу. Проведення ензим-електрофорезу дозволяє досліднику уникнути використання багатьох методологічних підходів для збору необхідної інформації, що значно економить час. Також у статті приділяється увага особливостям методу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ензим-електрофорез, гемостаз, ідентифікація білків, карцинома Льюїс, регматогенне відшарування сітківки, зміна отрута.

ВСТУП. Особливе місце в ієрархії методів білкової хімії займають методи електрофоретичного поділу зразків, які дозволяють якісно та кількісно аналізувати білкові суміші [22]. Серед усієї розмаїтості методів електрофорезу є категорія, яка показує, чи володіють аналізовані білки ферментативною активністю. Існує безліч методологічних підходів, спрямованих на ідентифікацію ферментів методами електрофорезу. Erickson [5], Brunner [1] запропонували використати метод фібринової аутографії для дослідження активаторів плазміногену та інгібіторів протеолітичних ферментів. Принцип методу полягає у фракціонуванні аналізованих об'єктів за допомогою ПААГ електрофорезу з наступним перенесенням розділених зразків на фібринову пластинку. Потім проводять інкубацію гелів для прояву ферментативної активності та їх фарбування.

Hanspal зі співавторами [7] запропонував метод дослідження інгібіторів протеолітичних ферментів, суть якого полягала в такому: 1) додавання до поділяючого гелю при полімеризації його субстрату (желатину або казеїну); 2) електрофоретичний поділ інгібіторів протеолітичних ферментів за присутності Дс-На; 3) відмивання гелю від залишків Дс-На в 2,5 % розчині (w/v) Тритону X-100; 4) інкубація гелю в розчині протеолітичного ферменту при 37 °С протягом 16 год; 5) фарбування субстрату, що

залишився після ферментативного гідролізу, за допомогою амідочорного.

Zhao, Russell [25] описали метод поділу та аналізу протеолітичних ферментів за допомогою 1D або 2D Дс-На ПААГ електрофорезу, в основі якого лежить здатність ферментів розщеплювати специфічні флуоресцентні субстрати. Запропонований у статті 4-methylcoumaryl-7-amide використовують для ідентифікації трипсину в аналізованих зразках. Wilkesman та Schroder [23] запропонували комбінацію ізоелектрофокусування та зимографії для аналізу серинових протеїназ.

Існують літературні дані, що описують метод визначення інгібіторів протеолітичних ферментів з використанням специфічних флуоресцентних субстратів, заполімеризованих у ПААГ [13]. Після електрофоретичного поділу гель інкубують з розчином досліджуваного ферменту та проводять візуалізацію зразків із застосуванням флуоресцентних технологій. Присутність інгібітора видно за проявом темно-блакитних плям на ясно-зеленому фоні.

Також описано методи електрофоретичного поділу біологічних зразків [2, 16, 20], коли в гель заполімеризовано один із субстратів – казеїн, колаген, желатин. Після електрофоретичного поділу відбувається інкубація даного гелю в буфері, найбільш прийнятному за своїми характеристиками для ферментативного розщеплення субстрату передбачуваним ферментом.

Однією з основних вимог до описаних вище методів виявлення активності ферментів

є попередження втрати функціональної активності білка, що не дозволить ідентифікувати його після проведення всіх біохімічних маніпуляцій. Звичайно, дані методи поділу та ідентифікації ферментів не дають можливості зберегти 100 % активність ферменту, але вони дозволяють зберегти нативність досліджуваного об'єкта на тому рівні, щоб із великим ступенем вірогідності й точності ідентифікувати його.

У даній статті запропоновано метод одномолярного ензим-електрофорезу в ПААГ із Дс-На, який оптимізовано для вивчення наявності в досліджуваному зразку ферментів та активаторів системи гемостазу. Новизна цього методу полягає в можливості достовірного визначення активаторів плазміногену, присутніх в аналізованому зразку. Даний метод відрізняється від методів імунодетекції, які відповідають на це ж запитання, тим, що в досліджуваному зразку виявляють активний активатор плазміногену. Описані на сьогодні методи ензим-електрофорезу не дозволяють відповісти на це запитання. Дана інформація є принциповою під час дослідження дисбалансу, що виникає в системі гемостазу при різних патологічних станах організму.

Другою особливістю вищевказаного методу є застосування як субстрату фібриногену та плазміногену. Використання даних білків дає можливість збільшити чутливість і специфічність методу відносно визначення ферментів системи гемостазу. Перетворення фібриногену в полімерний фібрин також збільшує чутливість методу стосовно тканинного активатора плазміногену, що іноді дозволяє визначати його залишкову кількість в досліджуваному зразку.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували тканинний активатор плазміногену, урокіназу, еластазу ("Sigma", США), стрептокіназу ("KabiPharmacia AC", Швеція).

Плазму крові мишей з карциномою Льюїс було отримано на лінії мишей C57B1/6 в Інституті експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Е. Кавецького НАН України; субретинальну рідину – в Інституті захворювань ока та тканинної терапії імені В.П. Філатова АМН України шляхом зовнішнього дренажу субретинального простору під час хірургічного втручання при регматогенному відшаруванні сітківки ока; кристалічну отруту щитомордника далекосхідного (*Agkistrodon halys halys*) – із серпентарію Трипільського біохімічного заводу.

За основу методу ензим-електрофорезу взято метод, описаний Heusen і Dowdle для

виявлення залишкової активності протеолітичних ферментів при одержанні моноклональних антитіл [9]. Модифікація в нашому випадку полягала в полімеризації в поділяючий гель фібриногену (в концентрації 1 мг/мл) і Глу-плазміногену (в концентрації 10 мкг/мл). Тільки фібриноген заполімеризовували в гель, коли аналізували активні форми ферментів, що мають відношення до функціонування системи гемостазу. Фібриноген і плазміноген заполімеризовували в гель у тому випадку, коли хотіли дослідити присутність можливих активаторів плазміногену в досліджуваному біологічному об'єкті. Наступна модифікація полягала в перетворенні заполімеризованого фібриногену у фібриновий гель (для цього використовували розчин тромбіну в концентрації 1 NIH/мл). Це необхідно для виявлення тканинного активатора плазміногену та частково урокінази [11]. Концентрація поділяючого гелю може становити від 11 до 15 %, що запобігає міграції білків, заполімеризованих у гель, при електрофоретичному поділі.

Методично вся процедура полягає в такому: 1) полімеризація ПААГ заданої концентрації з фібриногеном і плазміногеном (за необхідності); 2) електрофоретичний поділ аналізованих зразків у стандартних умовах [12]; 3) відмивання гелю в 2,5 % розчині тритону X-100 (для видалення з гелю залишків Дс-На) протягом 1 год на шейкері при 25 °С; 4) обробка гелю розчином тромбіну протягом 1 год на шейкері при 37 °С (у випадку заполімеризованих фібриногену та плазміногену), якщо в гель заполімеризовано тільки фібриноген, цей крок не роблять; 5) занурення пластини в 0,05 М фосфатний/Трис-НСІ буфер (рН 7,4) на 10-12 год для прояву ферментативної активності білків у досліджуваному зразку; 6) фарбування гелю відповідно до стандартного протоколу проведення диск-електрофорезу [26].

Чутливість методу становила $\leq 0,01$ м. о. активатора/ферменту на трек. Зразки, які аналізували, змішували з буфером для зразків у співвідношенні 1:1 та зберігали до проведення електрофоретичного аналізу при 4 °С. Буфер для зразків готували згідно з протоколом [12], єдиними відмінностями були використання сахарози замість гліцерину (до кінцевої концентрації 5 %) та відсутність відновлюючого агента (ДТТ), для попередження втрати зразком ферментативної активності. Обов'язковою умовою підготовки зразків для електрофоретичного розділення є повна відсутність термічної обробки зразка до електрофоретичного поділу, що також передуює втраті зразком ферментативної активності.

Метод вестерн-блоту проводили згідно зі стандартним протоколом [8] використовуючи моноклональні антитіла до плазміногену ("Merck KGaA", Німеччина).

Glu-плазміноген людини отримували із цитратної донорської плазми методом афінної хроматографії на Lys-сефарозі [4]. Плазмін одержували з препаратів Glu-плазміногену за стандартною методикою [19]. Міні-плазміноген отримували за методом, запропонованим March, Parikh і Cuatrecasas [14].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Метод апробовано на білках системи гемостазу людини, кроля, бика та свині. Для одержання оптимальних результатів необхідно використовувати фібриноген і плазміноген того виду ссавця, функціонування системи гемостазу якого аналізують. У процесі розробки методу було перевірено можливість усіх перерахованих видів тварин застосовувати плазміноген і фібриноген людини. Дані, отримані при аналізі, показали можливість використання такої модифікації цього методу, що значно спрощує аналіз і дозволяє застосовувати як маркери білки системи гемостазу людини.

При різних патологічних станах організму спостерігається підвищена активність ряду ферментів, що призводить до появи в кровотоці фрагментів білків, які за фізіологічного стану організму не утворюються. Так, наприклад, відомо, що при пухлинному рості відбувається надлишкова секреція еластази, що може спричинити появу в кровотоці деградованих форм плазміногену/плазміну, таких, як міні-плазміноген/плазмін із кринглами 1-3, 4 (ангіостатин) [3, 6, 10, 17].

Гідроліз, обмежений еластазою поліпептидного ланцюга плазміногену між N-кінцевим доменом і кринглами 1, 3 та 4, а також кринглами 4 і 5, дозволяє одержати фрагменти плазміногену: крингли 1-3, крингл 4 та Вал₄₄₂-плазміноген (міні-плазміноген), що складається з крингла 5 і серин-протеїназного домену [24].

Будучи "біологічно активними" молекулами, вільні крингли плазміногену/плазміну, з'являючись у кровотоці в значній кількості, можуть спровокувати метаболічні зміни у функціонуванні всіх систем організму, що, у свою чергу, викликає різні патологічні прояви. Виникнення міні-плазміногену, з огляду на його відмінності за властивостями і кінетикою від плазміну, призводить до порушення нормального функціонування всіх ланок системи гемостазу [15, 18, 21].

Використовуючи метод ензим-електрофорезу, нами було проаналізовано якісний склад

активних ферментів та активаторів плазміногену в плазмі крові мишей з карциномою Льюїс (рис. 1).

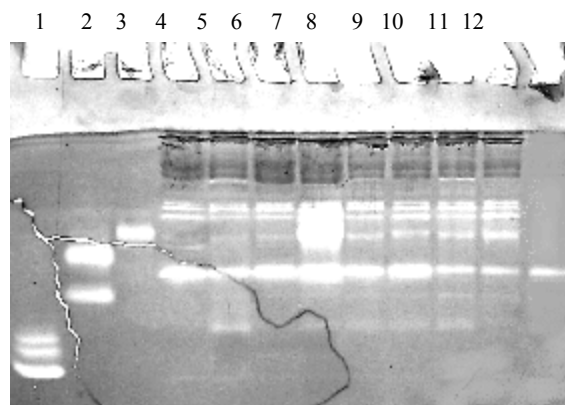


Рис. 1. Ензим-електрофореграма аналізу якісного складу активаторів плазміногену та активних ферментів у плазмі крові мишей з карциномою Льюїс: 1 – еластаза (31, 29, 27 кДа); 2 – урокіназа (56, 33 кДа); 3 – тканинний активатор плазміногену (70 кДа); 4-11 – досліджувані зразки плазми крові; 12 – міні-плазмін (36 кДа).

Проведення ензим-електрофорезу включало додавання в поліакриламідний гель фібриногену (1 мг/мл) і Глу-плазміногену (10 мкг/мл). Після відмивання гелю від Дс-На він був проінкубований з розчином тромбіну (1 НН/мл) для перетворення фібриногену у фібрин. Потім гель інкубували в 0,05 М Трис-НСІ буфері (рН 7,4) 12 год для прояву ферментативної активності. У цьому випадку виникнення активних зон у гелі свідчило про присутність як активаторів плазміногену, так і активних протеолітичних ферментів, які здатні розщеплювати фібрин. Як маркери застосовували такі білки, як еластаза (молекулярна маса – 27, 29 та 31 кДа), урокіназа (33 та 56 кДа), тканинний активатор плазміногену (70 кДа) та міні-плазмін (36 кДа). Таку кількість маркерів було використано для того, щоб більш повно оцінити присутність усіх активних ферментів в аналізованому зразку.

Як видно з наведеної електрофореграми (рис. 1), в усіх досліджуваних зразках плазми крові мишей з карциномою Льюїс виявлено активну зону, яка володіє ферментативною активністю, з молекулярною масою 31 кДа, що відповідає еластазі. Також у всіх зразках присутні активні зони, що відповідають за молекулярною масою міні-плазміну (36 кДа) і тканинному активатору плазміногену (70 кДа), залишкова кількість урокінази з молекулярною масою 33 кДа. В окремих зразках наявна високомолекулярна урокіназа, молекулярна маса якої становить 56 кДа.

Для з'ясування присутності тільки активних ферментів, здатних розщеплювати фібриноген, застосування методу ензим-електрофорезу виключало полімеризацію в поділяючий гель плазміногену та перетворення фібриногену в полімерний фібрин (під дією тромбіну). Даний аналіз плазми крові мишей з карциномою Льюїс показав присутність активних зон з молекулярною масою, що відповідає молекулярній масі плазміну (82 кДа) і міні-плазміну (36 кДа) (рис. 2).

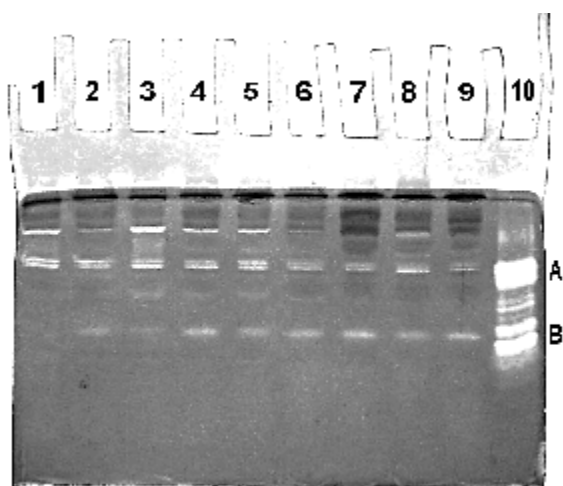


Рис. 2. Ензим-електрофореграма аналізу якісного складу активних ферментів у плазмі крові мишей з карциномою Льюїс: 1 – контроль (інтактна миша); 2-9 – досліджувані зразки плазми крові; 10 – маркерні білки: А – плазмін (82 кДа), В – міні-плазмін (36 кДа).

Отримані результати аналізу ензим-електрофореграм дозволяють стверджувати, що в плазмі крові мишей з карциномою Льюїс присутній активний міні-плазмін, що не може з'являтися в кровотоці при нормальному фізіологічному стані. Утворення міні-плазміну відбувається шляхом гідролізу нативного плазміногену присутньою в кровотоці еластазою, поява якої викликана прогресуванням пухлинного росту при даній патології. Для підтвердження того, що це дійсно міні-плазмін, а не інший активний фермент із подібною молекулярною масою, нами був проведений вестерн-блот даних зразків з використанням моноклональних антитіл проти плазміногену (рис. 3).

Особливістю цих моноклональних антитіл є їх здатність зв'язуватися тільки із серин-протеїназним доменом молекули плазміногену/плазміну, до того ж вони не здатні взаємодіяти з іншими ділянками даної молекули.

З літературних джерел відомо, що серин-протеїназний домен присутній не тільки в молекулі плазміногену/плазміну, але й у молекулі міні-плазміногену/плазміну, що зумовлює

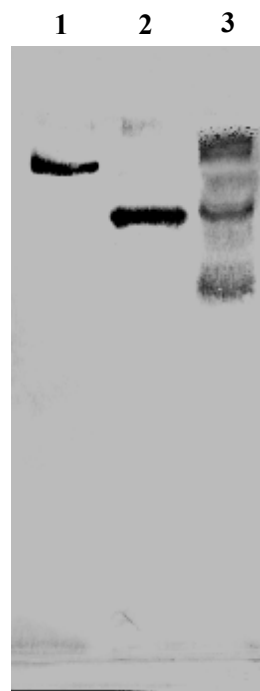


Рис. 3. Результати вестерн-блоту зразків плазми крові мишей з карциномою Льюїс (використовували моноклональні антитіла проти плазміногену): 1 – плазмін; 2 – міні-плазмін; 3 – досліджуваний зразок.

його ферментативну активність, подібну на плазмінову [18]. З огляду на це, аналіз даних, наведених на рисунку 3, свідчить про присутність у досліджуваному зразку міні-плазміногену/плазміну. Також дані вестерн-блоту доводять правдивість результатів ензим-електрофорезу як із заполімеризованим плазміногеном, так і без нього.

Поява під дією еластази міні-плазміногену/плазміну в кровотоці мишей може зумовлювати виникнення нових білок-білкових взаємодій між компонентами гемостатичного балансу. Даний феномен варто вивчити більш уважно для виявлення неспецифічних білкових взаємодій у системі гемостазу. Із практичної точки зору, ця інформація може допомогти у створенні ефективних протираккових препаратів для апробації їх на інших формах ракових пухлин.

Комплексний аналіз системи гемостазу в пацієнтів з гострим інфарктом міокарда, яким як тромболітичний препарат вводили стрептокіназу, показав, що через 1 год після введення тромболітика спостерігається різке збільшення фібринолітичного потенціалу плазми крові. У фізіологічних умовах ключовим активатором плазміногену, що на 90-95 % зумовлює фібринолітичний потенціал плазми крові, є тканинний активатор плазміногену, але в даній ситуації це може бути не так. Для з'ясування даного

феномена було розроблено модельні системи *in vivo*, на яких досліджено його появу [27].

Використовуючи ензим-електрофорез, було проаналізовано весь спектр можливих активаторів плазміногену, які перебувають у

плазмі крові при введенні у кровотік стрептокінази (рис. 4).

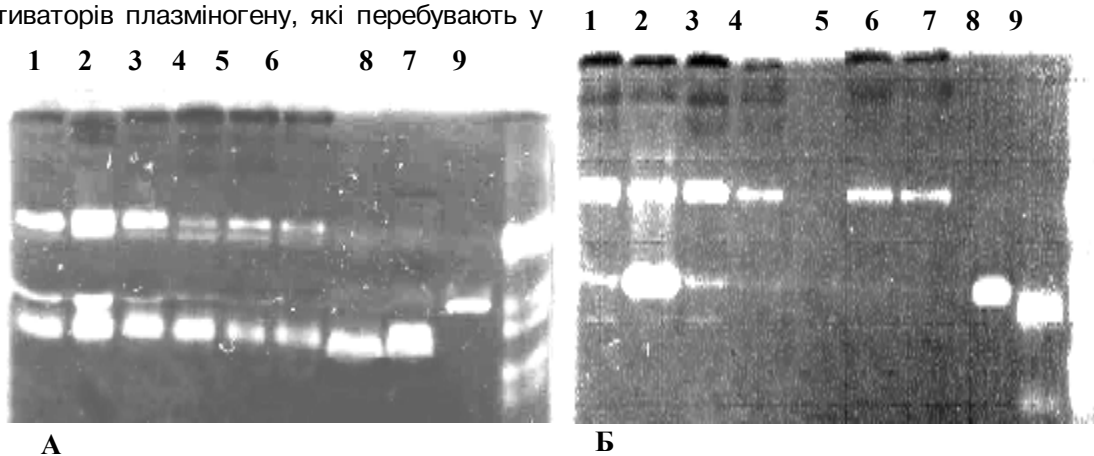


Рис. 4. Результати ензим-електрофорезу плазми крові кроля (А) та свині (Б): 1 – норма; 2 – 1 год після введення Ск; 3 – 4 год після введення Ск; 4 – 1-ша доба після введення Ск; 5 – 3-тя доба після введення Ск; 6 – 7-ма доба після введення Ск; 7 – тканинний активатор плазміногену; 8 – активатор плазміногену урокіназного типу; 9 – плазмін (на треті присутні мінорні зони, які утворились в результаті автокаталізу).

Для аналізу складу активаторів плазміногену в плазмі крові як модельні системи запропоновано гемостаз кроля і свині. Різниця між ними полягає в тому, що плазміноген свині, на відміну від плазміногену кроля, не активується стрептокіназою.

Отримані дані дозволяють зробити висновок про те, що через 1 год після введення у кровотік стрептокінази вірогідно збільшується активність тканинного активатора плазміногену (в 3-6 разів), що зумовлює різке підвищення фібринолітичного потенціалу плазми крові. Ці результати підтверджуються аналізом активності та вмісту тканинного активатора плазміногену в даних зразках з використанням специфічного хромогенного субстрату та поліклональних антитіл проти ТАП [27].

Як уже було сказано вище, зміїні отрути містять різноманітну кількість білків, які впливають на окремі компоненти системи гемостазу. Це й тромбіноподібні ферменти; активатори протромбіну, протеїну С, фактора Х, плазміногену; фібриноген/фібринолітики й т. д. Ідентифікація специфічності дії того або іншого одержуваного білка буває досить складною через те, що навіть у підвидів того самого виду змії іноді значно відрізняється білковий склад (за молекулярною масою та ізоелектричними точками). Застосування методу ензим-електрофорезу спрощує пошук можливих активаторів плазміногену та фібриноген/фібринолітиків, які отримують при фракціонуванні досліджуваної отрути.

Дослідження отрути *Agkistrodon halys halys* показало присутність білка з молекулярною масою 32 кДа, що за своїми характеристиками міг бути нефізіологічним активатором плазміногену [29].

Крім використання специфічного хромогенного плазмінового субстрату для характеристики можливої активаторної властивості отриманого білка, з метою перевірки цього факту було проведено ензим-електрофорез, щоб з'ясувати, чи є цей білок активатором плазміногену, чи, будучи за своєю природою протеолітичним ферментом, розщеплює молекулу плазміногену, що може призводити до появи невеликої кількості активного плазміну (рис. 5).

Аналіз отриманої ензим-електрофореграми дав змогу зробити такі висновки (рис. 5):

1. Отриманий білок є активатором плазміногену.

2. Даний протейн не розщеплює молекулу нативного плазміногену на фрагменти (в тому числі активні), а активує його до утворення активного плазміну.

Отримані смужки на електрофореграмі відповідають за молекулярною масою активному плазміну (82 кДа), що утворився в результаті інкубації плазміногену з активатором. Друга смужка відповідає молекулярній масі самого активатора (32 кДа), поява її пов'язана з тим, що в поділяючий гель (за умов проведення ензим-електрофорезу) було заполімеризовано плазміноген, який не володів спонтанною активністю.

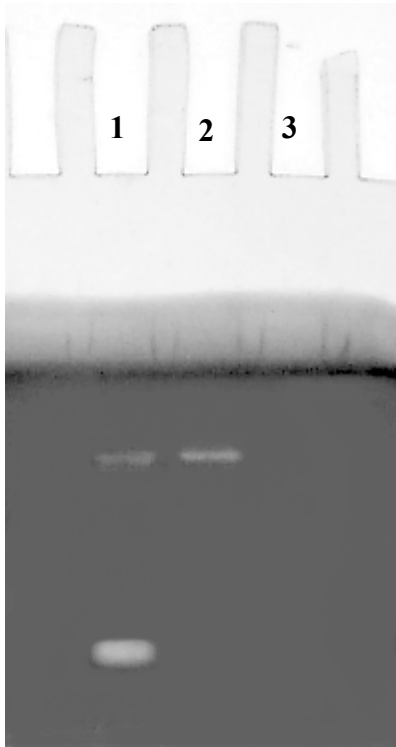


Рис. 5. Результати ензим-електрофорезу суміші плазміногену та активатора плазміногену, отриманого із зміної отрути: 1 – суміш плазміногену та активатора; 2 – плазмін (82 кДа); 3 – плазміноген, використаний для інкубації та полімеризації гелю при проведенні ензим-електрофорезу.

Застосування методу ензим-електрофорезу в даній ситуації дозволило відразу відповісти на ключові запитання, пов'язані з характеристикою отриманого зі зміної отрути активатора плазміногену.

Аналізуючи стан параметрів системи гемостазу при регматогенному відшаруванні сітківки, було досліджено субретинальну рідину [28]. Ця рідина накопичується в порожнині, що утворюється при патальгічному відшаруванні сітківки. Показано, що дана рідина володіє профібринолітичним ефектом – містить активатор, здатний перетворювати плазміноген в активний плазмін.

Для того, щоб визначити, який активатор плазміногену є присутнім у субретинальній

рідині, також було застосовано метод ензим-електрофорезу. Аналіз отриманих даних (рис. 6) дозволив стверджувати, що це активатор плазміногену урокіназного типу з молекулярною масою 56 кДа.



Рис. 6. Результати ензим-електрофорезу зразка субретинальної рідини: 1 – зразок субретинальної рідини; 2 – тканинний активатор плазміногену (70 кДа); 3 – активатор плазміногену урокіназного типу (56, 33 кДа).

ВИСНОВОК. Наведені приклади переконливо доводять інформативність, надійність та об'єктивність методу ензим-електрофорезу, що дає можливість використовувати його для вирішення завдань, пов'язаних з вивченням особливостей перебігу білок-білкових взаємодій у системі гемостазу при різних функціональних станах організму.

ЛІТЕРАТУРА

1. Brunner G., Schirrmacher V. Fibrin autography of plasminogen activator by electrophoretic transfer into fibrin agar gels // *Anal. Biochem.* – 1988. – **168**. – P. 411-416.
2. Bu C., Zhang C., Li Z. Autoantibodies to plasminogen and tissue plasminogen activator in women with recurrent pregnancy loss // *Clin. Exp. Immunol.* – 2007. – **149**. – P. 31-39.
3. Chandler W., Stratton J. Laboratory evaluation of fibrinolysis in patients with a history of myocardial infarction // *Am. J. Clin. Pathol.* – 1994. – **102**. – P. 248-252.
4. Deutsch D., Mertz E. Plasminogen: purification from human plasma by affinity chromatography // *Science.* – 1970. – **170**, № 3962. – P. 1095-1096.
5. Erickson L.A., Lawrence D.A., Loskutoff D.J. Reverse fibrin autography: a method to detect and partially characterize protease inhibitors after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // *Anal. Biochem.* – 1984. – **137**. – P. 454-463.
6. Genser N., Lechleitner P., Maier J. Rebound increase of plasminogen activator inhibitor type I after cessation of thrombolytic treatment for acute myocardial infarction is independent of type of plasminogen activator used // *Clin. Chem.* – 1998. – **44**. – P. 209-214.
7. Hanspal J.S., Bushell G.R., Ghosh P. Detection of protease inhibitors using substrate-containing sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // *Anal. Biochem.* – 1983. – **132**. – P. 288-293.
8. Harlow Ed., Lane D. *Antibodies* // Cold Spring Harbor Laboratory. – New York, 1988. – P. 345-405.
9. Heusen C., Dowdle E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates // *Anal. Biochem.* – 1980. – **102**. – P. 196-202.
10. Hoylaerts M., Rijken D.S., Lijnen H.R., Collen D. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin // *J. Biol. Chem.* – 1982. – **257**. – P. 2912-2919.
11. John J.A., Gold H.K., Leinbach R.C. Prevention of coronary artery reocclusion and reduction in late coronary artery stenosis after thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction. A randomized study of maintenance infusion of recombinant human tissue-type plasminogen activator // *Circulation.* – 1988. – **78**. – P. 546-556.
12. Laemmli K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**, № 1. – P. 680-685.
13. Le O.T., Katunuma N. Detection of protease inhibitors by a reverse zymography method, performed in a tris(hydroxymethyl)aminomethane-Tricine buffer system // *Anal. Biochem.* – 2004. – **324**. – P. 237-240.
14. March S.C., Parikh I., Cuatrecasas P. A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography // *Anal. Biochem.* – 1974. – **60**. – P. 149-152.
15. Markland F.S. Snake venoms and the hemostatic system // *Toxicon.* – 1998. – **36**. – P. 1749-1800.
16. Martinez M., Newbold C.J., Wallace R.J., Movano F.J. Effects of high-molecular-mass substrates on protein migration during sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis // *Electrophoresis* – 2002. – **23**. – P. 1-7.
17. Nilsen D.W., Goransson L., Larsen A.I. et al. Systemic thrombin generation and activity resistant to low molecular weight heparin administered prior to streptokinase in patients with acute myocardial infarction // *Tromb. Haemost.* – 1997. – **77**. – P. 57-61.
18. Ponting C.P., Marshall J.M., Cederholm-Williams S.A. Plasminogen: a structural review // *Blood.Coag.Fibrinolys.* – 1992. – **3**. – P. 605-614.
19. Robbins K.C., Summaria L. Plasminogen and plasmin // *Methods in Enzymology.* – New York – London: Acad. Press, 1976. – **45**, part B. – P. 257-273.
20. Vazquez Peyronel D., Cantera A.M. A simple and rapid technique for postelectrophoretic detection of proteases using azocasein // *Electrophoresis.* – 1995. – **16**. – P. 1894-1897.
21. Wang X., Lin X., Loy J.F. et al. Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase // *Science.* – 1998. – **5383**. – P. 1662-1665.
22. Westermeeier R., Naven T. *Proteomics in Practice: A Laboratory Manual of Proteome Analysis* (2002) Wiley-VCH Verlag GmbH. – P. 310.
23. Wilkesman J.G., Schroder H.C. Analysis of serine proteases from marine sponges by 2-D zymography // *Electrophoresis.* – 2007. – **28**. – P. 429-436.
24. Yamada S., Yamada R., Ishii A. Evaluation of tissue plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-I levels in acute myocardial infarction // *J. Cardiol.* – 1996. – **27**. – P. 171-178.
25. Zhao Z., Russell P.J. Trypsin activity assay in substrate-specific one- and two-dimensional gels: a powerful method to separate and characterize novel proteases in active form in biological samples // *Electrophoresis.* – 2003. – **24**. – P. 3284-3288.
26. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. – М.: Ньюдиамед, 2001. – С. 245-251.
27. Краснобрига Є.М., Савчук О.М., Волков Г.Л. Вплив стрептокінази на параметри системи гемостазу в модельних системах *in vivo* // *Укр. біохім. журн.* – 2004. – **76**, № 3. – С. 56-61.
28. Платонова Т.Н., Горницкая О.В., Метелицина И.П., Савчук А.Н. Компоненты системы свертывания и фибринолиза в субретинальной жидкости при регматогенном отслоении сетчатки глаза // *Мед. химия.* – 2001. – **3**, № 4. – С. 5-8.
29. Савчук А.Н., Левкив М.Ю., Карбовский В.Л. и др. Активатор плазминогена из яда щитомордника обыкновенного (*Agkistrodon halys halys*) // *Укр. биохим. журн.* – 2006. – **78**. – С. 32-37.

ИЗУЧЕНИЕ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В СИСТЕМЕ ГЕМОСТАЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ЭНЗИМ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

О.М. Савчук

КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

Резюме

В статье автором показаны возможности и преимущества использования метода энзим-электрофореза для изучения белок-белковых взаимодействий между компонентами системы гемостаза. Проведена сравнительная характеристика практически здоровых доноров, пациентов с карциномой Льюис, регматогенным отслоением сетчатки, а также после внутривенного введения тромболитического препарата – стрептокиназы. На целом ряде примеров продемонстрирована возможность решения различных задач с применением данного метода. Проведение энзим-электрофореза позволяет исследователю избежать использования многих методологических подходов для сбора необходимой информации, что значительно экономит время. Также в статье уделяется внимание особенностям метода.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: энзим-электрофорез, гемостаз, идентификация белков, карцинома Льюис, регматогенное отслоение сетчатки, змеиный яд.

THE INVESTIGATION OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS IN HEMOSTATIC SYSTEM USING ENZYME ELECTROPHORESIS METHOD

O.M. Savchuk

KYIV NATIONAL UNIVERSITY BY TARAS SHEVCHENKO

Summary

Present study shows the potentialities and advantages of enzyme electrophoresis method when studying protein-protein interactions between haemostatic system components. Comparative characteristic of practically healthy blood donors and patients with carcinoma Lewis, regmatogenic retina exfoliation as well as streptokinase intravenous syringe were carried out. Quite a number of examples demonstrate the possibility of different problem solving using present method. Enzyme electrophoresis setting allows investigator to avoid comprehensive approach and collect all information required, which significantly save time. Also authors gave consideration to method's particularities and it's resolution is shown.

KEY WORDS: enzyme electrophoretic method, haemostasis, carcinoma Lewis, regmatogenic retina exfoliation, snake venom.

Отримано 28.09.2009 р.

Адреса для листування: О.М. Савчук, вул. Волгоградська, 2/4, кв. 15, Київ, Україна.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

БІОХІМІЧНІ ПАРАЛЕЛІ ЗМІН ПОКАЗНИКІВ КРОВІ Й СУГЛОБОВОГО ВИПОТУ ХВОРИХ НА РІЗНИХ СТАДІЯХ ГОНАРТРОЗУ

Ф.С. Леонтьєва, В.О. Туляков, П.В. Болховітін
ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ ХРЕБТА ТА СУГЛОБІВ
ІМЕНІ ПРОФ. М.І. СИТЕНКА АМН УКРАЇНИ, ХАРКІВ

Стаття присвячена вивченню біохімічних показників суглобового випоту та сироватки крові на різних стадіях гонартрозу. На основі результатів досліджень показано, що динаміка вивчених показників у сироватці крові й суглобовому випоті на ранніх стадіях гонартрозу мала односпрямований характер і збігалася за часом, що дає можливість, у разі потреби, використовувати дані біохімічного аналізу сироватки крові хворих на гонартроз для характеристики процесу.

I стадія (за Келегреном–Лоуренсом) гонартрозу не супроводжувалася змінами рівня біохімічних тестів у сироватці крові та суглобовому випоті, за винятком підвищення вмісту хондроїтинсульфатів в обох середовищах. На II стадії захворювання це знаходило подальший розвиток, в сироватці крові зростала активність лужної фосфатази. На III стадії гонартрозу в 2,1 рази збільшувалася концентрація хондроїтинсульфатів у сироватці крові й у 3,5 рази – в суглобовому випоті, значно підвищувався вміст серолікоїдів і сіалових кислот, зростала активність фосфатаз, спостерігалася поява С-реактивного білка. На IV стадії гонартрозу мало місце зниження показників запалення, зростала активність обох фосфатаз в сироватці крові, а також кислій фосфатази в суглобовому випоті, збільшувався вміст хондроїтинсульфатів в обох досліджуваних середовищах.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гонартроз, біохімія, суглобовий випот, сироватка крові.

ВСТУП. Остеоартроз – широко розповсюджене захворювання суглобів, що призводить до їх патологічної перебудови в результаті запально-дистрофічного процесу, розвиненого у відповідь на ураження, викликане різними за механізмом дії факторами [8]. У діагностиці стадійності перебігу даного патологічного процесу суттєвого значення набувають клініко-лабораторні дослідження, зокрема біохімічний аналіз рідких середовищ хворого – крові, сечі, суглобового випоту [2].

В артрологічній практиці зустрічається цілий ряд захворювань, що супроводжуються появою суглобового випоту. Суглобовий випот, на відміну від синовіальної рідини, є патологічною рідиною, не має сталого складу, оскільки його клітинний склад, фізико-хімічні й біохімічні властивості залежать від природи патологічного процесу, стадії захворювання, характеру й активності запального процесу.

Дотепер залишається відкритим питання, чи існує залежність між змінами складу рідкої складової локальної закритої системи суглоба із вмістом біохімічних маркерів метаболізму суглоба в такій інтегральній системі, як периферична кров [10]. У зв'язку із широким

використанням біохімічних методів дослідження при гонартрозі, визнано доцільним зіставлення стадій розвитку гонартрозу, встановлених на основі клініко-рентгенологічних досліджень, з результатами синхронних біохімічних аналізів сироватки крові й випоту з ураженого суглоба. Встановлення такої залежності було б важливим для діагностики стадій гонартрозу без пунктування суглоба і могло б використовуватися з метою оцінки результатів оперативного й інших видів лікувальних заходів.

Для оцінки ступеня тяжкості патологічного процесу в суглобовому випоті визначають цілий ряд біохімічних тестів: вміст загального білка, глюкози, глікозаміногліканів, ревматоїдного фактора, активність кислій і лужної фосфатаз. Рівень більшості даних показників зростає при остеоартрозах [2]. Доведено, що ці показники корелюють між собою [11]. Наприклад, в роботі Sh. Sukenic et al. (1988), зазначено, що вміст С-реактивного білка в сироватці крові та суглобовому випоті був синхронно значно вищим при ревматоїдному артриті, ніж при остеоартрозі. Разом із тим, робіт, що присвячені вивченню зв'язку змін біохімічних показників зі стадіями остеоартрозу, недостатньо.

Відомо, що індикаторами як біосинтезу, так і деградації кісткової тканини суглобів є

© Ф.С. Леонтьєва, В.О. Туляков, П.В. Болховітін, 2010.

кісткові сіалопротейни [11]. Відповідно, рівень сіалових кислот як в суглобовому випоті, так і в сироватці крові відповідає стану перш за все кісткової тканини [11]. При деструктивній формі остеоартрозу буває підвищеною активність кислоти фосфатази у суглобовому випоті, чого не спостерігається при недеструктивних варіантах патології. Автори вважають, що стимуляторами резорбції кісткової тканини є кристали гідроксиапатиту, що містяться при остеоартрозі в синовії в підвищеній кількості на тлі відсутності клітин, характерних для запального процесу. Це вважають ознакою несприятливого перебігу захворювання [6].

Значну увагу дослідники приділяють визначенню вмісту в суглобовому випоті продуктів деградації протеогліканів, зокрема сульфатованих глікозаміногліканів. У роботі G. Carroll (1989) була встановлена пряма кореляція між вмістом імунореактивних протеогліканів і сульфатованих глікозаміногліканів у суглобовому випоті хворих на остеоартроз [7].

Метою нашої роботи було вивчення взаємозв'язку між рівнем деяких біохімічних маркерів дистрофічного та запального процесів у сироватці крові й суглобовому випоті пацієнтів із гонартрозом на різних стадіях захворювання.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У межах даного дослідження було обстежено 31 хворого на гонартроз, які лікувалися у клініці патології суглобів Інституту патології хребта та суглобів імені проф. М.І. Ситенка АМН України протягом 2008 р., з них 21 жінку та 10 чоловіків віком від 26 до 68 років. I стадія була у 5-ти пацієнтів, II стадія – у 8-ми, III стадія – у 12-ти, IV стадія – у 6-ти. Результати біохімічного дослідження сироватки крові порівнювали з даними контрольної групи, що складалась із 30 практично здорових людей відповідного віку і статі. Також ре-

зультати біохімічного обстеження пацієнтів із різними стадіями захворювання порівнювали між собою.

У сироватці крові й суглобовому випоті хворих визначали вміст загального білка, сероглікоїдів, активність лужної і кислоти фосфатаз [1], концентрацію хондроїтинсульфатів [4], С-реактивного білка, сіалових кислот [5].

Статистичний аналіз даних було здійснено за допомогою програмних пакетів Microsoft Excel XP та Statsoft Statistica 6.0. Порівняння груп проводили за параметричним критерієм Стьюдента [3]. Достовірною вважали різницю результатів при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати біохімічних досліджень наведено в таблицях 1, 2. З отриманих даних видно, що в міру зростання стадії захворювання відбувалися зміни хімічного складу досліджуваних біологічних рідин – сироватки крові й суглобового випоту.

I стадія гонартрозу не супроводжувалася істотними змінами рівня біохімічних тестів, за винятком зростання концентрації хондроїтинсульфатів у сироватці крові до верхніх меж норми і вище.

На II стадії гонартрозу в сироватці крові збільшувався вміст хондроїтинсульфатів порівняно зі значеннями показників контрольної групи. Вміст сероглікоїдів підвищувався лише в сироватці крові. Активність лужної та кислоти фосфатаз у сироватці крові також зростала.

Порівняно з попередньою стадією у сироватці крові спостерігалось підвищення маркера дистрофічних змін (вміст хондроїтинсульфатів). Мала місце активізація обміну речовин в кістковій тканині, що супроводжувалось зростанням активності як лужної, так і кислоти фосфатаз. У суглобовому випоті, порівняно з показниками хворих з II стадією захворювання,

Таблиця 1 – Біохімічні показники сироватки крові хворих на гонартроз залежно від стадії процесу

| Стадія гонартрозу | Загальний білок, г/л | Хондроїтин-сульфати, г/л | Сероглікоїди, г/л | Сіалові кислоти, ммоль/л | Активність лужної фосфатази, ммоль/л год | Активність кислоти фосфатази, ммоль/л год | С-реактивний білок, мг/л |
|------------------------|--------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|--|---|--------------------------|
| Контрольна група, n=30 | 72,2±1,0 | 0,080±0,008 | 0,40±0,02 | 2,00±0,10 | 1,00±0,05 | 0,23±0,02 | <6,0 |
| I стадія, n=5 | 65,2±1,5 ¹⁾ | 0,110±0,010 ¹⁾ | 0,43±0,02 | 2,10±0,30 | 0,95±0,05 | 0,28±0,02 | <6,0 |
| II стадія, n=8 | 79,2±2,1 ¹⁾²⁾ | 0,150±0,007 ¹⁾²⁾ | 0,48±0,02 ¹⁾ | 2,40±0,10 ¹⁾ | 1,25±0,05 ¹⁾²⁾ | 0,51±0,03 ¹⁾²⁾ | <6,0 |
| III стадія, n=12 | 68,2±1,5 ¹⁾²⁾ | 0,210±0,007 ¹⁾²⁾ | 0,64±0,02 ¹⁾²⁾ | 3,20±0,29 ¹⁾ | 2,27±0,06 ¹⁾²⁾ | 0,70±0,04 ¹⁾²⁾ | 34,0±1,8 ¹⁾²⁾ |
| IV стадія, n=6 | 82,2±1,2 ¹⁾²⁾ | 0,340±0,020 ¹⁾²⁾ | 0,54±0,01 ¹⁾²⁾ | 2,50±0,24 ¹⁾²⁾ | 3,82±0,24 ¹⁾²⁾ | 1,00±0,04 ¹⁾²⁾ | 34,0±1,2 ¹⁾ |

Примітка. ¹⁾ – $p < 0,05$ порівняно з даними контрольної групи; ²⁾ – $p < 0,05$ порівняно із даними групи хворих із попередньою стадією захворювання.

Таблиця 2 – Біохімічні показники суглобового випоту хворих на гонартроз залежно від стадії процесу

| Стадія гонартрозу | Загальний білок, г/л | Хондроїтин-сульфати, г/л | Сероглікоїди, г/л | Сіалові кислоти, ммоль/л | Активність лужної фосфатази, ммоль/год л | Активність кислої фосфатази, ммоль/год л | С-реактивний білок, мг/л |
|-------------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|--|--|--------------------------|
| I стадія, n=5 | 28,2±1,3 | 0,150±0,010 | 0,30±0,02 | 2,11±0,06 | 2,60±0,10 | 0,35±0,09 | <6,0 |
| II стадія, n=8 | 32,5±1,0 | 0,250±0,010 ¹⁾ | 0,40±0,01 ¹⁾ | 2,31±0,11 ¹⁾ | 2,20±0,20 ¹⁾ | 0,37±0,02 | 6,0±1,2 |
| III стадія, n=12 | 60,0±0,7 ¹⁾ | 0,320±0,020 ¹⁾ | 0,76±0,01 ¹⁾ | 2,91±0,13 ¹⁾ | 1,80±0,14 | 0,50±0,04 ¹⁾ | 18,0±1,2 ¹⁾ |
| IV стадія, n=6 | 46,2±1,7 ¹⁾ | 0,380±0,020 ¹⁾ | 0,61±0,03 ¹⁾ | 2,62±0,10 ¹⁾ | 1,30±0,11 ¹⁾ | 0,72±0,05 ¹⁾ | 18,0±1,8 |

Примітка. ¹⁾ – $p < 0,05$ порівняно з даними групи хворих із попередньою стадією захворювання.

також спостерігалися збільшення вмісту хондроїтинсульфатів та сероглікоїдів і, водночас, зменшення активності лужної фосфатази. Разом із тим, зміни активності кислої фосфатази не було зафіксовано.

Метаболізм сполучної тканини на даній стадії в цілому характеризувався прогресуванням дистрофічного процесу при помірній активації запалення. Можна припустити збільшення проникності синовіальної мембрани для біологічно активних речовин, що пояснюється підвищенням активності лужної фосфатази в сироватці крові при зниженні її в суглобовому випоті.

На III стадії гонартрозу спостерігалися більш виражені зміни досліджуваних показників. Так, концентрація хондроїтинсульфатів у сироватці крові підвищувалася у 2,1 раза порівняно з такою в осіб контрольної групи. Значно зростали значення гострофазових показників – вмісту сероглікоїдів і сіалових кислот у сироватці крові. Мало місце підвищення активності лужної і кислої фосфатаз у сироватці крові. Синхронно спостерігалось збільшення концентрації С-реактивного білка вище 6 мг/л, що є ознакою гострого запалення, а також руйнування суглобового хряща.

Порівняно з показниками хворих на попередній стадії захворювання зафіксовано збільшення відхилень у сироватці крові зазначених вище показників від таких в осіб контрольної групи. До цього додалось підвищення концентрації С-реактивного білка, яке на попередніх стадіях не виявлено. У суглобовому випоті картина також була аналогічною, за винятком зменшення активності лужної фосфатази.

На IV стадії гонартрозу маніфестували всі метаболічні ознаки деструктивно-дистрофічного процесу, що супроводжувався запальними ускладненнями. Про це свідчить значне збільшення вмісту хондроїтинсульфатів у сироватці крові при досить високих значеннях маркерів запалення, хоча й менших, ніж на III

стадії. При цьому суттєво зростала активність обох фосфатаз у сироватці крові, що є показником глибоких альтеративних змін у колінних суглобах. Рівень загального білка у сироватці крові був високим, але залишався в межах норми.

Порівняно з результатами біохімічного обстеження пацієнтів із III стадією гонартрозу у хворих з IV стадією захворювання спостерігалось деяке зниження активності запального процесу, про що свідчить зменшення вмісту сіалових кислот, сероглікоїдів у сироватці крові та суглобовому випоті на фоні зростання у ній вмісту хондроїтинсульфатів. Відзначено зменшення вмісту загального білка в суглобовому випоті, що в сукупності з наведеними даними є непрямою ознакою зниження продукування білків гострої фази. Разом із тим, вміст загального білка в сироватці крові був значно вищим, ніж у хворих з III стадією захворювання, що може свідчити про більше проникнення із суглобового випоту до крові білків, характерних для остеоартритичного процесу.

Зафіксовано підвищення активності кислої фосфатази в сироватці крові й суглобовому випоті порівняно з такою в осіб із III стадією гонартрозу. Активність лужної фосфатази збільшувалася в сироватці крові зі зниженням цього показника в суглобовому випоті. Переважання в суглобовому випоті колінного суглоба активності кислої фосфатази над активністю лужної фосфатази свідчить про розвиток остеопоротичних змін у кістковій тканині, що покрита хрящем. Разом із тим, підвищення проникності синовіальної мембрани призводило до більшого і нерівномірного переходу зазначених ферментів у сироватку крові зі зростанням реєстрації їх активності в цій біологічній рідині. В цілому розбалансування величин активності лужної і кислої фосфатаз у суглобовому випоті, що має місце зі збільшенням стадійності перебігу захворювання, можна розглядати як непряму ознаку прогресування дистрофічного процесу.

ВИСНОВКИ. 1. Значення біохімічних показників як суглобового випоту, так і сироватки крові хворих на гонартроз залежать від стадій захворювання. Їх зміни є кількісно різними, але одночасними й однаково направленими, що дає можливість використовувати дані біохімічного аналізу сироватки крові хворих для характеристики деструктивно-дистрофічного та запального процесів із визначенням стадії захворювання, а також оцінки ефективності лікувальних заходів.

2. Ознакою I стадії гонартрозу є відсутність істотних змін досліджуваних біохімічних показників, за винятком незначного підвищення концентрації хондроїтинсульфатів у сироватці крові.

3. Розвиток гонартрозу до II стадії переважно супроводжується поступовим розвитком деструктивно-дистрофічного процесу з підвищенням вмісту хондроїтинсульфатів у сироватці крові. Вираження запальних змін при цьому є

помірним, що підтверджується збільшенням концентрації сероглікоїдів і зростанням активності лужної фосфатази в сироватці крові хворих.

4. На III стадії гонартрозу спостерігається максимальна активізація деструктивно-дистрофічних і запальних змін із значним збільшенням у сироватці крові й суглобовому випоті концентрації хондроїтинсульфатів та активності лужної і кислої фосфатаз, вмісту сероглікоїдів і сіалових кислот із зростанням концентрації С-реактивного білка вище 6 мг/л.

5. На IV стадії гонартрозу виявлено подальше прогресування деструктивно-дистрофічних змін при затиханні запальних процесів, про що свідчить підвищення вмісту хондроїтинсульфатів в обох досліджуваних біологічних рідинах при помірному зменшенні вираження маркерів запалення. Триває перебудова кісткової тканини із зростанням активності обох фосфатаз у сироватці крові, а також кислої фосфатази в суглобовому випоті.

ЛІТЕРАТУРА

1. Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика: Справочник в 2-х т. – Минск: Интерсервис, 2003. – Т. 1. – 495 с.
2. Корж Н.А., Хвисьюк А.Н., Дедух Н.В. и др. Остеоартроз. Консервативная терапия / Под ред. Н.А. Коржа, Н.В. Дедух, И.А. Зупанца. – Х.: Золотые страницы, 2007. – 424 с.
3. Лапач С.Н., Губенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2000. – 320 с.
4. Левченко В.І., Новожитська Ю.М., Сахнюк В.В. та ін. Біохімічні методи дослідження крові хворих // Методичні рекомендації для лікарів хіміко-токсикологічних відділів державних лабораторій ветеринарної медицини України. – К., 2004. – 104 с.
5. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник / Под ред. А.И. Карпищенко. – СПб.: Интермедика, 1999. – Т. 2. – С. 307.
6. Alwan W.H., Dieppe P.A., Elson C.J., Bradfield J.W.B. Bone resorbing activity in synovial fluids in destructive osteoarthritis and rheumatoid arthritis // Ann. Rheum. Dis. – 1988. – **47**. – P. 198-205.

7. Carroll G. Measurement of Sulphated glycosaminoglycans and proteoglycan fragments in arthritic synovial fluid // Ann. Rheum. Dis. – 1989. – **48**. – P. 17-24.

8. Kerin A., Patwari P., Kuettner K. et al. Molecular basis of osteoarthritis: biomechanical aspects // Cell. Mol. Life Sci. – 2002. – **59**. – P. 27-35.

9. Lohmander L.S. The role of molecular markers to monitor breakdown and repair / Reginster J.Y., Pelletier J.P., Martel-Pelletier J., Henrotin Y. (eds.) // Osteoarthritis. Clinical and experimental aspects. – Springer. – 1999. – P. 296-311.

10. Mort J.S., Billington C.J. Articular cartilage and changes in arthritis: Matrix degradation // Arthritis Res. – 2001. – **3**. – P. 337-341.

11. Sukenic Sh., Henkin J.H., Zimlichman Sh. et al. Serum and Synovial Fluid Levels of Serum Amyloid A Protein and C-Reactive Protein in Inflammatory and Noninflammatory Arthritis // J. Rheum. – 1988. – **15**, № 6. – P. 942-945.

ХИМИЧЕСКИЕ ПАРАЛЛЕЛИ ИЗМЕНЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ И СУСТАВНОГО ВЫПОТА БОЛЬНЫХ НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ГОНАРТРОЗА

Ф.С. Леонтьева, В.А. Туляков, П.В. Болховитин
ИНСТИТУТ ПАТОЛОГИИ ПОЗВОНОЧНИКА И СУСТАВОВ
ИМЕНИ ПРОФ. М.И. СИТЕНКО АМН УКРАИНЫ, ХАРЬКОВ

Резюме

Статья посвящена изучению биохимических показателей суставного выпота и сыворотки крови на различных стадиях гонартроза. На основании результатов исследований показано, что динамика изученных показателей в сыворотке крови и суставном выпоте на ранних стадиях гонартроза носила однонаправ-

ленный характер и совпадала по времени, что дает возможность, в случае необходимости, использовать данные биохимического анализа сыворотки крови больных гонартрозом для характеристики процесса.

I стадия (по Келегрэну–Лоуренсу) гонартроза не сопровождалась изменениями уровня биохимических тестов в сыворотке крови и суставном выпоте, за исключением повышения содержания хондроитинсульфатов в обеих средах. На II стадии заболевания это находило дальнейшее развитие, в сыворотке крови нарастала активность щелочной фосфатазы. На III стадии гонартроза в 2,1 раза увеличивалась концентрация хондроитинсульфатов в сыворотке крови, значительно повышалось содержание серогликоидов и сиаловых кислот, росла активность фосфатаз, наблюдалось появление С-реактивного белка. На IV стадии гонартроза имело место снижение показателей воспаления, росла активность обеих фосфатаз в сыворотке крови, а также кислой фосфатазы в суставном выпоте, увеличивалось содержание хондроитинсульфатов в обеих исследуемых средах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гонартроз, биохимия, суставной выпот, сыворотка крови.

THE BIOCHEMICAL PARALLELS OF THE BLOOD AND ARTHRAL EXUDATE PARAMETERS CHANGE IN THE PATIENTS WITH DIFFERENT STAGES OF OSTEOARTHRISIS

F.S. Leontjeva, V.A. Tuljakov, P.V. Bolhovitin

INSTITUTE OF SPINE AND JOINT PATHOLOGY BY SITENKO'S OF AMS OF UKRAINE, KHARKIV

Summary

The article is devoted to the study of biochemical indexes of arthral exudate and of blood serum at the different stages of gonarthrosis. It is rotined on the basis of results of researches, that the dynamics of the studied indexes in the whey of blood and arthral exudate Including at the early stages of gonarthrosis carried same directed character and synchronized, that enables, in the case of necessity, to use information of biochemical analysis of blood serum of patients with gonarthrosis of large joints for description of process.

The I stage (by Kelegren–Lowrence) of gonarthrosis was not accompanied by the changes of level of biochemical tests, except for the increase of maintenance of chondroitinsulfates in both environments. At the II stage of disease it found further development, activity of alkaline phosphatase grew in the blood serum. At the III stage of gonarthrosis in 2,1 time the concentration of chondroitinsulfates was multiplied in the blood serum, maintenance of seroglycoides and syalic acids rose considerably, activity of phosphatases grew, there was appearance of the C-reactive protein. At IV stage of gonarthrosis there was the decline of indexes of inflammation, activity of both phosphatases grew in the blood serum, and also acid phosphatase in a arthral exudate, maintenance of chondroitinsulfates was multiplied in both explored environments.

KEY WORDS: gonarthrosis, arthral exudate, biochemistry, blood serum.

Отримано 29.12.2009 р.

Адреса для листування: Ф.С. Леонтьєва, Інститут патології хребта та суглобів імені проф. М.І. Ситенка АМН України, вул. Пушкінська, 80, Харків, 61002, Україна.

ХРОМАТО-МАС-СПЕКТРОМЕТРИЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФІРНИХ ОЛІЙ ЛИСТКІВ, КОРЕНЕВИЩ І КОРЕНІВ ТА ПЛОДІВ ЛЮБИСТКУ ЛІКАРСЬКОГО (*LEVISTICUM OFFICINALE* KOCH.)

Н.В. Челін, С.М. Марчишин
 ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
 ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Вивчено якісний склад та кількісний вміст ефірних олій листків, кореневищ і коренів та плодів любистку лікарського. В ефірній олії листків ідентифіковано 32 компоненти, у кореневищах і коренях – 24, у плодах – 39. Домінуючими компонентами ефірних олій любистку лікарського є фталіди.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: любисток лікарський, ефірні олії, фталіди.

ВСТУП. Великий практичний інтерес науковців у напрямку пошуку нових джерел лікарської рослинної сировини викликають малодосліджені ефіроолійні рослини родини *Ariaceae*, до складу якої входять 235 родів та близько 3000 видів рослин [1]. Одним з таких перспективних видів, вартих уваги, є представник роду *Levisticum* – любисток лікарський (*Levisticum officinale* W.D.J. Koch.), що походить з гірських областей Південної Європи [3, 4]. Любисток широко культивують в Україні лише як пряну, ефіроолійну та декоративну рослину з приємним ароматом і неперевершеними смаковими якостями.

Levisticum officinale – неофіційна лікарська рослина, проте її цінні лікувальні властивості давно використовує народна медицина, де любисток зарекомендував себе як діуретичний, протизапальний, спазмолітичний, протимікробний, ранозагоювальний, болетамувальний засіб [4, 5]. Корені любистку офіційні у країнах Європи, входять до складу препарату “Канефрон”, який успішно використовують у світовій медицині для лікування хронічних захворювань нирок [7].

Така широка фармакологічна активність любистку лікарського зумовлена комплексом біологічно активних речовин, основними з яких є ефірні олії [3, 5]. Проте склад ефірних олій підземної і надземної частин *Levisticum officinale* у нашій країні ще не вивчали, що підтверджує перспективність його наукового дослідження з метою створення нових фітопрепаратів вітчизняного виробництва.

Мета нашого дослідження – вивчення компонентного складу ефірних олій листків, кореневищ і коренів та плодів любистку лікарського та їх порівняльний аналіз.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Заготівлю сировини проводили на дослідних ділянках ботанічного саду Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського (с. Дружба, Тернопільська обл.). Листки любистку заготовляли протягом періоду вегетації; кореневища і корені викопували восени (коли рослина досягає три-чотирирічного віку); плоди збирали у період дозрівання.

Ефірну олію одержували із сухої сировини методом перегонки з водяною парою за методикою ДФУ [2, 6]. Компонентний склад ефірної олії визначали на газовому хромато-мас-спектрографі Agilent Technology 6890N. Умови аналізу: хроматографічна колонка кварцова, капілярна HP-5MS; довжина колонки – 30 м; внутрішній діаметр – 0,25 мм; температура випаровувача – 2500 °С; газ-носіє – гелій; швидкість газу-носія – 1 мл/хв; об'єм проби – 0,1-0,5 мкл (для розчинів ефірних олій); введення проби з поділом потоку 1/50; температура термостата – 50 °С з програмуванням 3 °С/хв до 220 °С; температура детектора і випаровувача – 250 °С.

Компоненти ефірних олій ідентифікували за результатами порівняння отриманих у процесі хроматографування мас-спектрів хімічних речовин, що входять до складу досліджуваних сумішей, з даними бібліотеки мас-спектрів NIST02 (понад 174 000 речовин). Індокси утримування (IU) компонентів розраховували за результатами контрольних аналізів ефірних

олій з додаванням суміші нормальних алканів (C10-C18) [8].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У результаті проведеного хромато-мас-спектрометричного аналізу ефірних олій надземних та підземних органів любистку лікарського нами вперше виявлено наявність:

- у листках – 65 компонентів, з них 32 речовини було ідентифіковано;

- у плодах – 58, з них ідентифіковано 39 сполук;

- у кореневищах і коренях – 75 речовин, ідентифіковано 24 компоненти.

Порівняльний якісний склад домінуючих компонентів ефірних олій різних частин любистку лікарського наведено у таблиці 1.

Таблиця 1 – **Якісний склад та кількісний вміст компонентів ефірної олії листків, кореневищ і коренів та плодів любистку лікарського**

| Компонент | Кількісний вміст компонента ефірної олії, % | | |
|----------------------------|---|--------|---------------------|
| | листки | плоди | кореневища і корені |
| α -пінен | 0,490 | – | 0,120 |
| β -пінен | – | – | 0,674 |
| γ -терпінен | 1,252 | – | – |
| α -феландрен | 0,623 | – | – |
| β -феландрен | 14,200 | 1,753 | 3,762 |
| мірцен | 4,639 | – | 0,132 |
| β -елемен | 0,108 | – | 0,227 |
| елемол | 0,182 | 0,262 | 0,295 |
| α -терпінеол | 1,195 | 0,179 | 0,387 |
| α -терпінеолацетат | 46,666 | 2,875 | 3,238 |
| бутиліденфталід | 1,059 | 3,969 | 6,819 |
| бутилідендигідрофталід | 10,734 | 51,701 | 44,737 |
| ізо-бутилідендигідрофталід | 1,527 | 6,438 | 4,645 |
| каріофілен | 0,405 | – | – |
| камфомен | 0,148 | – | – |
| сабінен | 1,023 | – | – |
| гермакрен В | – | 0,375 | 0,337 |
| гермакрен D | 1,089 | – | – |
| сквален | – | 1,314 | 0,205 |
| фенілацетальдегід | 0,427 | – | 0,109 |
| 1,3,5-ундекатрієн | 0,578 | – | 7,186 |
| борнілацетат | 0,131 | – | – |
| геранілацетат | 3,334 | – | – |
| октаналь | – | – | 0,359 |
| фітол | 0,441 | 0,161 | – |

Компонентний склад ефірних олій листків, кореневищ і коренів та плодів практично однаковий, проте існують відмінності щодо кількісного вмісту окремих компонентів.

З монотерпеноїдів визначено: ациклічні – мірцен (4,6 %), геранілацетат (3,3 %), переважна кількість яких міститься у листках; моноциклічні – γ -терпінен (1,2 %), α -феландрен (0,6 %) і β -феландрен (14 %), α -терпінеол (1,19 %), α -терпінеолацетат (46,6 %), що містяться в усіх частинах рослини, проте найбільше їх виявлено у листках. Невелику кількість біциклічних монотерпенів виявлено в листках та корене-

вищах і коренях любистку, серед них α -пінен (0,49 %) і β -пінен (0,67 %), сабінен (1 %). В усіх частинах рослини встановлено незначну кількість циклічних сесквітерпеноїдів – елемолу (до 0,3 %), β -елемену (0,2 %); сесквітерпенових лактонів – гермакрону В (0,37 %), гермакрону D (1 %).

Отже, компонентний склад ефірних олій найбільш різноманітний у листках любистку лікарського – в них міститься велика кількість монотерпеноїдів, сесквітерпеноїдів, ароматичних сполук. У плодах переважають циклічні сесквітерпени. Кореневища і корені містять

незначну кількість монотерпеноїдів і сесквітерпеноїдів.

Незважаючи на досить широкий якісний склад ефірних олій усіх частин любистку лікарського, головними їх компонентами є фталіди. Серед них ідентифіковано бутиліденфталід, бутилідендигідрофталід, ізо-бутилідендигідрофталід. Велика кількість бутилідендигідрофталіду міститься у плодах (51,7 %) та кореневищах і коренях рослини (44,7 %), набагато менше його у листках (10,7 %). У плодах та кореневищах і коренях є до 7 % бутиліденфталіду та ізо-бутилідендигідрофталіду, в листках їх кількість коливається в межах 1-1,5 %.

За даними різних авторів [4, 5, 9], широка фармакологічна активність любистку лікарського зумовлена наявністю в усіх частинах рослини саме фталідних компонентів ефірної олії. Діуретичний ефект фталідів проявляється розширенням капілярів нирок, впливом на клітини ниркового епітелію, внаслідок чого зменшуються реабсорбція іонів Na^+ і відповідна кількість води [7]. Ефірна олія любистку проявляє антибактеріальну активність до широкого спектра мікроорганізмів, а також проти-запальну, антисептичну дію та виражену спазмолітичну активність [3, 9]. Така висока фармакологічна активність ефірної олії *Levisticum officinale* проявляється завдяки

тому, що вона легко реагує з рецепторами тканин внаслідок доброї розчинності у жирах та впливає на фізіологічні механізми діяльності органів [7].

ВИСНОВКИ. 1. Методом хромато-мас-спектроскопії проведено вивчення компонентного складу ефірних олій листків, кореневищ і коренів та плодів любистку лікарського.

2. Вперше ідентифіковано: у листках – 32 компоненти ефірної олії; у кореневищах і коренях – 24 речовини; у плодах – 39. Компонентний склад найбільш різноманітний у листках любистку лікарського, у плодах переважають циклічні сесквітерпени, кореневища і корені містять незначну кількість монотерпеноїдів і сесквітерпеноїдів.

3. Домінуючими компонентами ефірних олій є фталіди: у плодах міститься 51,7 % бутилідендигідрофталіду, в кореневищах і коренях – 44,7 %, у листках – 10,7 %. У підземних органах та плодах виявлено до 7 % бутиліденфталіду та ізо-бутилідендигідрофталіду, в листках – 1-1,5 %.

4. Любисток лікарський, проявляючи широкий спектр фармакологічної активності, є перспективною ефіроолійною сировиною для створення нових фітопрепаратів вітчизняного виробництва.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гоцуля А.С., Доля В.С., Мозуль В.І. Фармакогностичне та мікробіологічне дослідження рослин родини Аріасеае // Фармац. часопис. – 2007. – № 1. – С. 98-100.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків: РІГЕР, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.
3. Ковальов В.М., Павлій О.І., Ісакова Т.І. Фармакогнозія з основами біохімії рослин: Підруч. для студ. вищ. фармац. навч. закл. та фармац. ф-тів вищих мед. навч. закл. III-IV рівнів акред. (2-ге вид.). – Х.: Вид-во НФаУ, МТК-книга, 2004. – 704 с.
4. Кьосев П.А. Полный справочник лекарственных растений. – М.: ЭКСМО – Пресс, 2001. – 992 с.
5. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А.М. Гродзінський. – К.: Видавництво “Українська Радянська Енциклопедія”

ім. М.П. Бажана, Український виробничо-комерційний центр “Олімп”, 1992. – 544 с.

6. Молчан Н.В., Рудакова І.П., Самылина І.А. Определение эфирного масла в лекарственном растительном сырье // Фармация. – 2009. – № 5. – С. 3-4.

7. Пасечников С.П., Никитин О.Д. Фитопрепарат Канефрон Н в урологической практике: гармония растительной терапии // Здоровье мужчины. – 2005. – № 2 (13).

8. Черногород Л.Б., Виноградов Б.А. Эфирные масла некоторых видов рода *Achillea* L., содержащие фразанол // Растительные ресурсы. – 2006. – 42, вып. 2. – С. 61-68.

9. Liang-Quing G., Taniguchi M., Xiao Y.Q. et al. Inhibitory effect of natural furanocoumarins on human microsomal cytochrome P 450 A3 activity // Jpn. J. Pharmacol. – 2000. – № 82. – P. 122-129.

ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ ЛИСТЬЕВ, КОРНЕВИЩ И КОРНЕЙ, ПЛОДОВ ЛЮБИСТКА ЛЕКАРСТВЕННОГО (LEVISTICUM OFFICINALE KOCH.)

Н.В. Челин, С.М. Марчишин

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

Изучены качественный состав и количественное содержание эфирных масел листьев, корневищ и корней, плодов любистка лекарственного. В эфирном масле листьев идентифицированы 32 компонента, в корневищах и корнях – 24, в плодах – 39. Доминирующими компонентами эфирных масел любистка лекарственного являются фталиды.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: любисток лекарственный, эфирные масла, фталиды.

CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY OF VOLATILE OILS OF LEAVES, RHIZOMES, ROOTS AND FRUITS OF LOVAGE (LEVISTICUM OFFICINALE KOCH.)

N.V. Chelin, S.M. Marchyshyn

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.Y. HORBACHEVSKY

Summary

There was investigated the qualitative composition and quantitative content of volatile oils of leaves, rhizomes, roots and fruits of lovage (*Levisticum officinale*). In leaves essence there was identified 32 components, rhizomes and roots essence contain 24 components and 39 components found in fruits. The dominant essence components of *Levisticum officinale* are phthalids.

KEY WORDS: lovage (*Levisticum officinale*), volatile oils, phthalids.

Отримано 04.11.2009 р.

Адреса для листування: Н.В. Челін, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, м. Волі, 1, 46001, Україна.

ВПЛИВ 1 % ХІНОЛІНФЛАГІНОВОЇ МАЗІ НА ШВИДКІСТЬ ЗАГОСННЯ РОГІВКИ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ЕРОЗІЇ У КРОЛИКІВ

О.В. Погребняк

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Наведено результати вивчення впливу 1 % хінолінфлагінової мазі на інтактну рогівку та швидкість регенерації її поверхневого епітелію в умовах експериментальної ерозії рогівки. Досліджувана речовина не проявляє місцевоподразнюючої дії на тканини ока, прискорює регенерацію епітелію рогової оболонки та за ефективністю не поступається 1 % вольтареновій мазі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: 1 % хінолінфлагінова мазь, рогівка, регенерація.

ВСТУП. Згідно з даними досліджень останніх років, встановлено, що пошкодження рогової оболонки ока займає одне з перших місць не лише серед очних захворювань, але і в структурі загального травматизму [3, 6]. Пояснюється це тим, що рогівка як зовнішня оболонка очного яблука зазнає дії фізичних, механічних, хімічних чинників зовнішнього середовища [4]. Як відомо, деякі лікарські речовини, які застосовують в офтальмології, внаслідок токсичної дії викликають подразнення ока, відчуття печіння, світлобоязнь, сльозотечу, а також значно уповільнюють репаративну регенерацію епітелію рогівки [1, 8]. У зв'язку з цим, пошук речовин, що проявляють протизапальну і регенераторну дії та не мають побічних ефектів, продовжує залишатися актуальною проблемою сучасної фармакології.

Метою даної роботи було вивчення ефективності 1 % хінолінфлагінової мазі – нової похідної хінолінкарбонових кислот в умовах експериментальної ерозії рогівки.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Ерозію рогівки викликали за методом Б.Л. Радзіховського, К.С. Тітенко, Т.Д. Ловля [2].

Під місцевою анестезією 0,5 % розчину дикаїну шляхом легкого притиснення корнеосклерального трипана з діаметром ріжучої коронки 6 мм до рогівки в її центральній зоні наносили мітку, яку фарбували флуоресцеїном. У межах мітки зішкрябували епітелій рогової оболонки без порушення боуменової мембрани.

При експериментальному дослідженні тварин (кроликів) поділили на 4 групи: 1-ша – 5

кроликів, на яких вивчили вплив 1 % хінолінфлагінової мазі на інтактну рогівку (контролем слугували початкові дані щодо стану рогової оболонки кожної тварини); 2-га – 5 кроликів з експериментальною ерозією поверхневого епітелію (контроль, без лікування); 3-тя – 5 кроликів з експериментальною ерозією поверхневого епітелію, яким проводили лікування 1 % хінолінфлагіновою маззю; 4-та – 5 кроликів з експериментальною ерозією поверхневого епітелію, яким проводили лікування 1 % вольтареновою маззю.

Мазь закладали за нижню повіку відразу після нанесення ерозії, а також через 12, 24, 36, 48 год.

Огляд очей проводили щодня. При цьому фіксували стан рогівки, кон'юнктиви очного яблука і повік, судин, вологи передньої камери і райдужної оболонки. При огляді використовували бокове освітлення, біомікроскопію, фарбування флуоресцеїном (загальноприйняті методи клінічного дослідження очей) [5, 7].

Тваринам контрольної групи протягом 10 днів інстилювали в очі фізіологічний розчин, а експериментальним тваринам за повіки закладали 1 % хінолінфлагінову мазь.

Вплив 1 % хінолінфлагінової та 1 % вольтаренової мазей на регенерацію поверхневого епітелію рогової оболонки оцінювали за зміною діаметра ерозій і швидкості їх епітелізації. Ерозії рогівки вимірювали відразу після фарбування флуоресцеїном, а потім через 12, 24, 36 і 48 год.

Результати опрацювали методами непараметричної статистики з використанням t-критерію Стьюдента [6].

Утримування щурів і всі маніпуляції над ними проводили за загальними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, яка схвалена на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2001), і вимогами Закону України № 3447IV від 21.02.2006 р. "Про захист тварин від жорстокого поводження".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В результаті проведеного дослідження встановлено, що 1 % хінолінфлагінова та 1 % вольтаренова мазі подразнення або пошкодження структур ока, зокрема рогової оболонки, в інтактних тварин не викликали. Протягом усього експерименту кон'юнктива очного яблука і повік залишалася блідо-рожевого кольору, рогівка зберігала свої основні властивості (сферичність, прозорість, дзеркальність), не змінювалась її чутливість, волога передньої камери була прозорою, райдужка зберігала звичайний колір і малюнок. При дослідженні репаративної регенерації епітелію рогівки в умовах експериментальної ерозії спостереження показали, що у тварин контрольної групи, без лікування, діаметр ерозій зменшувався значно повільніше, ніж у кроликів, які отримували 1 % хінолінфлагінову та 1 % вольтаренову мазі. Так, в контрольній групі епітелізація дефекту рогівки наставала через $(37,0 \pm 1,3)$ год. У тварин, які отримували 1 % хінолінфлагінову мазь, епітелізація рогівки достовірно скорочувалась до $(30,0 \pm 1,5)$ год ($p < 0,05$), а в кроликів, яких лікували 1 % вольтареновою маззю, епітелізація рогівки наставала через $(31,0 \pm 1,4)$ год ($p < 0,05$). Середню швидкість загоєння ерозії рогівки визначали

як відношення діаметра ерозії до часу, що характеризує тривалість загоєння (рис. 1).

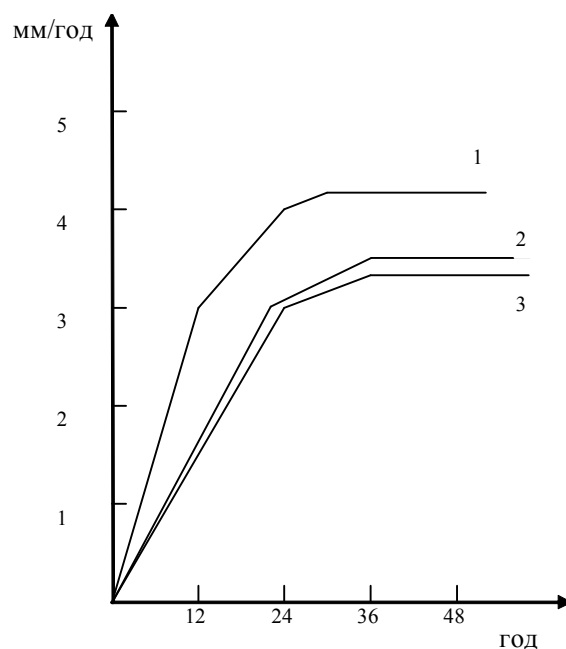


Рис. 1. Швидкість загоєння експериментальних ерозій рогівки при застосуванні хінолінфлагінової мазі.

Примітка. 1 – контроль (без лікування); 2 – лікування 1 % вольтареновою маззю; 3 – лікування 1 % хінолінфлагіноюю маззю.

По осі абсцис – години спостереження; по осі ординат – швидкість загоєння ран, мм/год.

ВИСНОВКИ. 1. Досліджувана 1 % хінолінфлагінова мазь не проявляє місцевоподразнюючої дії на тканини ока, а також прискорює процеси регенерації переднього епітелію рогової оболонки в умовах експериментальної ерозії.

2. За ефективністю загоєння ерозії рогової оболонки 1 % хінолінфлагінова мазь не поступається 1 % вольтареновій мазі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бездетко П.А., Бачук Н.Ю., Смелянская М.В. Эффективность применения хлорофиллипта в комплексном лечении заболеваний роговицы // Офтальмол. журн. – 2001. – № 1. – С. 47-50.
2. Западнюк В.И., Западнюк И.П. Лабораторные животные. – К.: Вища школа, 1999. – 382 с.
3. Малиновский Г.Ф., Моторный В.В. Практическое руководство по лечению заболеваний слезных органов и патологии роговицы // Белорусская наука. – Минск, 2007. – 192 с.
4. Полянская Н.К., Степкина Н.А. Лечение герпетических кератитов // Сборник научных трудов. Новые методы диагностики и исследования. – Воронеж, 2008. – С. 59-61.

5. Полянская Н.К., Шаталов М.М. Современные проблемы лечения патологии роговицы // Труды научно-практической конференции. Регенеративная медицина и трансплантация тканей в офтальмологии. – М., 2005. – С. 58-59.

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

7. Cornish K.M., Williamson G., Sanderson J. Quercetin metabolism in the lens: role in inhibition of hydrogen peroxide induced cataract // Free Radic Biol Med. – 2006. – № 1. – P. 63-70.

8. Graymore C.N. Biochemistry of the eye. – London–New York, 2005. – P. 381-389.

ВЛИЯНИЕ 1 % ХИНОЛИНФЛАГИНОВОЙ МАЗИ НА СКОРОСТЬ ЗАЖИВЛЕНИЯ РОГОВИЦЫ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭРОЗИИ У КРОЛИКОВ

А.В. Погребняк
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Приведены результаты изучения влияния 1 % хинолинфлагиновой мази на интактную роговицу и скорость регенерации ее поверхностного эпителия в условиях экспериментальной эрозии роговицы. Исследуемое вещество не проявляет местнораздражающего действия на ткани глаза, ускоряет регенерацию эпителия роговой оболочки и по эффективности не уступает 1 % вольтареновой мази.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: 1 % хинолинфлагиновая мазь, роговица, регенерация.

INFLUENCE 1 % CHYNOLINFLAGINOVOY OF OINTMENT ON SPEED OF CICATRIZATION OF CORNEA IN THE CONDITIONS OF EXPERIMENTAL EROSION FOR RABBIT

O.V. Pogrebnyak
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

Results are resulted study of influence of 1 % chinolineflagyn ointment on an intact cornea and speed of regeneration of its superficial epithelium in the conditions of experimental erosion of cornea. The probed matter does not give a local irritant effect on fabric of eye, accelerates the regeneration of epithelium of cornea and 1 does not enter after efficiency 1 % voltarenum ointments.

KEY WORDS: 1 % chinolineflagyn ointment, cornea, regeneration.

Отримано 27.11.2009 р.

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

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У ГОНАДЕКТОМОВАНИХ САМОК ЩУРІВ ПРИ МОДЕЛЮВАННІ НЕКРОТИЧНОГО ПОШКОДЖЕННЯ МІОКАРДА ТА КОРЕКЦІЇ

М.Р. Хара, В.Є. Пелих

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

В експериментах на самках щурів вивчено вплив замісної гормонотерапії на ступінь метаболічних змін в серці гонадектомованих тварин при моделюванні некротичного процесу. Встановили, що розвиток некротичного процесу в міокарді гонадектомованих щурів супроводжується інтенсивнішим, ніж у тварин зі збереженими гонадами, накопиченням продуктів перекисного окиснення ліпідів та депресією ферментативної ланки антиоксидантного захисту. Комбінована замісна гормонотерапія гексестролом та прогестероном забезпечує кращий, ніж монотерапія гексестролом, кардіопротекторний ефект за умов гіперадrenalінемії, про що свідчить мінімальна відмінність від абсолютних значень показників перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту міокарда тварин зі збереженими гонадами.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: міокард, некроз, гонадектомія, гормонозамісна терапія.

ВСТУП. Серцево-судинна патологія в останні роки є домінуючою в практиці лікаря. Сучасна тенденція до зниження захворюваності стосується, головним чином, чоловіків, а для жінок через менопаузу та збільшення з віком соціальної активності ця проблема стає все актуальнішою [9]. На сьогодні в літературі є безсумнівні дані про те, що у жінок ішемічну хворобу серця не завжди вчасно діагностують, а ті, що мають встановлений діагноз, не отримують адекватного медикаментозного лікування і не свідомі щодо серйозності прогнозу хвороби [10, 11].

Як відомо, патологія серця, що виникає на основі некрозу чи дистрофії, у жіночому організмі є наслідком гормонального дисбалансу, зменшення кардіо- та вазопротекторних властивостей естрогенів, порушення вегетативної регуляції функцій серця [2, 4, 7]. В наукових джерелах обговорюється питання кардіальних ефектів естрадіолу та прогестерону, рецепторних зокрема, показана неузгодженість наукових даних щодо їх трактування [1], що свідчить про необхідність більш детального дослідження.

Враховуючи сказане вище, метою дослідження стало вивчення впливу замісної гормонотерапії на ступінь метаболічних змін в серці гонадектомованих самок при моделюванні некротичного процесу.

© М.Р. Хара, В.Є. Пелих, 2010.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У крові та міокарді шлуночків статевозрілих самок щурів вивчали активність перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) за вмістом малонового діальдегіду (МДА), дієнових (ДК) та трієнових (ТК) кон'югатів [6], активність антиоксидантної системи (АОС) – за активністю каталази (КАТ) [5], супероксиддисмутази (СОД) [8] та вмістом церулоплазміну (ЦП) [3]. Двобічну гонадектомію (ГЕ) проводили з використанням наркозу (кетамін – 80 мг/кг внутрішньоочеревинно). Для гормонозамісної терапії застосовували 0,02 % олійний розчин гексестролу (Г) (“Синестрол” Біофарма, Україна) в дозі 0,1 мг/кг та 0,5 % розчин прогестерону (ПГ) (“Прогестерон” Фармак, Україна) в дозі 0,5 мл/кг, які вводили внутрішньоочеревинно щоденно протягом 4-х тижнів після гонадектомії. Некротичне пошкодження міокарда викликали одноразовим внутрішньом'язовим уведенням 1 мг/кг адреналіну. Всі експерименти виконували з дотриманням правил біоетики.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Введення адреналіну викликало розвиток некротичного процесу в міокарді, про що свідчило зростання концентрації продуктів ПОЛ. Абсолютні значення показників збільшувалися до 24 год спостереження. Інтенсивніше пошкодуючому впливу адреналіну піддавалося серце гонадектомованих самок. Про це свідчило суттєве переважання концентрації МДА, ДК і ТК в

міокарді шлуночків (табл. 1) та крові (табл. 2). Так, на 1 год розвитку некротичного процесу вміст МДА в міокарді та крові ГЕ щурів був більшим, ніж у тварин зі збереженими яєчниками, в 2,0 та 1,9 раза, ДК – в 6,3 та 2,0 рази, ТК – в 6,3 та 1,9 раза відповідно. До 24 год спостереження відмінність між показниками тварин порівнюваних груп становила за вмістом МДА 2,5 та 2,6 раза, за вмістом ДК – 6,8 та 1,8 раза, за вмістом ТК – 6,8 та 1,8 раза відповідно.

Вміст продуктів ПОЛ зростав інтенсивніше в міокарді, ніж у крові, що, на відміну від тварин зі збереженими гонадами, було наслідком суттєвої депресії ферментативної ланки АОС. Зокрема, активність КАТ в міокарді на 1 год зменшилася на 18,9 %, на 24 год розвитку некротичного процесу – в 2,4 раза, СОД – на 71,6 % та в 14,4 раза. Порівняльний аналіз показав, що на обох етапах експерименту активність АОС в міокарді та крові гонадектомованих щурів була суттєво нижчою, ніж у тварин зі збереженими гонадами. Зокрема, на 1 год розвитку некротичного процесу за показником активності КАТ ця відмінність становила 34,9 % в міокарді, 9,4 % в крові, на 24 год –

3,0 раза та 12,4 % відповідно. Активність СОД у гонадектомованих особин на 1 год спостереження в міокарді була на 42,6 % більшою, на 24 год – у 8,2 раза меншою, а концентрація ЦП була нижчою на обох етапах спостереження. На відміну від міокарда, в крові гонадектомованих щурів спостерігали певний дисонанс у реакції АОС. На тлі зростання активності КАТ, що реєстрували на 1 та 24 год спостереження (на 43,2 і 81,7 % відповідно), концентрація ЦП на 1 год експерименту зменшилася на 46,4 %, а на 24 год підвищилась і переважала значення контролю на 27,7 %.

Застосування різних схем замісної гормонотерапії мало різні ефекти. На 1 год розвитку некротичного процесу вміст МДА в міокарді гонадектомованих тварин, яким вводили лише гексестрол, був більшим за показник особин зі збереженими гонадами на 71,5 %, а в тих, які отримували гексестрол та прогестерон, – тільки на 16,3 %. На 24 год спостереження аналогічне порівняння виявило відмінність, що становила 30,5 та 8,9 % відповідно. Більш суттєву за амплітудою відмінність встановили, аналізуючи вміст ДК та ТК як в міокарді, так і в крові.

Таблиця 1 – Показники активності перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантної системи в міокарді шлуночків гонадектомованих самок щурів (n=6, M±m)

| Термін після введення адреналіну | Група спостереження | | | |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| | Тварини зі збереженими гонадами | ГЕ | ГЕ+Г | ГЕ+Г+ПГ |
| МДА, ммоль/кг | | | | |
| Контроль | 0,493±0,010 | 0,699±0,031* | 0,506±0,017 | 0,152±0,003* |
| 1 год | 0,529±0,007# | 1,065±0,027*# | 0,907±0,011*# | 0,615±0,010*# |
| 24 год | 0,872±0,007# | 2,146±0,010*# | 1,138±0,013*# | 0,950±0,008*# |
| ДК, уо/кг·10 ⁻³ | | | | |
| Контроль | 0,261±0,003 | 0,900±0,006* | 1,640±0,001* | 0,253±0,012 |
| 1 год | 0,292±0,002# | 1,827±0,003*# | 2,061±0,003*# | 0,371±0,002*# |
| 24 год | 0,309±0,003# | 2,088±0,007*# | 2,163±0,005*# | 0,386±0,003*# |
| ТК, уо/ кг·10 ⁻³ | | | | |
| Контроль | 0,279±0,001 | 0,898±0,005* | 1,630±0,002* | 0,271±0,005 |
| 1 год | 0,290±0,003# | 1,819±0,003*# | 2,065±0,003*# | 0,371±0,003*# |
| 24 год | 0,309±0,002# | 2,094±0,002*# | 2,180±0,003*# | 0,395±0,003*# |
| КАТ, мкат/кг | | | | |
| Контроль | 2,991±0,179 | 3,798±0,060* | 3,198±0,026 | 1,723±0,026* |
| 1 год | 4,313±0,022# | 3,196±0,038*# | 4,008±0,064*# | 4,218±0,013*# |
| 24 год | 4,645±0,046 | 1,574±0,036*# | 3,591±0,004*# | 4,312±0,085*# |
| СОД, уо | | | | |
| Контроль | 8,4±0,4 | 46,0±0,6* | 20,8±0,4* | 8,4±0,7 |
| 1 год | 18,8±0,7# | 26,8±0,4*# | 22,7±0,4*# | 20,6±0,6# |
| 24 год | 26,2±0,2# | 3,2±0,2*# | 10,1±0,3*# | 30,0±0,3*# |

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – достовірна відмінність відносно контрольного показника в межах аналогічного періоду спостереження (по горизонталі); # – достовірна відмінність відносно контрольного показника в межах однієї групи (по вертикалі).

Таблиця 2 – Показники активності перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантної системи в крові гонадектомованих самок щурів (n=6, M±m)

| Термін після введення адреналіну | Група спостереження | | | |
|----------------------------------|---------------------------------|----------------|----------------|-----------------|
| | Тварини зі збереженими гонадами | ГЕ | ГЕ+Г | ГЕ+Г+ПГ |
| МДА, ммоль/л | | | | |
| Контроль | 5,354±0,064 | 6,597±0,170* | 14,307±0,170* | 4,583±0,149* |
| 1 год | 5,811±0,124# | 11,041±0,053*# | 15,735±0,180*# | 7,368±0,152*# |
| 24 год | 6,354±0,111# | 16,406±0,083*# | 14,735±0,111* | 7,439±0,111*# |
| ДК, уо/л·10 ⁻³ | | | | |
| Контроль | 1,910±0,035 | 3,000±0,027* | 4,430±0,015* | 2,958±0,129* |
| 1 год | 2,777±0,048# | 5,440±0,129*# | 5,127±0,039*# | 3,397±0,084*# |
| 24 год | 4,290±0,023# | 7,580±0,026*# | 5,633±0,045*# | 4,503±0,032*# |
| ТК, уо/л·10 ⁻³ | | | | |
| Контроль | 1,973±0,037 | 2,990±0,027* | 4,395±0,015* | 2,983±0,074* |
| 1 год | 2,773±0,052# | 5,393±0,131*# | 5,160±0,039*# | 3,480±0,084*# |
| 24 год | 4,313±0,019# | 7,540±0,032*# | 5,553±0,061*# | 4,360±0,032# |
| КАТ, мкат/л | | | | |
| Контроль | 39,508±0,837 | 31,062±1,488* | 40,259±1,302 | 65,597±4,093* |
| 1 год | 48,674±0,848# | 44,482±1,209*# | 47,548±1,937# | 77,237±3,148*# |
| 24 год | 63,438±1,695# | 56,431±1,574*# | 57,808±3,148# | 104,980±0,484*# |
| ЦП, мг/л | | | | |
| Контроль | 4,769±0,119 | 8,553±0,206* | 12,556±0,087* | 19,611±0,911* |
| 1 год | 7,496±0,071# | 5,841±0,098*# | 13,417±0,155*# | 25,185±0,621*# |
| 24 год | 18,360±0,198# | 10,923±0,141*# | 15,910±0,226*# | 23,508±0,565*# |

Показники активності АОС також підтверджували кращий кардіопротекторний ефект комбінованої гормонотерапії. На обох етапах спостереження за тваринами (1 та 24 год розвитку некротичного процесу) активність КАТ та СОД в міокарді мала мінімальну відмінність від абсолютних значень щурів зі збереженими гонадами при аналогічній динаміці, чого не можна сказати про ефекти монотерапії гексестролом.

Деяко інша картина спостерігалася в крові тварин. При застосуванні гексестролу активність КАТ у процесі розвитку некротичного процесу в міокарді була аналогічною до групи щурів зі збереженими гонадами, а вміст ЦП відрізнявся несуттєво. Використання ж комбінованої гормонотерапії сприяло тому, що моделювання патологічного процесу відбувалося на фоні високої активності КАТ та вмісту ЦП у крові гонадектомованих тварин. Із зростанням аналізованих показників у динаміці роз-

витку некротичного процесу відмінність також збільшувалася. Таку закономірність можна пояснити ефектами застосованих препаратів, які є жиророзчинними, та/чи їх метаболізму.

ВИСНОВКИ. 1. Розвиток некротичного процесу в міокарді гонадектомованих щурів супроводжується інтенсивнішим, ніж у тварин зі збереженими гонадами, накопиченням продуктів перекисного окиснення ліпідів та депресією ферментативної ланки антиоксидантного захисту.

2. Комбінована замісна гормонотерапія гексестролом та прогестероном забезпечує кращий, ніж монотерапія гексестролом, кардіопротекторний ефект за умов гіперадреналінемії, про що свідчить мінімальна відмінність від абсолютних значень показників перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту міокарда тварин зі збереженими гонадами.

ЛІТЕРАТУРА

1. Волков В.И., Исаева А.С. Эндокринное старение женщины и проблема сердечно-сосудистой патологии // http://www.rql.kiev.ua/cardio_j/2008/6/volkov.htm

2. Кардиотропная активность эстрогенов при заместительной гормонотерапии в постменопаузе / А.Н. Караченцев, В.Г. Кулес, А.С. Кисриева, Е.А. Мазеркина // Пробл. эндокр. – 2000. – 46, № 1. – С. 16-20.

3. Колб В.Г., Камишников В.С. Вивчення активності церулоплазмину в крові // Клиническая биохимия. – Минск: Беларусь, 1976. – С. 219-220.

4. Лепявко А.А., Хара М.Р. Порівняльна характеристика автономної регуляції серця, пошкодженого адреналіном, у різностатевих щурів при старінні // Здобутки клін. і експер. мед. – 2008. – № 1. – С. 44-47.

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

6. Методы биохимических исследований / Под ред. М.И. Прохоровой. – Ленинград: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – 272 с.

7. Хара М.Р. Вплив кастрації на холінергічні реакції серця щурів різної статі в умовах розвитку ад-реналінової міокардіодистрофії // Вісн. наук. досл. – 2004. – № 1. – С. 91-93.

8. Чевари С., Чаба И., Сокей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678-681.

9. Barrett-Connor E., Goodman-Gruen D. Prospective study of endogenous sex hormones and fatal cardiovascular disease in postmenopausal women // Brit. Med. J. – 1995. – 311. – P. 1193-1196.

10. Mori K., Takeda M. Hormone replacement up-to-date. Hormone replacement therapy and brain function // Clin. Calcium. – 2007. – 17 (9). – P. 1349-1354.

11. Mosca L., Jones W.K., King K.B. et al. Awareness, perception, and knowledge of heart disease risk and prevention among women in the united states // Arch. Fam. Med. – 2000. – 9. – P. 506-515.

ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИ- ДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У ГОНАДЕКТОМИРОВАННЫХ САМОК КРЫС ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ НЕКРОТИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МИОКАРДА И КОРРЕКЦИИ

М.Р. Хара, В.Е. Пелих

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

В экспериментах на самках крыс изучено влияние заместительной гормонотерапии на степень метаболических изменений в сердце гонадэктомированных животных при моделировании некротического процесса. Установили, что развитие некротического процесса в миокарде гонадэктомированных крыс сопровождается более интенсивным, чем у животных с сохранившимися гонадами, накоплением продуктов перекисного окисления липидов и депрессией ферментативного звена антиоксидантной защиты. Комбинированная заместительная гормонотерапия гексестролом и прогестероном обеспечивает лучший, чем монотерапия гексестролом, кардиопротективный эффект в условиях гипердреналинемии, о чем свидетельствует минимальное отличие от абсолютных значений показателей перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты миокарда животных с сохранившимися гонадами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: миокард, некроз, гонадэктомия, гормонозаместительная терапия.

FEATURES OF LIPID PEROXIDATION ACTIVITY AND ANTIOXIDANT SYSTEM OF THE FEMALE RATS' IN CASE OF MODELING NECROTIC PROCESS OF MYOCARDIUM BY ADRENALIN AND CORRECTION

M.R. Khara, V.Ye. Pelykh

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

In the experiments on female rats the influence of hormone replacement therapy on the degree of metabolic changes in heart of gonadectomized rats in case of modeling necrotic process was studied. Found that the development of necrotic process in the myocardium of gonadectomized rats is accompanied by more intensive than in animals with saved gonads accumulation of lipid peroxidation products and depression of antioxidant protection's enzyme branch. Combined hormone replacement therapy by hexestrol and progesterone provides better cardioprotective effect in case of hyperadrenalinemia than hexestrol monotherapy that is evidenced by the minimal difference of absolute values of lipid peroxidation indicators and antioxidant protection of myocardium from animals with saved gonads.

KEY WORDS: myocardium, necrosis, gonadectomy, hormone replacement therapy.

Отримано 11.12.2009 р.

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

ВПЛИВ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ КОМПЛЕКСІВ, ОТРИМАНИХ З НАСІННЯ ВИНОГРАДУ, НА МЕТАБОЛІЗМ АРГІНІНУ ПРИ СТРЕСІ

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

У роботі досліджено вплив попереднього введення поліфенольних екстрактів, отриманих з насіння винограду різних сортів, на розвиток негативних наслідків нейрогенного стресу при іммобілізації тварин. Показано, що іммобілізаційний емоційно-больовий стрес у піддослідних щурів супроводжується характерними змінами метаболізму амінокислот, що спрямовані на адаптацію, постачання джерел енергії та активацію енергетичного обміну. Дані зміни свідчать про активацію катаболічних процесів у клітинах, посилення виділення кінцевих продуктів азотистого обміну та можуть бути причиною розвитку ендотеліальної дисфункції при стресі. За цих умов профілактичне застосування екстрактів винограду значно полегшувало перебіг стрес-реакції, що відображалось в зниженні інтенсивності катаболічних процесів та проявів цитолізу. Проведені дослідження дозволяють зробити висновок про значну стрес-протекторну та судинозахисну активність, яка загалом порівнювана для всіх досліджених екстрактів, незалежно від сорту винограду, що робить дані екстракти цінним об'єктом для подальших досліджень з метою впровадження в медичну практику.

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

ВСТУП. Перенасиченість життя сучасної людини стресорними ситуаціями підвищує інтерес дослідників до гострого впливу на організм стрес-факторів. Під впливом різних факторів, що ушкоджують, здатність ендотеліальних клітин синтезувати вазодилататори зменшується, тоді як синтез судинозвужувальних факторів зберігається чи збільшується, тобто формується ендотеліальна дисфункція (ЕД) [8].

ЕД – універсальний механізм патогенезу багатьох захворювань. Патогенетична роль ЕД доведена при атеросклерозі, артеріальній гіпертензії, легеневій гіпертензії, серцевій недостатності, дилатаційній кардіоміопатії, ожирінні, гіперліпідемії, цукровому діабеті [15].

Найбільш імовірною ланкою ЕД є система синтезу важливого ендотеліального фактора – NO, бо ЕД в основному проявляється порушенням біодоступності NO за рахунок різних факторів, серед яких важлива роль належить дефіциту субстрату NOS – L-аргініну, що може виникати як внаслідок зниження синтезу, так і в результаті активації розщеплення останнього. Тому саме кількість аргініну в клітині можна розглядати як один з факторів, що впливають на ризик розвитку ЕД [3].

Кількість аргініну в клітині залежить від інтенсивності його надходження, утворення в

орнітиновому циклі та використання в синтезі креатину, утворення сечовини та оксиду нітрогену. Розщеплення аргініну здійснює аргіназа (L-аргінін-амідиногідролаза, 3.5.3.1), що міститься в печінці та нирках тих тварин, які екскретують із сечею сечовину як основний і кінцевий продукт нітрогенового обміну. При посиленні розпаду білків у тканинах (голодування, алоксановий діабет, авітаміноз В₁, введення кортикостероїдів, тироксину й ін.) активність аргінази в печінці підвищується, що може знижувати доступність аргініну та провокувати ЕД [13].

Не меншу цінність становить і пошук шляхів корекції ЕД, особливо із застосуванням природних субстанцій, що володіють антиоксидантною активністю. Тому вивчення і цілеспрямоване використання лікувально-профілактичної активності продуктів переробки винограду різних сортів можуть бути перспективними [1, 14].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували безпородних щурів-самців масою 180-220 г, яких утримували у віварії Національного фармацевтичного університету. Тваринам протягом 15 діб щодня перорально вводили поліфенольні екстракти з насіння винограду сортів "Каберне", "Мерло", "Ркацителі" та "Рислінг", що містять близько 25 г поліфенолів у літрі та отримані в Національному інституті винограду і вина "Магарач", у заздалегідь

© А.Л.Загайко, Л.М. Вороніна, Г.Б. Кравченко, Ю.О. Огай, 2010.

підібраних ефективних дозах (в перерахунку на поліфеноли – 9 мг на 100 г маси тіла). Контрольним тваринам вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину. Емоційно-больовий стрес викликали іммобілізацією на череві протягом 3 год [7]. Тварин декапітували через 3 год після іммобілізації. Усі маніпуляції зі щурами проводили під хлоралозо-уретановим наркозом. Дослідження виконували відповідно до національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985).

Кров збирали для одержання сироватки. Вміст сечовини визначали за кольоровою реакцією з діацетилмоноксимом (набір реактивів фірми "Felicit", Україна), вміст креатину – за методом Егглтона [6], вміст аргініну – за реакцією Сакагучі [10], цитруліну – за методом Горнола та Хантера [2], активність аргінази – за методом Шорма та Швейцера [9],

вміст загального білка – за методом Лоурі в модифікації Міллера [12].

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

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як видно з отриманих нами даних (табл. 1, 2), іммобілізаційний емоційно-больовий стрес у піддослідних щурів супроводжувався характерними змінами метаболізму, що спрямовані на постачання джерел енергії та активацію енергетичного обміну.

Так, рівень сечовини в сироватці крові зріс на 31 %, вміст аргініну в сироватці крові знизився на 53 %, а цитруліну – на 25 %, в печінці це зниження склало, відповідно, 15 та 55 %, а в нирках рівень аргініну збільшився на 30 % на фоні зменшення вмісту цитруліну на 22 %. Ці дані загалом свідчать про активацію утилізації аргініну як через підвищення активності сечовиноутворення, так і з метою синтезу креатину та оксиду нітрогену.

Таблиця 1 – Вплив профілактичного введення поліфенольних екстрактів, отриманих з насіння винограду, на активність аргінази та вміст аргініну в тканинах щурів за умов гострого нейрогенного стресу ($M \pm m$, $n=6$)

| Група тварин | Активність аргінази, мкмоль сечовини/хв/мг білка | | Вміст аргініну, мкмоль/л (г) | | |
|----------------------|--|--------------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | Печінка | Нирки | Сироватка | Печінка | Нирки |
| Інтакт | 0,44±0,02 | 0,25±0,01 | 68,05±0,86 | 6,13±0,17 | 48,33±1,13 |
| Стрес | 0,56±0,01 ^a | 0,36±0,02 ^a | 32,63±1,01 ^a | 5,27±0,44 ^a | 62,58±1,33 ^a |
| Стрес+ПК "Мерло" | 0,48±0,01 ^{b c} | 0,26±0,02 ^b | 39,65±1,25 ^{b c} | 6,59±0,36 ^{b c} | 42,81±1,29 ^c |
| ПК "Мерло" | 0,38±0,02 | 0,25±0,01 | 70,48±0,80 | 7,43±0,33 | 43,34±1,45 |
| Стрес+ПК "Каберне" | 0,47±0,01 ^{b c} | 0,23±0,02 ^{b c} | 50,33±1,38 ^{b c} | 6,85±0,13 ^{b c} | 38,47±1,04 ^{b c} |
| ПК "Каберне" | 0,41±0,02 | 0,26±0,01 | 75,43±1,23 | 7,12±0,19 | 45,19±1,51 |
| Стрес+ПК "Ркацителі" | 0,49±0,02 ^{b c} | 0,28±0,02 ^{b c} | 43,36±0,89 ^{b c} | 6,39±0,18 ^c | 47,71±1,13 |
| ПК "Ркацителі" | 0,35±0,02 | 0,23±0,01 | 68,39±1,02 | 6,36±0,37 | 44,57±1,91 |
| Стрес+ПК "Рислінг" | 0,51±0,01 ^{b c} | 0,31±0,02 ^{b c} | 38,47±0,72 ^b | 5,86±0,23 ^b | 45,58±1,16 ^c |
| ПК "Рислінг" | 0,32±0,01 | 0,19±0,01 | 71,49±0,74 | 6,49±0,33 | 46,25±1,63 |

Примітка. Тут і в наступній таблиці: ^a – $p \leq 0,05$ відносно інтакту; ^b – $p \leq 0,05$ відносно відповідного контролю; ^c – $p \leq 0,05$ відносно стресу.

Існує велика кількість досліджень, що показали важливість підтримання концентрації аргініну в плазмі крові в нормальних межах. Як свідчить ряд робіт, зменшення його концентрації разом зі зниженням концентрації NO у плазмі крові хворих із сепсисом збільшує ризик розвитку летального результату [11].

Нейрогенний стрес, викликаний іммобілізацією, спричиняв зниження рівня аргініну як у сироватці крові, так і в тканинах тварин, що корелювало зі зростанням активності аргінази (табл. 1). Оскільки вміст цитруліну також

зменшувався (табл. 2), ми припускаємо, що головною причиною зниження вмісту аргініну є активація орнітинового циклу, і за цих умов кількість аргініну для утворення оксиду нітрогену може стати недостатньою, що можна розглядати як показник розвитку ендотеліальної дисфункції за стресування.

Активація сечовиноутворення підтверджується і зростанням вмісту сечовини в сироватці крові стресованих тварин (табл. 2).

Крім того, рівень креатину в сироватці крові та печінці стресованих щурів також значно

Таблиця 2 – Вплив профілактичного введення поліфенольних екстрактів, отриманих з насіння винограду, на вміст деяких небілкових нітрогеновмісних сполук у сироватці крові та органах щурів за умов гострого нейрогенного стресу ($M \pm m$, $n=6$)

| Група тварин | Показник | | |
|----------------------|---|---|----------------------------|
| | Сечовина, ммоль/л (мкмоль/г тканини) | Цитрулін, мкмоль/л (нмоль/г тканини) | Креатин, мкмоль/л (г) |
| Сироватка крові | | | |
| Інтакт | 7,25±0,59 | 41,39±2,38 | 75,34±0,44 |
| Стрес | 9,53±0,61 ^a | 31,41±2,49 ^a | 29,85±0,41 ^a |
| Стрес+ПК "Мерло" | 6,95±0,24 ^c | 35,17±1,21 ^{b c} | 49,89±0,54 ^{b c} |
| ПК "Мерло" | 7,07±0,26 | 40,56±2,79 | 72,67±0,72 |
| Стрес+ПК "Каберне" | 7,32±0,51 ^c | 34,83±1,29 ^{b c} | 58,73±0,37 ^{b c} |
| ПК "Каберне" | 7,54±0,41 | 40,96±1,89 | 80,12±0,29 |
| Стрес+ПК "Ркацителі" | 4,77±0,36 ^{b c} | 35,97±1,58 ^{b c} | 48,18±0,26 ^{b c} |
| ПК "Ркацителі" | 3,25±0,30 | 41,03±1,17 | 77,15±0,50 |
| Стрес+ПК "Рислінг" | 4,35±0,48 ^{b c} | 34,37±1,85 ^b | 45,79±0,38 ^{b c} |
| ПК "Рислінг" | 2,84±0,49 | 40,33±1,65 | 82,88±0,71 |
| Гомогенат печінки | | | |
| Інтакт | 8,56±0,35 | 21,40±1,86 | 425,24±0,84 |
| Стрес | 13,25±0,37 ^a | 9,74±0,79 ^a | 268,54±0,59 ^a |
| Стрес+ПК "Мерло" | 10,15±0,27 ^{b c} | 13,85±1,22 ^{b c} | 318,34±0,77 ^{b c} |
| ПК "Мерло" | 8,74±0,17 | 21,98±1,82 | 409,57±0,88 |
| Стрес+ПК "Каберне" | 9,02±0,14 | 14,48±1,12 ^{b c} | 355,26±1,56 ^{b c} |
| ПК "Каберне" | 8,89±0,16 ^c | 21,74±1,64 | 435,63±1,21 |
| Стрес+ПК "Ркацителі" | 10,27±0,33 ^{b c} | 16,73±1,34 ^{b c} | 303,28±1,02 ^{b c} |
| ПК "Ркацителі" | 7,25±0,19 | 21,79±1,44 | 447,73±1,39 |
| Стрес+ПК "Рислінг" | 11,05±0,34 ^{b c} | 17,38±1,01 ^{b c} | 299,99±0,89 ^{b c} |
| ПК "Рислінг" | 7,11±0,19 | 20,39±2,20 | 417,89±1,02 |
| Гомогенат нирок | | | |
| Інтакт | 22,36±0,42 | 103,61±12,17 | Не досліджували |
| Стрес | 36,47±0,39 ^a | 81,52±3,18 ^a | |
| Стрес+ПК "Мерло" | 27,89±0,41 ^{b c} | 87,69±1,42 ^{b c} | |
| ПК "Мерло" | 18,85±0,21 | 99,56±2,33 | |
| Стрес+ПК "Каберне" | 25,58±0,34 ^{b c} | 88,05±1,89 ^{b c} | |
| ПК "Каберне" | 19,96±0,15 | 100,09±2,81 | |
| Стрес+ПК "Ркацителі" | 28,85±0,55 ^{b c} | 92,94±2,54 ^{b c} | |
| ПК "Ркацителі" | 17,78±0,25 | 101,85±1,99 | |
| Стрес+ПК "Рислінг" | 32,25±0,45 ^{b c} | 94,21±3,20 ^{b c} | |
| ПК "Рислінг" | 18,12±0,14 | 101,99±3,17 | |

знижувався (в сироватці – на 61 %, в печінці – на 37 %), що пояснюється як активацією його перетворення на креатинфосфат, так і активним використанням останнього як джерела енергії з утворенням креатиніну. Можливе зниження утворення креатину з аргініну через зменшення рівня останнього. Найімовірніше, мали місце всі згадані механізми: за умов стресу активувалось використання карбонових скелетів амінокислот з енергетичною метою, що призводило до накопичення амоніаку, на знешкодження якого спрямоване зростання

активності ферментів орнітинового циклу. Активна аргінази, яка спостерігалась при цьому, викликала зниження рівня аргініну і його нестачу для синтезу біологічно активних продуктів – креатину та оксиду нітрогену. Все це може мати наслідком розвиток ендотеліальної дисфункції та бути одним з механізмів проатерогенезу.

За цих умов профілактичне застосування екстрактів винограду значно полегшувало перебіг стрес-реакції, що відображалось в зниженні інтенсивності катаболічних процесів (табл. 1, 2).

Оцінка і корекція ЕД на сьогодні є новим і найбільш перспективним напрямком у кардіології, оскільки, як відомо, макрофаги не фагоцитують нативні незмінені ЛПНЩ, а поглинають лише модифіковані ЛПНЩ, після чого трансформуються в пінисті клітини. Саме вони під впливом перекисного окиснення відіграють провідну роль у розвитку ЕД і прогресуванні атеросклерозу. Разом із тим, антиоксиданти захищають ЛПНЩ від переокиснення, а отже, і від інтенсивного поглинання ЛПНЩ макрофагами, зменшуючи в такий спосіб утворення пінистих клітин, ушкодження ендотелію і можливість інфільтрації інтими ліпідами. Крім того, вільні радикали інактивують NO-синтазу. Цей ефект також лежить в основі позитивного впливу антиоксидантів на тонусрегулюючу функцію ендотелію [14].

Введення тваринам екстрактів з насіння винограду нормалізувало рівень сечовини й активність аргінази та збільшувало вміст цитруліну і креатину (табл. 1, 2).

Разом із тим, ця активність була неоднаковою в різних екстрактів. Так, введення ком-

плексу “Мерло” нормалізувало вміст досліджених амінокислот в нирках, хоча в крові їх рівень залишався нижчим за показники норми, комплекс “Каберне” нормалізував лише вміст цитруліну в нирках, комплекси “Ркацителі” та “Рислінг” також найбільш виразно впливали на вміст досліджених амінокислот в нирках. Ці дані не корелюють з антиоксидантною активністю вказаних комплексів, показаною в наших попередніх дослідженнях (за антиоксидантною активністю комплекси розташовані в порядку “Каберне” > “Мерло” > “Ркацителі” > “Рислінг”), і тому повинні пояснюватися не лише антиоксидантною дією поліфенолів, а й іншими, зокрема фітогормональними, ефектами.

ВИСНОВОК. Має місце значна стрес-протекторна та ендотеліозахисна активність, яка загалом порівнювана для всіх досліджених екстрактів, незалежно від сорту винограду, що робить дані екстракти цінним об’єктом для подальших досліджень з метою впровадження в медичну практику.

ЛІТЕРАТУРА

1. Авидзба А.М., Иванченко В.И., Загоруйко В.А., Огай Ю.А. Перспективы разработки новых биологически активных продуктов питания на основе винограда // “Магарах”. Виноградарство и виноделие. – 2001. – № 1. – С. 30-31.
2. Асатиани В.С. Биохимическая фотометрия. – М.: Изд-во АН СССР, 1957. – 645 с.
3. Дмитренко Н.П., Кишко Т.О., Сандренко Н.Г. Аргинин: биологическое действие, влияние на синтез оксида азота // Український хіміотерапевтичний журнал. – 2008. – **22**, № 1-2. – С. 137-140.
4. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. – Мн.: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с.
5. Кравченко Н.А., Ярымыш Н.В. Биохимические и молекулярно-генетические механизмы регуляции синтеза оксида азота эндотелиальной NO-синтазой в норме и при сердечно-сосудистой патологии // Украинский биохимический журнал. – 2007. – № 1. – С. 82-89.
6. Практикум по биохимии / Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
7. Семагин В.Н., Зухарь А.В., Куликов М.А. Тип нервной системы, стрессустойчивость и репродуктивная функция. – М.: Наука, 1988. – 135 с.
8. Соколова Е.Д., Березин Ф.Б., Барлас Т.В. Эмоциональный стресс: психологические механизмы,

9. проявление, терапия // *Materia Medica*. – 1996. – **9**, № 1. – С. 5-56.
9. Ceyer J.W., Dabish D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates // *Analytical biochemistry*. – 1971. – № 39. – P. 412-417.
10. Gilboe D.D., William J.N. Evaluation of the Sakaguchi reaction for quantitative determination of arginine // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1956. – № 91. – P. 535-536.
11. Luiking Y., Steens L., Poeze M. et al. Low plasma arginine concentration in septic patients is related to diminished de novo arginine production from citrulline // *Clin Nutr.* – 2003. – **23**, № 1. – P. 26.
12. Miller G.L. Protein determination for large numbers of samples // *Anal. Chem.* – 1959. – **31**, № 5. – P. 964-966.
13. Morris S.M. Recent advances in arginine metabolism: role and regulation of the arginases // *Br J Pharmacol.* – 2009. – **157**, № 6. – P. 922-930.
14. Nijveldt R.J., E. van Nood, D.E.C. van Hoorn et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications // *Am J Clin Nutr.* – 2001. – № 74. – P. 418-425.
15. Shaikh A.K., Suryakar A.N. Oxidative stress, endothelial dysfunction and status of L-arginine and nitric oxide in coronary artery disease // *Biomedical Research.* – 2008. – **19**, № 3. – P. 211-214.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СЕМЯН ВИНОГРАДА, НА МЕТАБОЛИЗМ АРГИНИНА ПРИ СТРЕССЕ

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

Резюме

В работе исследовано влияние профилактического введения полифенольных экстрактов, полученных из семян винограда разных сортов, на развитие отрицательных последствий нейрогенного стресса при иммобилизации животных. Показано, что иммобилизационный эмоционально-болевым стресс у подопытных крыс сопровождается характерными изменениями метаболизма аминокислот, направленными на адаптацию, снабжение источников энергии и активацию энергетического обмена. Данные изменения свидетельствуют об активации катаболических процессов в клетках, увеличении выделения конечных продуктов азотистого обмена и могут быть причиной развития эндотелиальной дисфункции при стрессе. В этих условиях профилактическое применение экстрактов винограда значительно облегчало протекание стресс-реакции, что отобразилось в снижении интенсивности катаболических процессов и проявлений цитолиза. Проведенные исследования позволяют сделать вывод о значительной стресс-протекторной и сосудозащитной активности, которая в целом сравнима для всех исследованных экстрактов, независимо от сорта винограда, что делает данные экстракты ценным объектом для дальнейших исследований с целью внедрения в медицинскую практику.

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

INFLUENCE OF POLYPHENOL COMPLEXES RECEIVED FROM GRAPE SEEDS, ON ARGININE METABOLISM UNDER STRESS

A.L. Zagaiko¹, L.M. Voronina¹, H.B. Kravchenko¹, Ju.A. Oghay²
NATIONAL UNIVERSITY PHARMACY¹, KHARKIV
NATIONAL INSTITUTE OF GRAPE AND VINE "MAGARACH", YALTA

Summary

The influence of preventive introduction of the polyphenol extracts received from the grape seeds of different cultivars on the development of neurogenous stress negative effects under the animal immobilization was investigated in this work. It was shown that immobilized emotional - painful stress of experimental rats is accompanied by characteristic changes of the amino acid metabolism, which is directed at adaptation, supply by energy sources and energy metabolism mobilization. These changes are evidence of the catabolic processes activation in the cells, increasing of the nitrogen metabolism end products excretion, and can cause the endothelial dysfunction development under stress. The preventive application of grape polyphenol extracts significantly facilitated the stress-reaction course that was reflected on decreasing of catabolic processes rate and cytotoxicity manifestations. Carried out experiments allowed us to conclude that examined extracts have significant stress-protective and vasoprotective activity, which is not specified by the kind of the studied extracts from different grape cultivars, this evidence made these extracts the important object for the further researches with the purpose of introduction in medical practice.

KEY WORDS: grape seeds, polyphenols, stress, arginine metabolism.

Отримано 27.11.2009 р.

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

ВПЛИВ ХІНОЛІНАМІДЕТАНУ НА КИСЛОТНО-ЛУЖНУ РІВНОВАГУ В УМОВАХ ХРОНІЧНОЇ ДИХАЛЬНОЇ ГІПОКСІЇ

А.О. Нікитенко

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Вивчено вплив хінолінамідетану і мексидолу на показники кислотно-основного стану при дихальній гіпоксії. Показано, що хінолінамідетан і мексидол посилюють зв'язування гемоглобіну з киснем, сприяють збереженню артеріовенозного градієнта оксигемоглобіну і парціального тиску кисню в артеріальній крові на тлі помірного напруження компенсаторних механізмів. Відновлення гомеостазу крові тварин в умовах дихальної гіпоксії під впливом хінолінамідетану перебігає швидше, ніж під впливом мексидолу, в середньому на 3 дні.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **дихальна гіпоксія, кислотно-основний стан, хінолінамідетан, мексидол.**

ВСТУП. Гіпоксія як типовий патологічний процес є основою більшості захворювань людини. Вона являє собою ряд множинних послідовних метаболічних взаємодій, які регулюються на міжклітинному та молекулярному рівнях [7]. Згідно з літературними даними, перелік сучасних антигіпоксичних засобів залишається на даний час досить обмеженим для терапії різних киснезалежних станів, а препарати не завжди ефективні й мають деяку побічну дію [1]. Треба відмітити, що антигіпоксичний ефект будь-якої сполуки тісно пов'язаний з можливістю запобігати грубим гематологічним зсувам, зокрема стабілізувати кислотно-лужну рівновагу [5].

Метою даної роботи було вивчення впливу хінолінамідетану на кислотно-лужний стан в умовах хронічної дихальної гіпоксії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Хронічну дихальну гіпоксію, зумовлену запаленням, викликали шляхом введення внутрішньо плеврального скипидару з розрахунку 0,1 мл на 1 кг маси тіла тварин [3]. Досліди проведено на 50 щурах, яких поділили на 4 групи: інтактні тварини; тварини без лікування з експериментальною дихальною гіпоксією (контрольна група); тварини з експериментальною дихальною гіпоксією, яким проводили лікування хінолінамідетаном; тварини з експериментальною дихальною гіпоксією, яким проводили лікування мексидолом.

Досліджувані препарати вводили внутрішньочеревно в дозах ED_{50} : хінолінамідетан – 18,6 мг/кг маси тіла, мексидол – 140 мг/кг, що встановлено експериментально [2].

© А.О. Нікитенко, 2010.

Кислотно-лужний стан і газовий склад крові вивчали за методом Р. Astrup на мікроаналізаторі кислотно-лужної рівноваги БМС-ЗМК-2 фірми "Радіометр" (Копенгаген, Данія) [4].

За номограмою Siggaard-Andersen визначали: pCO_2 – парціальний тиск вуглекислого газу, мм рт. ст.; pO_2 – парціальний тиск кисню, мм рт. ст.; BE (Base Excess) – надлишок або нестача буферних основ, ммоль/л; SB (Standard Bicarbonate) – стандартний бікарбонат, ммоль/л; AB (Actual Bicarbonate) – актуальний бікарбонат, ммоль/л; BB (Buffer Base) – сума буферних основ, ммоль/л; tCO_2 – тотальний вуглекислий газ, мм рт. ст.; HbO₂ – рівень оксигемоглобіну, % [6].

Результати опрацьовували методами непараметричної статистики з використанням t-критерію Стьюдента [3].

Утримання щурів і всі маніпуляції над ними проводили за загальними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, яка схвалена на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2001), і вимогами Закону України № 3447IV від 21.02.2006 р. "Про захист тварин від жорстокого поводження".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Відомо, що при дихальній гіпоксії перш за все змінюються газовий склад крові та кислотно-лужна рівновага (КЛР). У ході досліджень встановлено, що на першу добу ексудативного плевриту достовірно збільшувався парціальний тиск CO_2 в артеріальній крові – до $(60,60 \pm 1,09)$ мм рт. ст. порівняно з показниками здорових тварин. Результати експериментів наведено в таблиці 1.

Таблиця 1 – Показники КЛР крові щурів на першу добу дихальної гіпоксії (M±m)

| Показник | Кровоносне русло | Експериментальна група тварин | |
|--------------------------------|------------------|-------------------------------|-------------------|
| | | інтактні тварини | дихальна гіпоксія |
| рН | артеріальне | 7,28±0,009 | 7,30±0,011 |
| | венозне | 7,22±0,012 | 7,24±0,011 |
| рСО ₂ | артеріальне | 60,60±1,09* | 45,83±1,52 |
| | венозне | 58,00±1,11 | 56,67±0,73 |
| ВЕ | артеріальне | -2,50±0,42 | -3,33±0,44 |
| | венозне | -2,66±0,47 | -2,08±0,50 |
| АВ | артеріальне | 23,08±0,40 | 21,83±0,38 |
| | венозне | 23,22±0,38 | 23,92±0,38 |
| тСО ₂ | артеріальне | 24,58±0,38 | 23,25±0,42 |
| | венозне | 24,83±0,38 | 25,50±0,37 |
| SB | артеріальне | 21,25±0,35 | 21,00±0,20 |
| | венозне | 20,83±0,38 | 21,08±0,44 |
| BB | артеріальне | 45,50±0,42 | 44,67±0,44 |
| | венозне | 45,33±0,47 | 46,25±0,48 |
| рО ₂ | артеріальне | 51,00±1,16* | 78,83±1,95 |
| | венозне | 27,67±0,73* | 31,17±1,09 |
| HbO ₂ | артеріальне | 79,33±1,52* | 93,83±0,49 |
| | венозне | 39,33±1,91* | 48,83±2,75 |
| АВ різниця по HbO ₂ | | 40,00±1,65 | 45,00±2,54 |
| ПРУК | | 37,67±1,54 | 35,83±2,11 |

Примітка. * – вірогідно відносно інтактних тварин (p<0,05).

Одночасно спостерігали рівномірне зменшення парціального напруження кисню в артеріальному ((51±1,16) мм рт. ст.) і венозному ((27,67±0,73) мм рт. ст.) руслах. Разомітним, знижувався відсоток насичення гемоглобіну крові киснем ((79,33±1,52) і (39,33±1,91) %). Вказані зміни КЛР відбувалися на фоні практично стабільних характеристик артеріовенозного градієнта оксигемоглобіну ((40,00±1,65) %) і відсотка утилізації кисню тканинами ((37,67±1,54) %).

Прогресування ексудативного плевриту надалі призводило до більш глибоких порушень КЛР.

У тварин, які не отримували фармакологічних засобів, порушення КЛР вкладалися у картину часткового компенсування метаболічного ацидозу за параметрами артеріальної (рН – 7,22±0,009; рСО₂ – (46,0±0,60) мм рт. ст.; ВЕ – (7,58±0,38) ммоль/л) і венозної (рН – 7,15±0,011; рСО₂ – (49,83±1,60) мм рт. ст.; ВЕ – (9,08±0,22) ммоль/л) крові.

Мало місце зниження вмісту стандартного бікарбонату (до (17,5±0,33) і (15,75±0,2) ммоль/л), а також актуального бікарбонату артеріального і венозного русел (до 18,17±0,31 та 17,08±0,28 відповідно). Як наслідок відбувалося зменшення суми буферних основ ((40,02±0,38) та (38,92±0,22) ммоль/л).

Насичення гемоглобіну артеріальної крові киснем значно знижувалося ((62,00±2,09) %),

тоді як венозної – залишалось у межах фізіологічних коливань ((42,00±3,65) %). Тому артеріовенозний градієнт оксигемоглобіну був вірогідно меншим, ніж в інтактних тварин.

На фоні дихальної гіпоксії знижувався парціальний тиск кисню в артеріальній крові ((39,67±1,02) мм рт. ст.). Артеріальна гіпоксемія призводила до зменшення утилізації кисню тканинами ((24,33±3,28) %).

На фоні введення хінолінамідетану показники артеріальної крові вкладалися в межі респіраторного ацидозу (рН – 7,24; рСО₂ – (50,33±0,90) мм рт. ст.; ВЕ – (4,67±0,25) ммоль/л).

Рівень стандартного бікарбонату зменшувався ((19,50±0,23) ммоль/л), а актуального – зберігався у межах цифр інтактної групи ((21,08±0,22) ммоль/л), тоді як параметри венозного русла вказували на розвиток субкомпенсованих метаболічних порушень (рН – 7,18±0,009; рСО₂ – (8,50±1,41) мм рт. ст.; ВЕ – (5,33±0,25) ммоль/л; SB – (17,83±0,38) ммоль/л; АВ – (21,00±0,20) ммоль/л; BB – (42,67±0,25) ммоль/л). Антигіпоксична дія препарату позначилася і на ступені насичення гемоглобіну артеріальної крові киснем. Зниження парціального тиску кисню в артеріальній крові було значно меншим ((45,33±1,39) мм рт. ст.), а у венозній крові напруження кисню залишалося у межах фізіологічної норми. Артеріовенозний градієнт по оксигемоглобіну знижу-

вався не так суттєво ((27,33±1,73) %), як у тварин контрольної групи ((20,00±2,34) %).

Застосування натрію оксибутирату також сприяло стабілізації метаболічних процесів. Однак, незважаючи на розвиток частково компенсованого метаболічного ацидозу, газометричні показники значно менше відхилялися від норми, ніж у щурів, які не отримували фармакологічних засобів.

При порівнюванні показників КЛР у тварин, яким вводили хінолінамідетан і мексидол, виявлено, що на третю добу хронічної дихальної гіпоксії хінолінамідетан проявляв сильний антигіпоксичний ефект, порівнянний з дією мексидолу.

На п'яту добу досліду у тварин контрольної групи розвивалися прояви декомпенсованого метаболічного ацидозу. Різко змінювалися показники КЛР артеріального (рН – 7,14±0,018; рСО₂ – (38,83±1,23) мм рт. ст.; ВЕ – (13,01±0,37) ммоль/л) та венозного (рН – 7,07±0,015; рСО₂ – (41,83±0,80) мм рт. ст.; ВЕ – (15,7±0,38) ммоль/л) русел. Знижувався рівень усіх буферних основ.

Парціальний тиск кисню зменшувався ((33,00±1,45) і (26,83±1,30) мм рт. ст.), концентрація оксигемоглобіну знижувалась до критичних цифр ((45,33±3,41) і (28,67±2,92) %), що свідчило про зменшення утилізації кисню тканинами ((27,17±3,18) %).

Введення тваринам хінолінамідетану спричиняло розвиток у них декомпенсації КЛР, порушення її вкладалися у межі частково компенсованого метаболічного ацидозу (рН – 7,20±0,013 і 7,14±0,011; рСО₂ – (53,00±1,90) мм рт. ст.; ВЕ – (5,67±0,51) і (7,17±0,53) ммоль/л). Помірно знижувався рівень стандартного ((17,5±0,78) і (16,83±0,39) ммоль/л) та актуального ((20,17±0,57) і (20,08±0,63) ммоль/л) бікарбонатів, ВВ ((42,33±0,51) і (40,88±0,53) ммоль/л) і тСО₂ ((21,05±0,71) і (21,67±0,60) мм рт. ст.).

Зв'язування гемоглобіну крові з киснем проходило значно активніше (НвО₂ – (66,33±2,04) і (37,33±3,53) %), ніж у тварин, які не отримували фармакологічних засобів ((45,33±3,41) і (28,67±2,92) %) або одержували мексидол ((48,47±2,91) і (34,50±2,49) %). Тому артеріовенозний градієнт оксигемоглобіну залишався вірогідно вищим ((29±4,0) %). Парціальний тиск кисню артеріальної крові знижувався, але не виражено ((43,33±0,96) мм рт. ст.). Крім цього, напруження кисню у венозному руслі щурів, які отримували хінолінамідетан, залишалось у межах фізіологічної норми. У результаті практично не порушувався процес утилізації кисню тканинами.

При застосуванні натрію оксибутирату порушення КЛР вкладалися у межі декомпенсованого метаболічного ацидозу. На сьому добу експерименту газометричні показники тварин, які не отримували фармакологічних засобів, свідчили про помірний декомпенсований метаболічний ацидоз (рН – 7,24±0,015 і 7,11±0,013; рСО₂ – (46,17±1,60) і (53,67±1,04) мм рт. ст.; ВЕ – (7,13±0,35) і (7,92±0,36) ммоль/л), який перебігав з великим напруженням адаптаційних механізмів, на що вказували цифри буферних систем (SB – (17,75±0,33) і (16,42±0,47) ммоль/л; АВ – (18,33±0,31) і (18,33±0,31) ммоль/л; ВВ – (40,83±0,35) і (40,04±0,36) ммоль/л).

На низькому рівні утримувалися парціальне напруження кисню ((56,33±1,09) мм рт. ст.) і концентрація оксигемоглобіну ((80,25±3,74) %) в артеріальній крові. Гіпоксемія стала причиною зменшення утилізації кисню тканинами ((22,5±3,16) %), бо в цілому у тварин зберігалися прояви частково компенсованого метаболічного ацидозу.

Застосування хінолінамідетану сприяло відновленню КЛР на сьому добу досліду, хоча спостерігалися ще незначні відхилення від норми показників буферних систем венозної крові (SB – (20,17±0,35) ммоль/л; АВ – (22,75±0,48) ммоль/л; ВВ – (43,50±0,41) ммоль/л). Наслідками антигіпоксичної дії хінолінамідетану стали збільшення рівня оксигемоглобіну ((91,75±0,69) і (47,00±1,80) %), парціального тиску кисню в судинному руслі ((72,0±1,24) і (33,33±0,8) мм рт. ст.), нормалізація процесу утилізації кисню тканинами ((27,17±1,16) %). Мексидол призводив до часткової нормалізації кислотно-основного рівня, при цьому напруження буферних систем було менш значним.

На десяту добу патологічного процесу (табл. 2) у тварин контрольної групи відбулося часткове відновлення КЛР крові, й зсув її вкладався у межі субкомпенсованого метаболічного ацидозу (рН – 7,24±0,015 і 7,16±0,013; рСО₂ – (46,17±1,6) і (53,67±1,04) мм рт. ст.; ВЕ – (7,17±0,35) і (7,92±0,36) ммоль/л).

Зберігалися зниженими показники стандартного й актуального бікарбонатів. Залишались на низькому рівні показники оксигемоглобіну, парціального тиску кисню крові, відсоток його утилізації тканинами. Під впливом хінолінамідетану і мексидолу КЛР крові відновлювалась до норми вже на сьому добу експерименту. Такий самий ефект ми бачили при введенні мексидолу, однак при цьому у тварин зберігалися прояви частково компенсованого метаболічного ацидозу.

Таблиця 2 – Показники КЛР крові щурів на десяту добу дихальної гіпоксії (M±m)

| Показник | Кровоносне русло | Експериментальна група тварин | | |
|--------------------------------|------------------|-----------------------------------|-----------------|-------------|
| | | дихальна гіпоксія (без лікування) | хінолінамідетан | мексидал |
| рН | артеріальне | 7,24±0,015 | 7,31±0,09* | 7,24±0,009 |
| | венозне | 7,16±0,013 | 7,23±0,012* | 7,20±0,010* |
| рСО ₂ | артеріальне | 46,17±1,60 | 50,67±1,17 | 45,83±0,80 |
| | венозне | 53,67±1,04 | 54,17±1,34 | 52,17±0,55 |
| ВЕ | артеріальне | -7,17±0,35 | -2,50±0,4 1* | -5,17±0,25* |
| | венозне | -7,92±0,36 | -3,83±0,48* | -6,42±0,30* |
| АВ | артеріальне | 18,33±0,31 | 22,75±0,48* | 20,08±0,22* |
| | венозне | 18,33±0,31 | 23,17±0,44* | 19,50±0,23* |
| тСО ₂ | артеріальне | 19,83±0,31 | 22,25±0,48* | 21,58±0,22* |
| | венозне | 19,83±0,31 | 24,67±0,44* | 21,00±0,23* |
| SB | артеріальне | 17,75±0,33 | 20,17±0,35* | 19,33±0,32* |
| | венозне | 16,42±0,47 | 19,17±0,49* | 17,92±0,36* |
| BV | артеріальне | 40,83±0,35 | 43,50±0,41* | 42,84±0,25* |
| | венозне | 40,08±0,36 | 44,17±0,48* | 41,58±0,30* |
| рО ₂ | артеріальне | 56,33±3,18 | 76,00±1,24* | 65,00±1,55* |
| | венозне | 39,33±1,84 | 32,00±0,82 | 37,33±0,65 |
| HbO ₂ | артеріальне | 80,25±3,74 | 91,75±0,69* | 90,25±1,17* |
| | венозне | 56,50±3,93 | 47,00±1,80 | 56,67±1,07 |
| АВ різниця по HbO ₂ | | 23,75±1,13 | 42,75±1,35* | 31,92±0,80* |
| ПРУК | | 22,50±1,49 | 24,17±1,16* | 26,83±0,64* |

Примітка. * – вірогідно відносно контролю (p<0,05).

Таким чином, результати газометричного дослідження крові свідчать про наявність антигіпоксичної дії у хінолінамідетану, яка не поступається дії мексидолу.

ВИСНОВКИ. 1. Механізм дії хінолінамідетану пов'язаний з посиленням зв'язування гемоглобіну з киснем, що сприяє збереженню

артеріовенозного градієнта оксигемоглобіну і парціального тиску кисню в артеріальній крові на тлі помірного напруження компенсаторних механізмів.

2. Відновлення кисневого гомеостазу крові тварин за умов дихальної гіпоксії під впливом хінолінамідетану перебігає швидше, ніж під впливом мексидолу, в середньому на 3 дні.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ливанов Г.А., Мороз В.В., Батоциренова Б.В. и др. Пути фармакологической коррекции последствий гипоксии при критических состояниях у больных с острыми отравлениями // Анестезиология и реаниматология. – 2006. – № 2. – С. 51-54.
2. Лукьянова Л.Д. Проблемы фармакологической коррекции гипоксии и поиска антигипоксантов // Клеточные механизмы реализации фармакологического эффекта. – М.: Медицина, 2002. – С. 184-216.
3. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. – М.: Медицина, 2000. – С. 117-320.
4. Astrup P. On recognition of disturbances in acidbase metabolism // Danish Med. Bull. – 1986. – 2. – P. 136-140.

5. Caro A.A., Cererbum A.I. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP 2 E1 // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2004. – 44. – P. 27-42.

6. Susceptibility of rat bone marrow stroma-derived progenitor cells to hypoxia // Abstracts of the VIII World Congress of International Society for Adaptive medicine (ISAM). – 2006. – P. 90. (Coauthor: Buravkova L.B.).

7. The effect of hypoxia on rat bone marrow stroma-derived progenitor cells // Abstracts of the 2-nd International Conference "Strategies in tissue engineering", Cytotherapy. – 2006. – 8, № 2. – P. 37. (Coauthor: Buravkova L.B.).

ВЛИЯНИЕ ХИНОЛИНАМИДЭТАНА НА КИСЛОТНО-ЩЕЛОЧНОЕ РАВНОВЕСИЕ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОЙ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ГИПОКСИИ

А.О. Никитенко
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Изучено влияние хинолинамидэтана и мексидола на показатели кислотно-основного состояния при дыхательной гипоксии. Показано, что хинолинамидэтан и мексидол усиливают связывание гемоглобина с кислородом, способствуют сохранению артериовенозного градиента оксигемоглобина и парциального давления кислорода в артериальной крови на фоне умеренного напряжения компенсаторных механизмов. Восстановление гомеостаза крови животных в условиях дыхательной гипоксии под влиянием хинолинамидэтана протекает быстрее, чем под влиянием мексидола, в среднем на 3 дня.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **дыхательная гипоксия, кислотно-основное состояние, хинолинамидэтан, мексидол.**

INFLUENCE HYNOLINAMIDATANA ON THE ACID-BASE STATE AT A HRONICAL RESPIRATORY HYPOXIA

A.O. Nikitenko
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

The influence of hynolinamydatana and mexydola of a sodium on metrics of an acid-base state is investigated at a respiratory hypoxia. It is shown, that hynolinamydatana and mexydola of a sodium strengthen binding a hemoglobin with oxygen, promote the savings of arteria-vein gradient rate of the oxyhemoglobin and partial oxygen pressure in an arterial blood on a background of moderate power of compensatory mechanisms. The restoring of a blood homeostasis in conditions of a respiratory hypoxia under influence of hynolinamydatana flows past faster, than under influence of a mexydola of a sodium on the average for 3 days.

KEY WORDS: **respiratory hypoxia, acid-base state, hynolinamydatan, mexydol.**

Отримано 27.11.2009 р.

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

ВМІСТ НІТРИТ-АНІОНА В КРОВІ ТА МІОКАРДІ ГОНАДЕКТОМОВАНИХ ЩУРІВ РІЗНОЇ СТАТІ ЗА ЗМІНЕНОЇ АКТИВНОСТІ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ

М.Р. Хара, А.М. Дорохіна

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

В досліджах на щурах обох статей зі збереженими та видаленими гонадами вивчали вплив дефіциту статевих гормонів на стан системи оксиду азоту на тлі застосування L-аргініну та L-NAME. Встановили, що рівень NO_2^- в крові та міокарді самок вищий, ніж у самців. Гонадектомія викликає різке зниження вмісту зазначеного метаболіту у тварин обох статей та сприяє зміні статевого співвідношення на протилежне. Серед щурів зі збереженими гонадами чутливішими до дії L-аргініну виявились самці, а після гонадектомії – самки. Застосування L-NAME викликало різке зниження концентрації NO_2^- у гонадектомованих самців та значно менше у самок. Отримані результати свідчать про залежність ефектів використання модуляторів синтезу NO від статі та гормонального стану організму.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гонадектомія, оксид азоту, нітрит-аніон, L-аргінін, L-NAME.

ВСТУП. Медико-соціальні проблеми, зумовлені дефіцитом статевих гормонів, стають все актуальнішими. Це пов'язано зі збільшенням тривалості життя людей і, відповідно, частки жінок періоду менопаузи та чоловіків з віковим дефіцитом андрогенів. На сьогодні не виникає жодних сумнівів стосовно наявності зв'язку між статтю, гормональним фоном та серцево-судинними захворюваннями (ССЗ), що посідають перше місце серед усіх причин смертності як у чоловіків, так і в жінок [6, 7]. До 80-х років ССЗ вважали "чоловічою" патологією, проте на даний час думка щодо ризику виникнення ССЗ у жінок змінилась. Захист серця від розвитку хвороб урбанізованого суспільства реалізується лише в жінок репродуктивного віку. Це забезпечується відповідним естроген-прогестероновим фоном та втрачається з настанням менопаузи [4, 6, 7]. З іншого боку, зниження продукції андрогенів у чоловіків похилого віку відбувається паралельно зі зростанням серцево-судинної захворюваності [2, 5]. Таким чином, дефіцит і жіночих, і чоловічих статевих гормонів асоціюється з підвищенням ризику виникнення серцево-судинної патології, такої, як артеріальна гіпертензія, ішемічна хвороба серця, метаболічний синдром, дисліпідемія [2, 7]. Чільне місце в кардіопротекції посідає система оксиду азоту (NO). NO викликає розслаблення гладких м'язів стінок кровоносних судин, пригнічує

адгезію та агрегацію тромбоцитів, впливає на скоротливість кардіоміоцитів, передачу сигналу в автономній нервовій системі та мітохондріальне дихання. Саме система оксиду азоту і є своєрідною мішенню при розвитку ССЗ на тлі дефіциту статевих гормонів [1, 6]. Потужні регуляторні можливості NO доводять доцільність вивчення стану системи NO на тлі дефіциту статевих гормонів, як жіночих, так і чоловічих, за умов застосування L-аргініну та L-NAME (донатора та блокатора синтезу NO відповідно). Наявні в доступних наукових джерелах дані часто є суперечливими, що пояснюється різним методичним підходом до вивчення ролі статевих гормонів у дослідженні функціонування системи NO. Крім того, не проводиться гендерне порівняння ефектів модуляторів активності цієї системи за зміненої активності статевих залоз, що дозволило б встановити статеві відмінності ролі NO у регуляції серця.

Метою нашого дослідження стало вивчення впливу дефіциту статевих гормонів, спричиненого гонадектомією, на стан системи NO в тварин різної статі за застосування модуляторів синтезу NO та встановлення гендерних відмінностей.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди провели на 72 білих лабораторних статевозрілих щурах обох статей масою 170-210 г. Двобічну гонадектомію проводили і самцям, і самкам з використанням кетамінового наркозу (80 мг/кг) за методом [3]. Кастрованих тварин дослід-

© М.Р. Хара, А.М. Дорохіна, 2010.

Медична хімія — т. 12, № 1, 2010

жували через 4 тижні після оперативного втручання. Функціонування системи NO оцінювали за вмістом нітрит-аніона (NO_2^-) в сироватці та гомогенатах міокарда (передсердях і шлуночках окремо) спектрофотометричним методом за допомогою реактиву Гріса [8]. Всіх щурів поділили на 12 груп (у кожній по 6 тварин). 1-шу та 2-гу групи становили контрольні самки та самці відповідно, 3-тю та 4-ту – самки і самці, яким вводили L-аргінін (600 мг/кг), 5-ту і 6-ту – самки і самці, яким вводили L-NAME (25 мг/кг), 7-му та 8-му – гонадектомовані самки та самці, 9-ту та 10-ту – гонадектомовані самки та самці, яким вводили L-аргінін, 11-ту та 12-ту – гонадектомовані самки та самці, яким вводили L-NAME. Визначення вмісту нітрит-аніона у наркотизованих тіопенталом натрію щурів (доза препарату – 40 мг/кг) проводили через 30 хв після інтраперитонеально-го введення донатора чи блокатора синтезу NO.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані результати показали (табл. 1), що вміст NO_2^- у крові контрольних самок на 2,2 % перевищував аналогічний показник самців, у передсердях – на 14,6 %, а в шлуночках – на 10,1 %. Очевидно, це пов'язано зі здатністю естрадіолу, з одного боку, стимулювати продукцію NO ендотеліальною NO-синтазою (eNOS), а з іншого – знижувати рівень циркулюючого асиметричного диметиларгінину – ADMA (ендогенного конкурентного з L-аргініном інгібітора eNOS) [4, 6, 7].

Видалення гонад призвело до різкого зниження вмісту стабільного метаболіту оксиду азоту – NO_2^- як у крові, так і в серці щурів обох статей, проте суттєвішим воно було у самок. Якщо в гонадектомованих самців вміст NO_2^- в крові зменшився лише на 30,1 %, то в самок – в 3,5 раза, в передсердях – на 15 % та в 3 рази, в шлуночках – на 29,0 % та в 3,8 раза відповідно. В результаті такої динаміки

Таблиця 1 – Вміст нітрит-аніона в сироватці та серці щурів різної статі зі збереженими і видаленими гонадами за застосування модуляторів синтезу оксиду азоту

| Група тварин | | Сироватка, 10^{-5} мкмоль/л | Передсердя, 10^{-5} мкмоль/кг | Шлуночки, 10^{-5} мкмоль/кг |
|---------------------------|---|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Інтактні | ♂ | 1,422±0,008 ₁ | 1,668±0,022 ₂ | 1,520±0,005 ₃ |
| | ♀ | 1,453±0,008 ₄ | 1,912±0,022 ₅ | 1,674±0,01 ₆ |
| Некастрован+ L-аргінін | ♂ | 1,635±0,004 ₇ | 1,851±0,026 ₈ | 1,701±0,008 ₉ |
| | ♀ | 1,551±0,015 ₁₀ | 2,006±0,03 ₁₁ | 1,744±0,014 ₁₂ |
| Некастрован+ L-NAME | ♂ | 1,243±0,022 ₁₃ | 1,588±0,015 ₁₄ | 1,437±0,011 ₁₅ |
| | ♀ | 1,176±0,014 ₁₆ | 1,838±0,017 ₁₇ | 1,643±0,006 ₁₈ |
| Кастровані | ♂ | 0,994±0,009 ₁₉ | 1,418±0,017 ₂₀ | 1,079±0,006 ₂₁ |
| | ♀ | 0,398±0,005 ₂₂ | 0,610±0,015 ₂₃ | 0,438±0,008 ₂₄ |
| Кастровані+ L-аргінін | ♂ | 1,184±0,009 ₂₅ | 1,552±0,015 ₂₆ | 1,241±0,008 ₂₇ |
| | ♀ | 0,594±0,01 ₂₈ | 0,795±0,024 ₂₉ | 0,69±0,011 ₃₀ |
| Кастровані+ L-NAME | ♂ | 0,230±0,009 ₃₁ | 0,661±0,004 ₃₂ | 0,404±0,004 ₃₃ |
| | ♀ | 0,255±0,009 ₃₄ | 0,443±0,008 ₃₅ | 0,280±0,005 ₃₆ |

Примітка. $p_{1-4}<0,05$; $p_{1-7}<0,001$; $p_{1-13}<0,001$; $p_{1-19}<0,001$; $p_{1-25}<0,001$; $p_{1-31}<0,001$; $p_{2-5}<0,001$; $p_{2-8}<0,001$; $p_{2-14}<0,02$; $p_{2-20}<0,001$; $p_{2-26}<0,02$; $p_{2-39}<0,001$; $p_{3-6}<0,001$; $p_{3-9}<0,001$; $p_{3-15}<0,001$; $p_{3-21}<0,001$; $p_{3-27}<0,001$; $p_{3-33}<0,001$; $p_{4-10}<0,001$; $p_{4-16}<0,001$; $p_{4-22}<0,001$; $p_{4-28}<0,001$; $p_{4-34}<0,001$; $p_{5-11}<0,05$; $p_{5-17}<0,05$; $p_{5-23}<0,001$; $p_{5-29}<0,001$; $p_{5-35}<0,001$; $p_{6-12}<0,01$; $p_{6-18}<0,05$; $p_{6-24}<0,001$; $p_{6-30}<0,001$; $p_{6-36}<0,001$; $p_{19-25}<0,001$; $p_{19-31}<0,001$; $p_{20-26}<0,001$; $p_{20-32}<0,001$; $p_{21-27}<0,001$; $p_{21-33}<0,001$; $p_{22-28}<0,001$; $p_{22-34}<0,001$; $p_{23-29}<0,001$; $p_{23-35}<0,001$; $p_{24-30}<0,001$; $p_{24-36}<0,001$.

досліджуваного показника статеве співвідношення вмісту NO_2^- , встановлене для контрольних тварин, змінилося на протилежне. Після видалення гонад у самок вміст зазначеного метаболіту став нижчим, ніж у самців: у крові та шлуночках – в 2,5 раза, а в передсердях – у 2,3 раза.

Встановлену статеву відмінність у чутливості системи NO до гонадектомії можна пояснити не лише кількісними, а й якісними змінами гормонального статусу. Відомо, що в кастрованих самок виникає гіпоестрогенія, з домі-

нуючим естрогеном не 17- β -естрадіолом, а естроном, у поєднанні з гіпергонадотропним станом, коли підвищений рівень фолікулоstimулювального гормону сприяє активації ароматази жирових клітин, що, у свою чергу, збільшує рівень екстрагонадної продукції естрогену [4]. В самців після кастрації відмічають зниження рівня андрогенів та пришвидшення перетворення на периферії тестостерону в естрадіол, останній за механізмом зворотного зв'язку ефективно пригнічує секрецію гонадотропінів. Зазначений механізм призво-

дить до порушення андроген-естрогенного балансу, притаманного контрольним самцям [2]. Разом із тим, отримані дані дозволяють попередньо стверджувати, що домінування змін саме в організмі самок є результатом суттєвішої ролі естрогенів у регуляції активності системи NO.

Застосування L-аргініну в тварин зі збереженими гонадами призвело до підвищення вмісту NO_2^- у щурів обох статей, а чутливішими до дії прекурсора виявились самці. Про це свідчать такі результати. В крові самців вміст NO_2^- збільшився на 15,0 %, самок – на 6,7 %; в передсердях – на 11,0 та 4,9 %; в шлуночках – на 11,9 та 4,2 % відповідно. Такі залежні від статі ефекти L-аргініну в некастрованих щурів можуть бути пов'язані з різним співвідношенням L-аргінін/ADMA, яке у самців є меншим, ніж у самок, за рахунок вищого рівня циркулюючого ADMA через значно нижчий інгібіторний вплив естрадіолу [6]. Очевидно, введення їм екзогенного L-аргініну збільшило це співвідношення і, таким чином, сприяло зменшенню інгібіторного впливу ADMA на eNOS.

Після гонадектомії динаміка вмісту NO_2^- за застосування попередника синтезу NO стала іншою. В крові самців зазначений показник зріс на 19,1 %, а самок – на 49,2 %; в передсердях самців – на 9,4 %, самок – на 30,3 %; в шлуночках самців – на 15,0 %, самок – на 57,5 %. Ця закономірність у самок, очевидно, зумовлена постоваріоектомічним зниженням рівня естрогенів, що призводить до зменшення співвідношення L-аргінін/ADMA, а відтак – збільшення чутливості до введення прекурсора NO [6, 7]. Незважаючи на кращу динаміку приросту вмісту NO_2^- в досліджуваних тканинах гонадектомованих самок, викликану застосуванням L-аргініну, фактичне значення даного показника в гонадектомованих самців відрізнялося від такого у контрольних особин значно менше, ніж в самок порівнюваних груп. Так, концентрація NO_2^- в крові гонадектомованих самців, які отримували L-аргінін, була меншою, ніж в контрольних, на 20,1 %, самок – в 2,4 раза; в передсердях самців – на 7,5 %, самок – в 2,4 раза; в шлуночках самців – на 22,5 %, самок – в 2,4 раза відповідно. Така закономірність є черговим підтвердженням суттєвої залежності ефектів L-аргініну від рівня статевих гормонів, головним чином естрогенів.

Введення L-NAME призвело до зменшення вмісту NO_2^- у тварин обох статей зі збере-

женими гонадами. У крові самців аналізований показник зменшився на 12,6 %, а самок – на 23,6 %, у шлуночках – на 5,5 та 1,9 % відповідно, а в передсердях тварин обох статей – на 4,8 %.

За застосування блокатора синтезу NO у гонадектомованих тварин динаміка вмісту NO_2^- стала іншою. В крові самців аналізований показник зменшився в 4,3 раза, а самок – лише на 35,9 %; у передсердях самців – в 2,1 раза, самок – на 27,4 %; у шлуночках самців – в 2,7 раза, самок – на 56,4 %. Зазначене різке зниження NO_2^- у кастрованих самців свідчить про більшу чутливість їх організму до дії L-NAME. Це явище може відображати порушення андроген-естрогенового балансу, додаткову стимуляцію eNOS естрадіолом, кількість якого в гонадектомованих самців наростає через пришвидшення перетворення на периферії тестостерону в естрадіол та пригнічення секреції гонадотропінів за механізмом зворотного зв'язку [2, 5]. Слід зазначити, що в гонадектомованих самок абсолютні значення вмісту NO_2^- за застосування обох препаратів були меншими, що може викликатись активацією нітритредуктазного компонента циклу NO [1].

ВИСНОВКИ. 1. Гонадектомія призводить до значного зменшення вмісту NO_2^- в крові та міокарді тварин обох статей, із суттєвішими змінами в самок.

2. L-аргінін в дозі 600 мг/кг сприяє зростанню вмісту NO_2^- у крові та міокарді гонадектомованих тварин, більшою мірою в самок, не відновлюючи параметрів активності системи NO.

3. L-NAME в дозі 25 мг/кг викликає зменшення вмісту NO_2^- більшою мірою в гонадектомованих самців. Рівень аналізованого метаболіту залишається нижчим у самок.

4. Різна чутливість гонадектомованих тварин до впливу L-аргініну та L-NAME за умов дефіциту статевих гормонів свідчить про більшу залежність активності системи NO від рівня естрогенів.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ. Для розширення розуміння механізмів участі статевих гормонів у реалізації ефектів системи NO доцільно вивчити активність систем, функціонально пов'язаних з нею, зокрема холінергічної.

ЛІТЕРАТУРА

1. Анализ циклических процессов с участием оксида азота в биосфере с позиций голографического принципа и принципа цикличности. – Одесса: Одес. держ. мед. ун-т, 2003. – 54 с.
2. Дедов И.И., Калинин С.Ю. Возрастной андрогенный дефицит у мужчин. – М.: Практическая медицина, 2006. – 240 с.
3. Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии. – М.: Изд-во Московского университета, 1968. – 275 с.
4. Кулаков В.И., Юренина С.В., Майчук Е.Ю. Постовариоэктомический синдром // Клиническая лекция. – М., 2003. – С. 21.
5. Мансурова Е.А. Исследование качества жизни у больных с ранним приобретенным андрогенодефицитом в сочетании со стенокардией напряжения и вопросы оптимизации лечения: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.05 / Государственное высшее учебное заведение "Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию". – Воронеж, 2009. – 25 с.
6. Покровская Т.Г. Комбинированная фармакологическая коррекция метаболического пути L-аргина/NO при моделировании дефицита оксида азота: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук: 14.00.25 / Государственное высшее учебное заведение "Курский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию". – Курск, 2009. – 47 с.
7. Руководство по климактерию: Руководство для врачей / Под ред. В.И. Кулакова, В.П. Сметник. – М.: Медицинское информационное агентство, 2001. – 685 с.
8. Analysis of nitrate, nitrite [¹⁵N] nitrate in biological fluids / Green L.C., Davic A.W., Golawski I.F. et al. // Anal. biochem. – 1982. – 126, № 1. – С. 131-138.

СОДЕРЖАНИЕ НИТРИТ-АНИОНА В КРОВИ И МИОКАРДЕ ГОНАДЕКТОМИРОВАННЫХ КРЫС РАЗЛИЧНОГО ПОЛА ЗА ИЗМЕНЕННОЙ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ ОКСИДА АЗОТА

М.Р. Хара, А.Н. Дорохина

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

В опытах на крысах обоего пола с сохраненными и удаленными гонадами изучали влияние дефицита половых гормонов на состояние системы оксида азота на фоне применения L-аргина и L-NAME. Установили, что уровень NO_2^- в крови и миокарде самок выше, чем у самцов. Гонадэктомия вызывает резкое снижение содержания указанного метаболита у животных обоего пола и способствует изменению полового соотношения на противоположное. Среди крыс с сохраненными гонадами более чувствительными к действию L-аргина оказались самцы, а после гонадэктомии – самки. Применение L-NAME вызвало резкое снижение концентрации NO_2^- у гонадэктомированных самцов и значительно меньше у самок. Полученные результаты свидетельствуют о зависимости эффектов использования модуляторов синтеза NO от пола и гормонального состояния организма.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гонадэктомия, оксид азота, нитрит-анион, L-аргинин, L-NAME.

CONTENT OF THE NITRITE-ANION IN BLOOD AND MYOCARDIUM GONADECTOMIZED DIFFERENT SEX RATS IN CASE OF MODIFIED ACTIVITY OF THE NITRIC OXIDE SYSTEM

M.R. Khara, A.M. Dorokhina

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

The influence of sex hormones deficiency on the nitric oxide system with the use of L-arginine and L-NAME in the experiments on rats of both sex with saved and removed gonads was studied. Found that the content of NO_2^- in female rats is higher than in male. Gonadectomy causes a sharp decrease of this metabolite in both sex animals and contributes to the opposite changing of the sex ratio. Among the rats with saved gonads more sensitive to the action of L-arginine were male, and after gonadectomy – female rats. The use of L-NAME caused a sharp decrease of NO_2^- in gonadectomized male rats and significantly less in female. These results are evidence of the depending of NO synthesis modulators effects on the sex and hormonal state of organism.

KEY WORDS: gonadectomy, NO, nitrite anion, L-arginin, L-NAME.

Отримано 11.12.2009 р.

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

ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ВИВЧЕННЯ ГАСТРОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ КОМБІНАЦІЇ КВЕРЦЕТИНУ ТА ПОХІДНИХ ГЛЮКОЗАМІНУ ПРИ СЕРОТОНІНОВОМУ УРАЖЕННІ ШЛУНКА ЩУРІВ

О.О. Андрєєва, В.Ф. Усенко¹, І.А. Зупанець
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ
ЗАТ "НВЦ БОРЩАГІВСЬКИЙ ХФЗ"¹

Проведено морфологічну оцінку гастропротекторних властивостей комбінації кверцетину та похідних глюкозаміну на моделі серотонінового пошкодження слизової оболонки шлунка білих щурів. Для цього було досліджено зразки стінки з ділянки дна шлунка щурів таких груп: контрольної патології; після профілактично-лікувального введення комбінації; препарати порівняння кверцетин та сукральфат у тому ж режимі, а також зразки аналогічних ділянок стінки шлунка інтактних тварин. Профілактично-лікувальне введення щурів комбінації кверцетину та похідних глюкозаміну суттєво попереджує деструктивні зміни у слизовій оболонці скомпрометованих ділянок шлунка. Морфологічна картина слизової оболонки шлунка тварин, які отримували препарати порівняння, характеризувалась меншою динамікою позитивних змін порівняно з оригінальним препаратом. Проведені дослідження підтверджують гастропротекторні властивості комбінації кверцетину та похідних глюкозаміну й обґрунтовують доцільність її подальшого фармакологічного вивчення як ефективного та безпечного гастропротекторного засобу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: виразка шлунка, кверцетин, глюкозамін, морфологічне дослідження.

ВСТУП. Питома вага виразки шлунка серед гастроентерологічних захворювань на сьогодні залишається на доволі високому рівні. У світі, за різними оцінками, від 10 до 20 % дорослого працездатного населення страждає від даної патології [3, 13]. У зв'язку з цим, пошук нових фармакологічних вирішень лікарської терапії виразки шлунка продовжується [1,9].

Метою даної роботи був пошук напрямів експериментального вивчення гастропротекторної дії оригінальної комбінації кверцетину з похідними глюкозаміну. Гастропротекторну дію цих речовин достатньо вивчено. Проте препарат, створений на основі їх комбінації, потребує детального дослідження, оскільки його складові природно доповнюють одна одну.

Кверцетин, який входить до складу комбінації, проявляє протизапальний ефект: в результаті блокади ліпооксигеназного шляху метаболізму арахідонової кислоти знижує синтез лейкотрієнів, серотоніну й інших медіаторів запалення [7, 8, 12]. Отже, можна припустити взаємне посилення гастропротекторної дії кверцетину і похідних глюкозаміну за умови їх сумісного застосування.

При експериментальному вивченні проти-виразкової дії похідних глюкозаміну встановлено, що глюкозаміну гідрохлорид та N-ацетилглюкозамін проявляють більш виражену противиразкову активність, причому без особ-

ливого впливу на моторну та секреторну функції шлунково-кишкового тракту [2, 4]. Як невід'ємний структурний елемент шлункового слизу ГА активно включається безпосередньо в процес її утворення, має виражену протизапальну, мембранозахисну та антиоксидантну дію [11, 14]. В результаті проведених експериментальних досліджень на моделі етанол-преднізолонних виразок слизової оболонки шлунка встановлено виражену гастропротекторну дію комбінації, яку вивчають [5]. Глюкозаміну гідрохлорид підвищує вміст простагландину PGE₁, простагландину PGI₂ і знижує рівень тромбоксану TxB₂, простагландинів PGF_{1α} та PGF_{2α} у сироватці крові [3]. Також він нормалізує вміст ендogenous N-ацетилглюкозаміну в сироватці крові й слизовій оболонці шлунка тварин з експериментальною виразкою шлунка [3, 6].

Таким чином, з огляду на отримані результати, закономірним було рішення про подальше експериментальне вивчення фармакологічної дії комбінації кверцетину та похідних глюкозаміну. Дослідження проводили на моделі серотонінового пошкодження слизової оболонки шлунка щурів з подальшим її морфологічним вивченням.

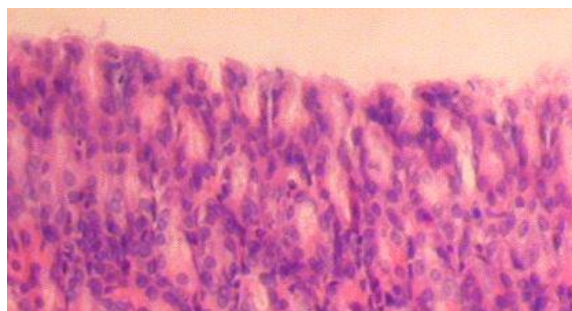
МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліджено зразки стінки з ділянки дна шлунка щурів різних груп: після моделювання гострої виразки шляхом екзогенного введення серотоніну [10] (контрольна патологія); після профілактично-ліку-

© О.О. Андрєєва, В.Ф. Усенко, І.А. Зупанець, 2010.

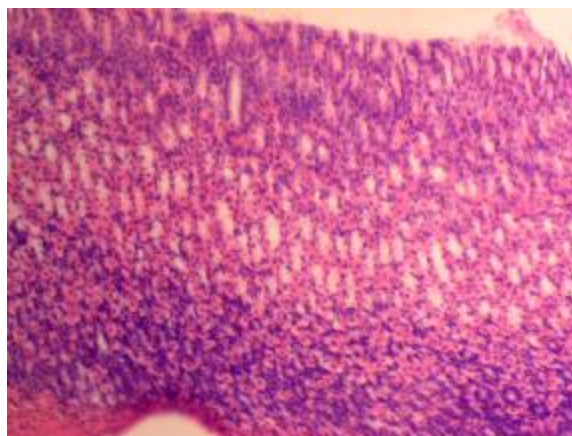
вального введення комбінації на тлі формування серотонінової виразки або препаратів порівняння кверцетину чи сукральфату, а також зразки аналогічних ділянок стінки шлунка інтактних тварин (інтактний контроль). Усіх щурів виведено з експерименту через добу після введення серотоніну – піддано евтаназії шляхом декапітації. Для дослідження забирали шлунок, розтинали його по великій кривизні, промивали ізотонічним розчином NaCl. Зрізи фарбували гематоксиліном та еозином. На препаратах проводили напівкількісну оцінку деструктивних порушень у слизовій оболонці за такою шкалою: 5 балів – некроз усіх шарів слизової оболонки, розповсюджений на 1/2-2/3 препарату; 4 бали – некроз до 1/2 товщі слизової оболонки, розповсюджений на 1/2-2/3 препарату; 3 бали – виразка з відторгненням некротичних тканин, розповсюджена на 1/2-2/3 препарату; 2 бали – поверхневі ерозії (осередковане пошкодження покривно-ямкового епітелію та шийок залоз); 1 бал – дрібна осередкована десквамація покривного епітелію; 0 балів – відсутність змін. Розглядали мікропрепарати під мікроскопом Mikros 400 (Австрія), мікрофотографування мікроскопічних зображень здійснювали цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програми Nikon View 5.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При мікроскопічному дослідженні стану стінки шлунка щурів групи інтактного контролю встановлено, що слизова оболонка містить велику кількість валиків, поверхня яких прикрита помірно високими циліндричними епітеліальними клітинами, що активно функціонують. Шлункові ямки доволі глибокі. Власні залози щільно розташовані, довгі. Територіальне розташування та співвідношення у них залозистих клітин звичайні. Парієтальні клітини помірно оксифільні, за кількістю превають над іншими залозистими клітинами, розповсюджені на 2/3 тіла залоз. Головні клітини переважають у кінцевих відділах залоз (рис. 1). Строма слизової оболонки помірно повнокровна, містить варіабельну кількість лімфоцитів та еозинофільних клітин.

При дослідженні зразків шлунка щурів групи контрольної патології встановлено, що практично у всіх тварин цієї групи в слизовій оболонці виявляли великі ділянки некрозу, що проникали на різну глибину. У більшості випадків некроз слизової оболонки охоплював усю її товщу, іноді некротичні зміни розповсюджувалися приблизно на 1/2 слизової оболонки, захоплюючи покривно-ямковий



А



Б

Рис. 1. Ділянка дна слизової оболонки шлунка інтактного щура: А – покривно-ямковий епітелій функціонально активний. Гематоксилін-еозин. $\times 250$. Б – нормальне територіальне співвідношення парієтальних, головних та додаткових клітин у власних залозах; нормальний рівень активності головних клітин. Гематоксилін-еозин. $\times 100$.

епітелій, шийку і, частково, тіло залоз. Базальні відділи тіл таких залоз дезорганізовані. У глибині, під зоною некрозу, як правило, видно масивні крововиливи. Демаркація не виразна, місцями відсутня (рис. 2).

Профілактично-лікувальне введення щурів комбінації кверцетину та похідних глюкозаміну суттєво попереджує деструктивні зміни у слизовій оболонці скомпрометованих ділянок шлунка. Так, у 55 % випадків гістоархітекtonіка слизової оболонки збережена. Місцями на досліджених ділянках слизової оболонки помічено зменшення висоти епітеліальних клітин, незначну проліферацію клітин, нечітку полярність їх. Субепітеліально видно вогнищевий набряк, повнокров'я капілярів (рис. 3, А). Проте на інших ділянках епітеліальні клітини функціонально активні, практично не змінені (рис. 3, Б). Власні залози дна довгі, щільно розташовані, місцями дещо поширений просвіт залоз. Додаткові та парієтальні клітини власних залоз зовні не змінені. Останні розповсюджені до базальних відділів залоз. Головні клітини помітно збіднені секретом, хоча і більш активні порівняно з контрольною патологією.

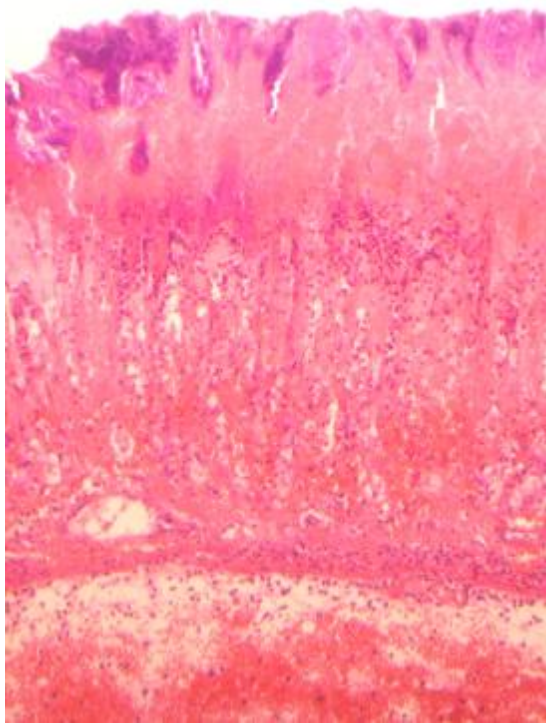
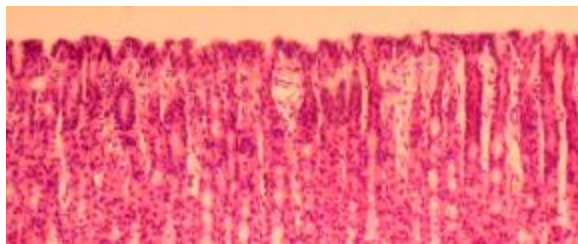
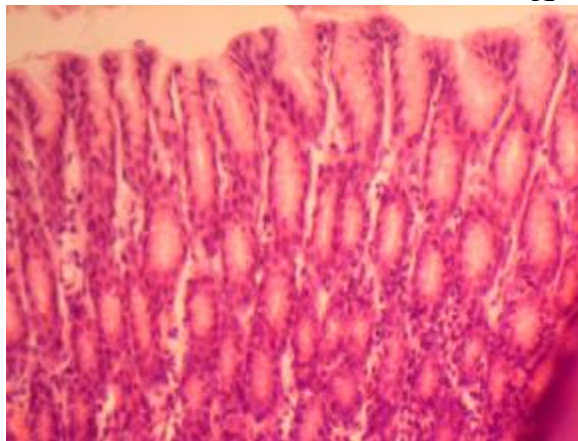


Рис. 2. Ділянка дна слизової оболонки шлунка щура після введення йому серотоніну. Тотальний некроз усіх шарів, крововиливи під зоною некрозу, набряк та масивний крововилив у підслизовому шарі. Гематоксилін-еозин. x100.



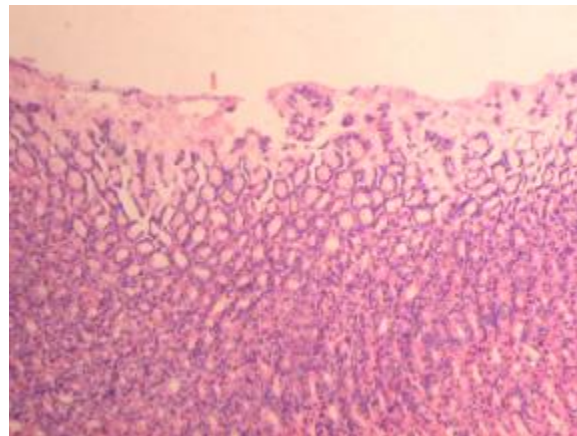
А



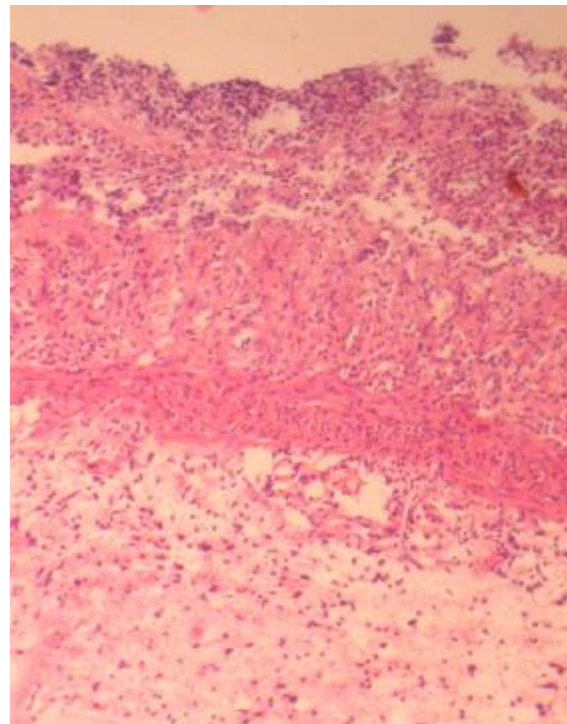
Б

Рис. 3. Ділянка дна слизової оболонки шлунка щура, якому вводили комбінацію на тлі серотоніну: А – невиразна проліферація покривного епітелію; незначний набряк субепітеліально. Б – функціонально активні клітини покривно-ямкового епітелію. Гематоксилін-еозин. x250.

У 9 % випадків у слизовій оболонці досліджених ділянок шлунка переважали осередковані десквамативні процеси з формуванням поверхневих ерозій, що зачіпали покривний епітелій, зону шлункових ямочок, рідше – верхню третину залоз, а у 27 % – лише покривно-ямковий епітелій (рис. 4, А). Тільки у 9 % щурів дефект слизової оболонки був поширеним: некротично змінені шари секвестровано, дно виразки складало залишки клітинного детриту та м'язова пластинка (рис. 4, Б).



А



Б

Рис. 4. Ділянка дна слизової оболонки шлунка щура, якому вводили комбінацію на тлі серотоніну: А – поверхнева ерозія; збереженість гістоархітекtonіки залозистих трубок під зоною ерозії. Б – виразка з відторгненням некротичних тканин. Гематоксилін-еозин. x250.

Введення шурам кверцетину в тому ж режимі, що і комбінація, яку вивчали, запобігло виникненню гострих дегенеративних змін у слизовій оболонці шлунка 36 % тварин. Морфологічно стан слизової оболонки у цих щурів нагадував такий у більшості тварин, які отримували комбінацію. У деяких щурів, на відміну від комбінації, спостерігали більш виражений набряк підслизового шару (рис. 5).

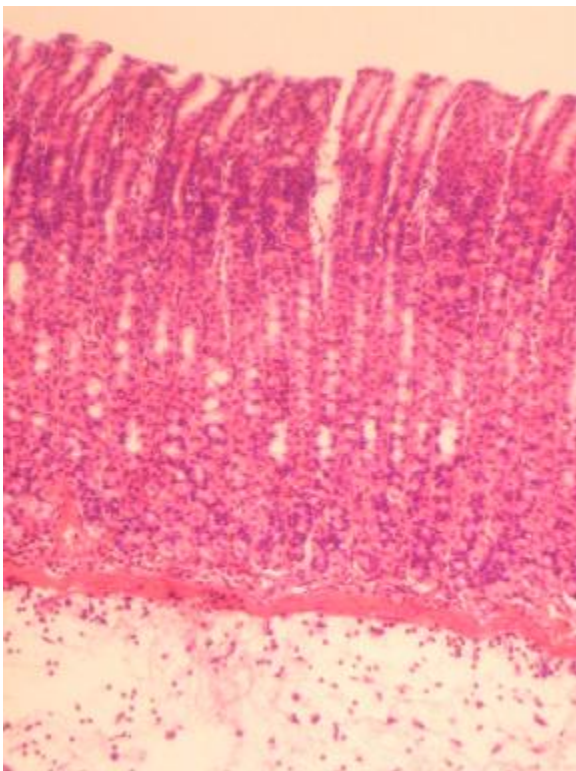
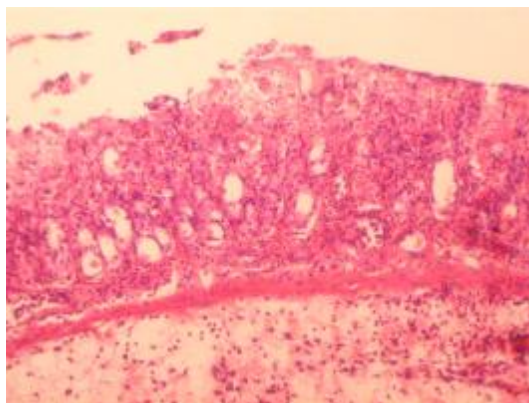


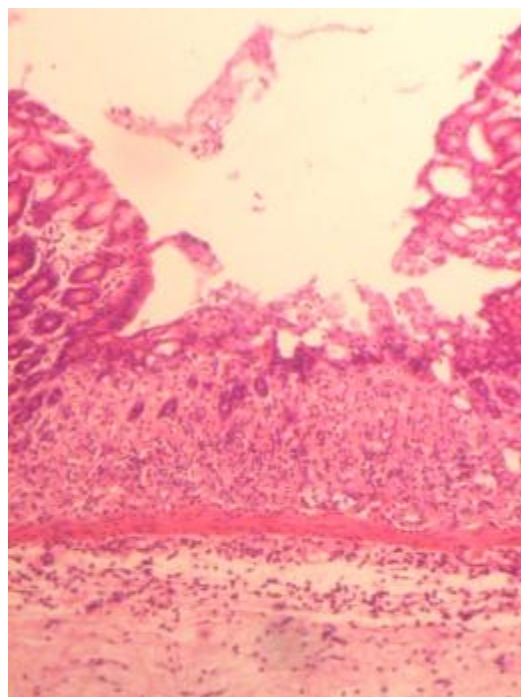
Рис. 5. Ділянка дна слизової оболонки шлунка щура, якому вводили кверцетин на тлі серотоніну. Збережена структура слизової оболонки, набряк підслизового шару. Гематоксилін-еозин. $\times 100$.

У 9 % щурів цієї групи відмічено поверхневі ерозії слизової оболонки досліджених ділянок. У решті 55 % випадків у слизовій оболонці досліджених ділянок дна спостерігали різні за глибиною виразки з відторгненням некротичних тканин (рис. 6).

Профілактичне введення сукральфату, на відміну від кверцетину та комбінації його і похідних глюкозаміну, запобігало деструкції лише у 20 % щурів. У 30 % спостерігали поверхневі ерозії слизової оболонки, а у решті 50 % тварин розповсюджені були різні за розміром і ступенем вираження некротично-дегенеративні зміни у слизовій оболонці шлунка, морфологічно аналогічні описаним при контрольній патології. Відповідно, досить вираженими були набряк підслизового шару, запальна реакція як у власний пластинці слизової оболонки, так і в підслизовому шарі. У



А

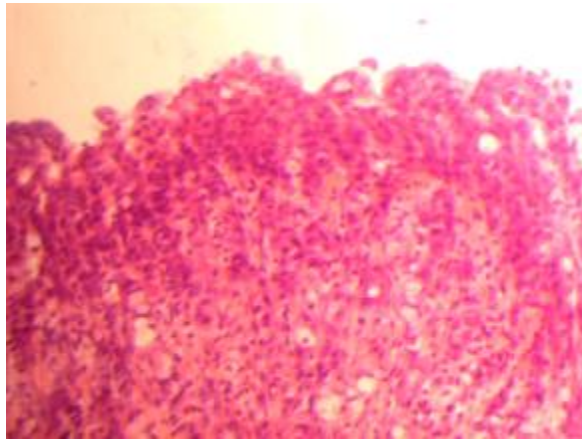


Б

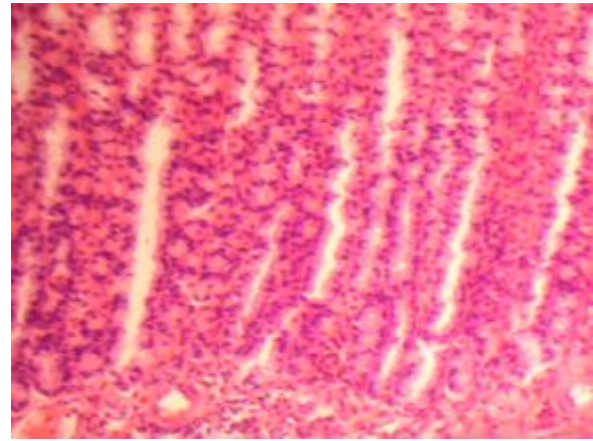
Рис. 6. Ділянка дна слизової оболонки шлунка щура, якому вводили кверцетин на тлі серотоніну. Різні за розміром виразки з відторгненням некротичних тканин. Гематоксилін-еозин. $\times 250$.

прилеглих до виразок ділянках слизової оболонки морфологія парієтальних, головних та додаткових клітин власних залоз, стан покрито-ямкового епітелію та строми слизової оболонки мало чим відрізнялися від контрольної патології (рис. 7).

Таким чином, проведене дослідження морфоструктури слизової оболонки шлунка щурів різних груп показало позитивний попереджувальний вплив усіх вивчених препаратів на розвиток гострих виразок. Однак ефект цієї дії був різним. Для більшої зручності порівняння зміни структури, що спостерігалися у слизовій оболонці шлунка тварин, оцінювали напівкількісно (табл. 1).



А



Б

Рис. 7. Ділянка дна слизової оболонки шлунка щура, якому вводили сукральфат на тлі серотоніну: А – проліферація покривно-ямкового епітелію на прилеглий до дефекту ділянці. Б – зменшена активність головних клітин власних залоз. Гематоксилін-еозин. х250.

Таблиця 1 – Вираження патологічних змін у слизовій оболонці шлунка щурів та вплив на них комбінації кверцетину і сукральфату при моделюванні гострої серотонінової виразки

| Умови експерименту | Ознаки | | | | |
|----------------------------------|------------------------------|---|--------------------------------------|---|---|
| | Деструкція слизової оболонки | Набряк слизової оболонки та підслизового шару | Запальна реакція у підслизовому шарі | Порушення кровообігу в слизовій оболонці та підслизовому шарі | Проліферативні процеси у покривно-ямковому епітелії |
| Інтактний контроль | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Контрольна патологія (серотонін) | 3,70±0,21 | 4,10±0,30 | 3,50±0,26 | 2,40±0,23 | 1,80±0,19 |
| Комбінація + серотонін | 0,73±0,32* | 1,45±0,33* | 1,09±0,12* | 1,36±0,69 | 0,63±0,26* |
| Кверцетин + серотонін | 1,82±0,40* | 1,45±0,33* | 2,09±0,65 | 1,36±0,21* | 1,64±0,23 |
| Сукральфат + серотонін | 2,30±0,51* | 2,60±0,55* | 2,70±0,62 | 1,70±0,10* | 1,50±0,44 |

Примітка. * – відхилення показників вірогідне відносно показників контрольної патології, $p > 0,05$.

Узагальнюючи отримані морфологічні якісні та напівкількісні показники стану слизової оболонки шлунка щурів різних груп, можна констатувати таке.

Введення серотоніну викликає у слизовій оболонці шлунка тварин гострі деструктивні зміни, що зумовлені послабленням захисного муцинового бар'єру, активацією кислотного фактора та виснаженням пептидного фактора.

Комбінація кверцетину та похідних глюкозаміну підвищує резистентність слизової оболонки, запобігає виникненню дегенеративних змін. Деструктивні зміни, порівняно з контрольною патологією, зменшились у 5 разів, вони не мали такого необоротного характеру, як при контрольній патології. Набряк та запальна реакція зменшились у 2,8 та 3,2 рази відповідно.

Мікроциркуляторні процеси покращились у 2,2 рази. Проліферативні процеси у покривно-ямковому епітелії зменшились у 2,8 рази.

ВИСНОВКИ. 1. Комбінація кверцетину і похідних глюкозаміну проявляє виражену гастропротекторну дію.

2. Препарат порівняння кверцетин за потужністю гастропротекторної дії більш наближений до комбінації кверцетину та похідних глюкозаміну, ніж сукральфат.

3. Комбінація кверцетину та похідних глюкозаміну потребує подальшого фармакологічного вивчення з метою створення і використання в медичній практиці нового оригінального й безпечного гастропротекторного засобу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андреева О.О. Деякі аспекти вивчення гастропротекторних властивостей комбінації похідних глюкозаміну та кверцетину при експериментальній виразці шлунка щурів // Мат. VIII Всеукр. наук.-практ. конф. "Клінічна фармація в Україні" / М-во охорони здоров'я України; Нац. фармац. ун-т. – Х., 2008. – С. 126-127.
2. Дровозов С.М., Зупанець І.А., Яковлева Л.В. та ін. Глюкозаміни – перспективні цукри для створення протизапальних засобів // Фармац. журн. – 1992. – № 2. – С. 37-41.
3. Зупанець І.А., Попов С.Б., Отришко І.А. Фармакодинамічний потенціал аміносахара глюкозамина // Мат. VI Всеукр. наук.-практ. конф. "Клінічна фармація в Україні". – Х., 2007. – С. 118-119.
4. Зупанець І.А. Экспериментальное обоснование использования глюкозамина и его производных в медицине: Дисс. ... д-ра мед. наук (в форме научного доклада). – Купавна, 1993. – 90 с.
5. Зупанець І.А., Андреева О.О. Вплив комбінації глюкозаміну та кверцетину при етанол-преднізолонному ураженні шлунка у щурів // Мат. VII Всеукр. наук.-практ. конф. "Клінічна фармація в Україні". – Х., 2007. – С. 145.
6. Зупанець І.А., Попов С.Б., Шебеко С.К. та ін. Динаміка вмісту ендogenousного N-ацетилглюкозаміну при запально-деструктивних процесах різної етіології та під впливом експериментальної терапії // Клін. фармація. – 2004. – 8, № 4. – С. 34-37.
7. Ковалев В.Б., Ковган В.В., Колчина Е.Ю. Механизмы лечебного действия биофлавоноида кверцетина (обзор литературы) // Укр. мед. альманах. – 1999. – 2, № 4. – С. 176-182.
8. Максютин Н.П., Мойбенко О.О., Пархоменко О.М. та ін. Використання нових лікарських форм кверцетину при ішемічних та радіаційних ушкодженнях: Метод. рекомендації. – К., 2000.
9. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. – М.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. – 424 с.
10. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
11. Черних В.П., Зупанець І.А., Шебеко С.К., Безуглая Н.П. Клинико-фармацевтические основы фармакодинамики глюкозамина // Вісник фармакології та фармації. – 2008. – № 4. – С. 40-47.
12. Anjaneyulu M., Chopra K. Quercetin, an Antioxidant bioflavonoid // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. – 2004. – 2, № 31. – P. 244-248.
13. Lanas A. Am J Gastroenterol. – 2005. – 100. – P. 1685-1693.
14. Nowak A., Szczesniak L., Rychlewski T. Glucosamine in serum of patients after myocardial infarction subjected to rehabilitation training // J. Physiol. Pharmacol. – 1998. – 49, № 2. – P. 293-301.

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГАСТРОПРОТЕКТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ КОМБИНАЦИИ КВЕРЦЕТИНА И ПРОИЗВОДНЫХ ГЛЮКОЗАМИНА ПРИ СЕРОТОНИНОВОМ ПОРАЖЕНИИ ЖЕЛУДКА КРЫС

Е.А. Андреева, В.Ф. Усенко¹, И.А. Зупанец
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ
ЗАО "НПЦ БОРЩАГОВСКИЙ ХФЗ"¹

Резюме

Проведена морфологическая оценка гастропротекторных свойств комбинации кверцетина и производных глюкозамина на модели серотонинового повреждения слизистой оболочки желудка белых крыс. Для этого были исследованы образцы стенки из участка дна желудка крыс следующих групп: контрольной патологии; после профилактически-лечебного введения комбинации; препараты сравнения кверцетин и сукральфат в том же режиме, а также образцы аналогичных участков стенки желудка интактных животных. Профилактически-лечебное введение крысам комбинации кверцетина и производных глюкозамина существенно предупреждает деструктивные изменения в слизистой оболочке скомпрометированных участков желудка. Морфологическая картина слизистой оболочки желудка животных, которые получали препараты сравнения, характеризовалась меньшей динамикой позитивных изменений по сравнению с оригинальным препаратом. Проведенные исследования подтверждают гастропротекторные свойства комбинации кверцетина и производных глюкозамина и обосновывают целесообразность ее последующего фармакологического изучения как эффективного и безопасного гастропротекторного средства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: язва желудка, кверцетин, глюкозамин, морфологическое исследование.

PHARMACOLOGICAL STUDY THE GASTROPROTEKTIVE ACTION OF QUERCETIN AND GLUCOSAMINE DERIVATIVES COMBINATION AT SEROTONIN STOMACH DAMAGE IN RATS

O.O. Andreeva, V.F.Usenko¹, I.A. Zupanets
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV
SIC "BORSHCHAHIVSKIY CHEMICAL-PHARMACEUTICAL PLANT" CJSC¹

Summary

The morphological estimation of gastroprotektive properties of quercetinum and derivatives of glucosamine combinations on the model of serotonin damage of mucus shell of stomach in white rats have been conducted. For this purpose the standards of wall from the area of bottom of rats stomach of the followings groups were investigated: control pathology; after application of combination; reference-drugs – quercetinum and sukralfatum in the same regimen, and also standards of analogical areas of stomach wall of intact animals. Introduction of quercetinum and derivatives of glucosamine combinations substantially warns destructive changes in the compromised areas of stomach of rats. Morphological picture of mucus shell of animals stomach, which received reference-drugs characterized the less dynamics of positive changes, comparatively with original drug. The conducted researches confirmed the gastroprotektive properties of quercetinum and derivatives of glucosamine combinations, and ground expedience of it subsequent pharmacological study as effective and safe gastroprotektive drug.

KEY WORDS: **gaster, quercetin, glucosamine, morphological reseach.**

Отримано 15.12.2009 р.

Адреса для листування: О.О. Андреева, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.

ІНДИВІДУАЛЬНІ ЗМІНИ ЦИТОКІНОВОГО СТАТУСУ ЗАЛЕЖНО ВІД СТАНУ МІКРОБІОЦЕНОЗУ ТОВСТОЇ КИШКИ ХВОРИХ НА НЕСПЕЦИФІЧНИЙ ВИРАЗКОВИЙ КОЛІТ

С.Ю. Єгорова, К.Г. Гаркава¹, В.Є. Кудрявцева
ІНСТИТУТ ГАСТРОЕНТЕРОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ¹

Проведено дослідження цитокінового статусу в 62 хворих на неспецифічний виразковий коліт. Встановлено взаємозв'язки між відхиленнями в мікробіоценозі та рівнем цитокінів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: цитокіни, мікрофлора, неспецифічний виразковий коліт.

ВСТУП. Неспецифічний виразковий коліт (НВК) – хронічне захворювання товстої кишки нез'ясованої етіології, що характеризується запально-деструктивним ураженням її слизової оболонки, утворенням виразок і кишковими кровотечами. Важливу роль у патогенезі неспецифічного виразкового коліту відводять дисбалансу цитокінів із прозапальною та протизапальною (регуляторними) діями [4]. Цитокіни (медіатори, фактори клітинної взаємодії) – низькомолекулярні білки, які продукуються та секретуються переважно активованими клітинами імунної системи і беруть участь у розвитку імунних реакцій за клітинним або гуморальним типом. Вони виробляються транзиторно (індуцибельно), мають короткий напівперіод життя і діють в дуже низьких концентраціях, зв'язуючись із високоафінними рецепторами на поверхні клітин-мішеней [2].

Практично усі поліпептидні медіатори, що генералізують запальну відповідь, функціонально об'єднуються з продукуючими клітинами і клітинами-рецепторами. Ці медіаторні системи багатофункціональні й володіють фізіологічними ефектами, що перекриваються. Розгортання процесів запалення на регіональному рівні й на рівні організму є обов'язковою підготовчою фазою включення адаптивної складової систем імунореактивності. Від того, як перебігає ця фаза, залежатиме функціонування всієї імунної системи на етапі розгортання подій адаптивного імунітету [3]. Нездатність відновити баланс прозапальних і протизапальних агентів призводить до ураження і деструкції тканин, що характеризує хронічне запалення [8].

© С.Ю. Єгорова, К.Г. Гаркава, В.Є. Кудрявцева, 2010.

Кишкова мікрофлора в розвитку неспецифічного виразкового коліту розглядається як один із стимулів, що призводять до ініціації запалення, активуючи синтез макрофагами цитокінів [6]. Існує припущення, що цитокіни відіграють важливу роль не тільки в ініціації запального процесу, але й у регуляції активності кишкової мікрофлори [5]. Тому імунопатологічні механізми розглядалися нами з позиції їх потенційного і припустимого зв'язку зі станом мікрофлори товстої кишки.

Мета роботи – охарактеризувати індивідуальні зміни цитокінового статусу хворих на неспецифічний виразковий коліт залежно від стану мікрофлори товстої кишки.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Обстежено 62 хворих на НВК. Серед них жінок було 38, чоловіків – 24, середній вік – (40,6±1,29) років. Інтерлейкін-4 (ІЛ-4), інтерлейкін-6 (ІЛ-6), інтерлейкін-8 (ІЛ-8), фактор некрозу пухлин-альфа (ФНП-α), інтерферон-альфа (ІФН-α), інтерферон-гамма (ІФН-γ) визначали у сироватці крові методом твердофазного імуноферментного аналізу за допомогою тест-систем ЗАТ “Вектор-Бест” (Новосибірськ). Вимірювання оптичної щільності проводили за допомогою імуноферментного аналізатора “Stat Fax 303 Plus” (США). Дослідження видового та кількісного складу мікрофлори товстої кишки виконували методом посіву десятикратних розведень на стандартний набір селективних та диференційно-діагностичних поживних середовищ. Хворих, залежно від отриманих даних мікробіологічного дослідження, було поділено на 3 групи. 1-шу групу склали 16 пацієнтів із I ступенем дисбіозу, 2-гу – 20 пацієнтів із II ступе-

нем дисбіозу, 3-тю – 26 пацієнтів із III ступенем дисбіозу. До контрольної групи ввійшло 15 практично здорових осіб, зіставлених за віком і статтю. Для статистичної обробки даних використовували методи непараметричної статистики (U-критерій Манна-Уїтні) і кореляційний аналіз.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В обстежених хворих спостерігали достовірне підвищення рівня як прозапальних (ІЛ-6, ІЛ-8, ФНП- α , ІФН- γ), так і протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІФН- α) порівняно з контрольною групою (табл. 1). Найбільш вагомим відхиленням були притаманні ІЛ-8 та ФНП- α . У хворих 2-ї і 3-ї груп рівень прозапальних цитокінів достовірно підвищувався порівняно з пацієнтами 1-ї групи. Так, рівень ІЛ-6 в 2-й групі був у 4 рази вищим за такий у 1-й, в 3-й групі – у 3 рази. Рівень ІЛ-8 в 2-й групі був у 5 разів вищим за показники 1-ї групи, в 3-й групі – у 3 рази. ФНП- α мав достовірну відмінність у пацієнтів 2-ї (у 16 разів) і 3-ї (у 17 разів) груп порівняно з хворими 1-ї групи. Рівень ІЛ-4 був достовірно підвищеним в усіх групах відносно контролю, але ми не спостері-

гали значного зростання рівня ІЛ-4, здатного обмежити запальний процес. ІФН- α був достовірно підвищеним у 1-й групі й мав тенденцію до збільшення в 2-й і 3-й групах.

При аналізі отриманих даних було виявлено, що межі коливань рівня системної циркуляції цитокінів у всіх групах хворих дуже великі, тому аналіз середніх величин в даному випадку є неточним, оскільки усереднює варіації параметрів окремих осіб у групі. Саме тому ми порівнювали індивідуальні (окремо у кожного хворого) показники цитокінового статусу (табл. 2). Вміст цитокінів у сироватці крові диференціювали як такий, що відповідає нормі, підвищений рівень (в 1,2-5 разів) або значно підвищений (у 5-10 разів). Встановили, що серед хворих з нормальним рівнем ФНП- α (від 0 до 5 пг/мл) були пацієнти з дисбіотичними порушеннями різного ступеня тяжкості, зумовленими, головним чином, зниженням кількісного вмісту основних симбіонтів мікробного біоценозу товстої кишки біфідобактерій і лактобактерій, а у 42 % хворих – додатково підвищенням концентрації вмісту дріжджоподібних грибів.

Таблиця 1 – Рівень цитокінів залежно від стану мікробіоценозу товстої кишки

| Вміст цитокінів, пг/мл | 1-ша група (n=16) | 2-га група (n=20) | 3-тя група (n=26) | Контроль (n=15) |
|--|--|-------------------------------------|---|----------------------------|
| ІЛ-4 (M \pm m) Мінімальне/максимальне значення | 37,63 \pm 6,73* 20,9/54,6 | 33,5 \pm 1,15** 31,8/35,7 | 37,28 \pm 1,97** 30,7/41,5 | 18,5 \pm 1,67 0/21,2 |
| ІЛ-6 (M \pm m) Мінімальне/максимальне значення | 8,57 \pm 1,99 0/20,1 | 34,87 \pm 7,06*~ 22,0/49,7 | 28,90 \pm 4,40*# 0/52,4 | 9,70 \pm 2,24 0/10,5 |
| ІЛ-8 (M \pm m) Мінімальне/максимальне значення | 51,10 \pm 10,11 [†] 0/136,8 | 265,20 \pm 32,81*# 10,6/316,3 | 143,71 \pm 27,24**~ 12,4/196,42 | 26,01 \pm 2,62 0/35,4 |
| ФНП- α (M \pm m) Мінімальне/максимальне значення | 8,41 \pm 2,02* 1,4/8,9 | 140,27 \pm 28,18**# 43,9/188,9 | 145,28 \pm 24,93**# 2,8/202,3 | 2,20 \pm 0,81 0/6,5 |
| ІФН- α (M \pm m) Мінімальне/максимальне значення | 37,93 \pm 6,89* 10,1/39,4 | 30,28 \pm 5,47 8,4/35,4 | 30,34 \pm 6,11 12,1/33,2 | 23,50 \pm 1,82 0/45 |
| ІФН- γ (M \pm m) Мінімальне/максимальне значення | 79,35 \pm 12,16** ^o 8,4/83,2 | 43,25 \pm 8,16* 14,3/86,2 | 77,86 \pm 12,60** ^o 20,4/92,8 | 21,30 \pm 2,06 0/25 |

Примітка. * – p<0,05 порівняно з контролем; ** – p<0,001 порівняно з контролем; ~ – p<0,05 порівняно з 1-ю групою; # – p<0,001 порівняно з 1-ю групою; ^o – p<0,05 порівняно з 2-ю групою.

Звертав на себе увагу той факт, що у хворих з нормальним рівнем ФНП- α ми також не спостерігали значного підвищення рівня прозапального ІЛ-8 (концентрація коливалась від 12,4 до 47,1 пг/мл). Таке положення справ можна розцінювати як результат пригнічення функціональної, у тому числі й цитокінопродукуючої, активності імунокомпетентних клітин,

розвитку вторинного дефіциту, а також ефекту терапії кортикостероїдами. Підвищення в 1,2-10 разів рівня ФНП- α збігалось з появою та підвищенням концентрації кишкової палички з гемолітичними та лактозонегативними властивостями, біогенних та гнильних мікробів (*Staphylococcus aureus*, *Proteus* sp.).

Таблиця 2 – Індивідуальні зміни рівня цитокінів у сироватці крові хворих на НВК

| Досліджуваний цитокін | Кількість обстежених хворих | Нормальний рівень | Підвищений | Значно підвищений |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------|------------|-------------------|
| ІЛ-4 | 62 (100 %) | 0 | 62 (100 %) | 0 |
| ІЛ-6 | | 35 (56 %) | 26 (42 %) | 0 |
| ІЛ-8 | | 21 (33 %) | 16 (25 %) | 26 (42 %) |
| ФНП- α | | 20 (32 %) | 21 (34 %) | 21 (34 %) |
| ІФН- α | | 15 (24 %) | 47 (76 %) | 0 |
| ІФН- γ | | 33 (53 %) | 29 (47 %) | 0 |

Примітка. Вказано абсолютну кількість хворих і відсоток хворих.

Ми не спостерігали значного зростання рівня прозапального ІЛ-6 в обстежених хворих. Максимальні значення мали місце у хворих, в яких підвищувалась концентрація кишкової палички з гемолітичними властивостями (тобто з наявністю "агресивних" штамів). ІЛ-6 вважають сильним прозапальним медіатором (активність ІЛ-6 в 1000 разів перевищує таку ФНП- β і ІЛ-1 в індукції гострофазої відповіді печінки). Проте основною функцією гострофазових білків є обмеження вогнища запалення.

Зміни рівня протизапального ІЛ-4 були досить однорідними у всіх обстежених хворих – збільшеними в 1,2-5 разів.

У пацієнтів з підвищеним рівнем прозапальних цитокінів дисбіотичні порушення різного ступеня тяжкості були зумовлені дисбалансом цукролітичної та протеолітичної мікрофлори. Зниження кількості цукролітичних мікроорганізмів сприяє зростанню концентрації протеолітичної, тобто грамнегативної, мікрофлори. Це призводить до збільшення пулу токсичних речовин (ліпополісахаридів та інших мікробних агентів, функціонально схожих з ендотоксинами), що підвищує рівень ендогенної інтоксикації, викликає складний гуморальний і клітинний відгук через індукцію цитокінів.

В ході дослідження встановили наявність позитивного кореляційного зв'язку між рівнями ІЛ-8 і ФНП- α ($r=0,602$, $p<0,001$), ІФН- α і ІФН- γ ($r=0,693$, $p<0,001$). У 2-й і 3-й групах хворих при проведенні кореляційного аналізу виявили зворотний взаємозв'язок між рівнем ФНП- α і кількістю біфідобактерій ($r=-0,993$; $p=0,007$), кількістю кишкової палички ($r=-0,997$; $p=0,003$).

Таким чином, існує зв'язок між певними параметрами цитокінової ланки імунної системи та змінами в мікрофлорі. Подальші дослідження у даному напрямку необхідні для розуміння взаємозв'язків макроорганізму і мікрофлори при неспецифічних запальних захворюваннях. Кишечник є джерелом ліпополісахаридів (ЛПС) в організмі людини – багато бактерій втрачають компоненти зовнішньої мембрани, наново синтезують їх для підтримки функціональної цілісності мікробної клітини. Невеликі дози ліпополісахаридів вважають корисними через їх здатність підвищувати неспецифічну резистентність організму до інфекцій і пухлин [1]. У нормальних умовах взаємозв'язків природної мікрофлори з організмом ліпополісахарид діє не як чинник вірулентності, а як гомеостатичний регулятор, індуючи мережу цитокінів [7]. Сучасні уявлення щодо регуляції цитокінового каскаду, зумовленого дією ЛПС, вельми обмежені. Участь конкретних цитокінів у розвитку запального процесу важко зрозуміти і пояснити саме внаслідок їх комплексного функціонування, адже ці молекули не діють окремо – вони здійснюють свої функції разом з іншими медіаторами.

ВИСНОВКИ. НВК, згідно з нашим дослідженням, супроводжується підвищеним синтезом цитокінів, які проявляють як прозапальну, так і протизапальну дію. Індивідуальні зміни цитокінового статусу хворих на НВК досить різноманітні. Існує взаємозв'язок між підвищенням рівня прозапальних цитокінів ІЛ-8 і ФНП- α та порушеннями в мікробіоценозі товстої кишки при НВК.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бондаренко В.М., Лиходед В.Г., Яковлев М.Ю. Определение эндотоксина грамотрицательных бактерий в крови человека // Журн. микробиол. – 2002. – № 2. – С. 83-89.
2. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Диагностическая ценность исследования цитокинов в клинической практике // Цитокины и воспаление. – 2003. – 2, № 3. – С. 20-35.
3. Лебедев В.Ф., Козлов В.К. Иммуноterapia рекомбинантным интерлейкином-2 тяжелых ранений и травм. – СПб.: Изд-во Санкт-Петербургского ун-та, 2004. – 96 с.
4. Маев И.В., Григорян С.С., Гаджиева М.Г., Овчинникова Н.И. Роль цитокинов в патогенезе неспецифического язвенного колита // Клин. медицина. – 2002. – № 1. – С. 15-19.
5. Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Степанова Т.В. Влияние фактора некроза опухоли на размножения вегетативных и некультивируемых форм сальмонел // Журн. микробиол. – 2002. – № 4. – С. 20-25.
6. Титов В.Н. Экзогенные и эндогенные патологические факторы (патогены) как причина воспаления // Клин. лаб. диагностика. – 2004. – № 5. – С. 3-9.
7. Ulmer A.J., Flad H., Rietschel T. et al. Induction of proliferation and cytokine production in human T-lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS) // Toxicology. – 2000. – 152 (1-3). – P. 37-45.
8. Wahl A.F., Wallace P.M. Oncostatin M in the anti-inflammatory response // Ann. Rheum. Dis. – 2001. – 60 (Suppl. 3). – P. 75-80.

ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТОЯНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА ТОЛСТОЙ КИШКИ БОЛЬНЫХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИМ ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ

С.Ю. Егорова, Е.Г. Гаркавая¹, В.Е. Кудрявцева
ИНСТИТУТ ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ А. А. БОГОМОЛЬЦА¹

Резюме

Проведено исследование цитокинового статуса у 62 больных неспецифическим язвенным колитом. Установлено взаимосвязь между отклонениями в микробиоценозе и уровне цитокинов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **цитокины, микрофлора, неспецифический язвенный колит.**

INDIVIDUAL CHANGES OF CYTOKINE STATUS IN DEPENDENCE ON THE STATE OF INTESTINAL MICROFLORA IN PATIENTS WITH NON-SPECIFIC ULCERATIVE COLITIS

S.Yu. Ehorova, K.H. Harkava¹, V.Ye. Kudryavtseva
INSTITUTE OF GASTROENTEROLOGY OF ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES OF UKRAINE
NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY O.O. BOHOMOLOTS¹

Summary

Research of cytokine status in 62 patients with non-specific ulcerative colitis has been conducted. Intercommunication between violations of intestinal microbiocenosis and level of cytokines has been revealed.

KEY WORDS: **cytokines, microflora, non-specific ulcerative colitis.**

Отримано 20.01.2009 р.

Адреса для листування: С.Ю. Егорова, Інститут гастроентерології АМН України, просп. Правди, 96, Дніпропетровськ, 49074, Україна.

ЕЛІМІНАЦІЯ ФЕНОЛУ З ВОДНИХ РОЗЧИНІВ З ВИКОРИСТАННЯМ ВІЛЬНОЇ ТА ІММОБІЛІЗОВАНОЇ ТИРОЗИНАЗИ ГРИБІВ

О.В. Севастьянов

ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМЕНІ О.В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, ОДЕСА

Досліджено елімінацію фенолу (0,5-10,0 ммоль/дм³) з водних розчинів шляхом окиснення за допомогою виділеної модифікованим методом тирозинази (вихід білка 0,67 мг/г грибів, вміст міді 0,19 %, питома активність 500 од/мг білка·хв, фракційний склад вивчено нативним і SDS-електрофорезом) та осадження продуктів біоконверсії вперше використаними неорганічними коагулянтами – алюмокалієвими, алюмоамонійними і залізоамонійними галунами (0,3-2,7 г/дм³). Імобілізований в альгінат кальцію препарат тирозинази каталізував повне окиснення фенолу (0,25-2,00 ммоль/дм³) в реакторі періодичної дії протягом 12-ти циклів з високим рівнем біоконверсії в наступні 16. Показано, що концентрації коагулянтів для осадження продуктів біоконверсії фенолу при використанні імобілізованого ферменту зменшуються, порівняно з вільним, у 2,5 рази.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: тирозиназа, *Agaricus bisporus*, імобілізація, альгінат, фенол, елімінація.

ВСТУП. Перспективним напрямком елімінації високотоксичних фенольних поллютантів зі стічних вод і розчинів є дослідження сучасних методів з використанням окиснювально-відновлювальних ферментів внаслідок їх селективності, можливості застосування в широкому інтервалі рН, температур, концентрацій, утворення менш токсичних продуктів [4, 5].

Оксидоредуктаза тирозиназа (ТИР) (К.Ф. 1.14.18.1) каталізує окиснення фенольних субстратів у присутності молекулярного кисню до відповідних о-хінонів, що неферментативно олігомеризуються до розчинних темнозбарвлених продуктів (М.м. 300-600 Да) [10], які запропоновано видаляти, використовуючи дорогі полімери природного і синтетичного походження: гексаметилендіаміноепіхлоргідрин – поліконденсат, поліетиленімін, хітозан, хітин та ін. [7, 11].

Разом із тим, використання ферментів обмежується високою вартістю комерційних препаратів, нестабільністю, а також одноразовістю застосування, тому доцільне використання частково очищених іммобілізованих ферментних препаратів.

Відомо, що перспективними матрицями для іммобілізації ферментів, з відсутністю токсичності, можливістю модифікації і біодеградації, є природні полісахариди – альгірати [3, 9].

Метою даної роботи було дослідження елімінації фенолу за допомогою частково очищеної вільної та іммобілізованої в гель альгірату кальцію тирозинази з грибів *Agaricus bisporus* і неорганічних коагулянтів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували частково очищений препарат ТИР з грибів *Agaricus bisporus*, виділений згідно з модифікованим нами методом [2]. У виділеному препараті ТИР визначали вміст білка за методом Лоурі в модифікації Хартрі [6], вміст міді – методом атомно-абсорбційної спектроскопії і активність за тирозином [8].

Рівень окиснення фенолу визначали спектрофотометрично за зменшенням його вмісту в інкубаційному середовищі, використовуючи реакцію з 4-аміноантипірином [1]. Окиснення фенолу, що каталізується ТИР, вивчали в діапазоні концентрацій 0,5-10 ммоль/дм³, при рН 6,5, температурі 25 °С за активності ферменту 30-600 од/см³ протягом 3-х год. Коагуляцію продуктів ферментативного окиснення фенолу проводили за допомогою алюмокалієвих, алюмоамонійних і залізоамонійних галунів при початковій концентрації фенолу 0,5-10 ммоль/дм³, концентрації коагулянтів 1-20,7 г/дм³. Іммобілізацію виділеного препарату ТИР здійснювали, додаючи 4 % розчин альгірату натрію, що містить фермент, до 5 % розчину хлориду кальцію.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. З грибів *Agaricus bisporus* отримано частково очищений препарат ТИР з виходом білка 0,67 мг/г грибів, вмістом міди 0,19 %, питомою активністю 500 од/мг білка·хв, високим збереженням активності в межах рН 5,5-7,0 і температури 20-50 °С (80-100 %).

Метод виділення модифікували додаванням полікапроаміду, який зв'язує продукти окиснення поліфенольних сполук (інгібітори ТИР), що дозволило збільшити активність препарату в 3 рази. SDS-електрофорез показав наявність 9 білкових фракцій у препараті: фракції з М.м. (11,5±0,7) і (41-48±4,5) кДа зіставляювані, відповідно, з легкою і важкою субодинаціями ТИР, інші фракції, напевно, представлені ізоформами, баластними білками або продуктами деградації. Нативним електрофорезом в ПААГ виявлено 17 білкових фракцій, 12 з них мають виражену фенолоксидазну активність і становлять 92,5 % загального білка. Оскільки відомо, що препарати грибної ТИР можуть містити домішки інших оксидоредуктаз (лаккази, пероксидази) [5], методом УФ-спектроскопії встановлено наявність максимуму поглинання при λ 280-281 нм і широкого плеча при λ 320-360 нм, що є характерним для спектра ТИР, і показано відсутність максимумів поглинання при λ 403 і 600 нм, властивих пероксидазі й лакказі відповідно.

При трансформації фенолу ТИР спостерігалася лінійна залежність між початковою концентрацією фенолу (0,5-10 ммоль/дм³) і активністю ферменту (рис. 1), що дозволило розрахувати мінімальну активність ферменту, необхідну для 98 % трансформації фенолу, методом лінійної регресії:

$$A_{\text{тир}} = 57,127 \cdot [\text{Фенол}] + 14,019, \quad r = 0,9960,$$

де $A_{\text{тир}}$ – активність ТИР, од/см³;
 $[\text{Фенол}]$ – початкова концентрація, ммоль/дм³;
 r – коефіцієнт лінійної кореляції.

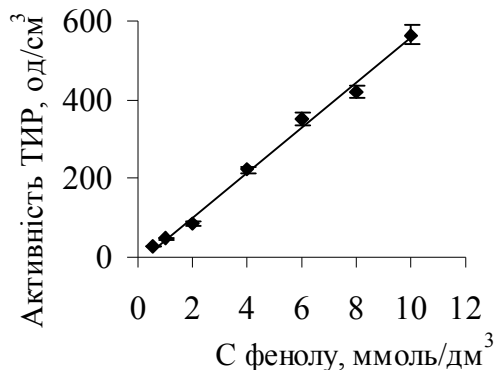


Рис. 1. Залежність активності ТИР від концентрації фенолу (τ біоконверсії 3 год, температура 25 °С, рН 6,5).

За допомогою виділеної ТИР в розроблених умовах (рН 6,5, температура 25 °С, активність ферменту 30-565 од/см³) здійснено окиснення фенолу в широкому діапазоні концентрацій (0,5-10 ммоль/дм³), при цьому рівень конверсії у всіх випадках становив більше 98 %.

Розчинні забарвлені продукти окиснення фенолу (0,5 ммоль/дм³) вперше видаляли за допомогою коагулянтів – алюмокалієвих, алюмоамонійних і залізоамонійних галунів (0,3-2,7 г/дм³), які широко застосовують для очищення стічних вод, але для цього процесу їх раніше не використовували. При збільшенні концентрації алюмокалієвих, алюмоамонійних і залізоамонійних галунів до 1,0; 1,3; 1,7 г/дм³ відповідно рівень елімінації продуктів окиснення зростає, а в подальшому з підвищенням їх концентрацій суттєво не змінювався (рис. 2).



Рис. 2. Залежність рівня видалення продуктів окиснення фенолу від концентрації коагулянта (С фенолу 0,5 ммоль/дм³, температура 25 °С, рН 6,5, τ 3 год).

Досліджені коагулянти осаджували продукти тирозиназного каталізу фенолів у широкому діапазоні їх початкових концентрацій (0,5-10 ммоль/дм³) зі ступенем елімінації у всіх випадках, більшим 97 %. Слід зауважити, що кращі результати отримали при використанні алюмоамонійних і алюмокалієвих галунів: для видалення продуктів окиснення 0,5-10 ммоль/дм³ фенолу необхідно 1,0-17,5 г/дм³ коагулянтів, тоді як концентрації залізоамонійних галунів становили 1,7-20,7 г/дм³ (рис. 3).

Виділений препарат ТИР іммобілізували в гель альгінату кальцію, внаслідок чого отримали біокаталізатор з 50 % збереженням початкової активності в технологічній формі (сферичні гранули діаметром 2 мм, не розчинні у воді й більшості органічних розчинників). Додавання стабілізатора – ПЕГ-6000 (1 % розчин) в процесі іммобілізації привело до

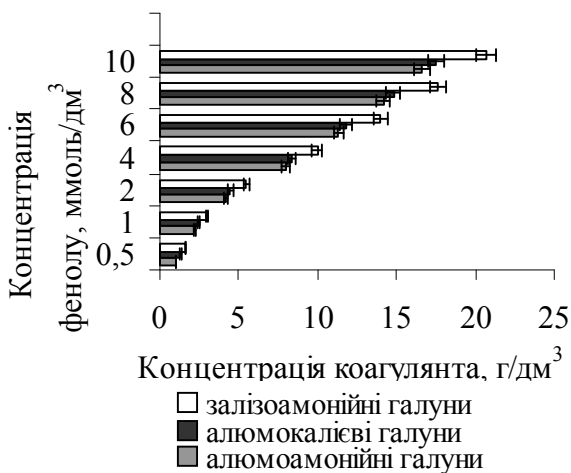


Рис. 3. Елімінація продуктів біоконверсії фенолу за допомогою коагулянтів (С фенолу 0,5-10 ммоль/дм³, температура 25 °С, τ 3 год).

збільшення активності іммобілізованого препарату на 25 %.

Взаємодія ТИР з носієм підтверджувалася зниженням характеристичної в'язкості й зростанням термостабільності іммобілізованої ТИР (k_{in} 1,87·10⁻² і 0,84⁻²·10⁻¹ хв вільного й іммобілізованого ферменту відповідно). Іммобілізація здійснювалася за рахунок іонних взаємодій заряджених груп ферменту з альгінатом і механічного включення в сітку зшитого Са²⁺ полімеру.

Отриманий препарат ТИР каталізував окиснення водного розчину фенолу (0,5 ммоль/дм³) в реакторі періодичної дії з кількісною трансформацією впродовж 12-ти послідовних циклів, зберігаючи високу активність протягом подальшого 16-кратного застосування (рис. 4).

Продукти біоконверсії фенолу після кожного циклу біокаталізу кількісно видаляли за допомогою досліджуваних коагулянтів із зменшеною в 2,5 раза концентрацією внаслідок часткового накопичення продуктів біоконверсії в гранулах каталізатора.

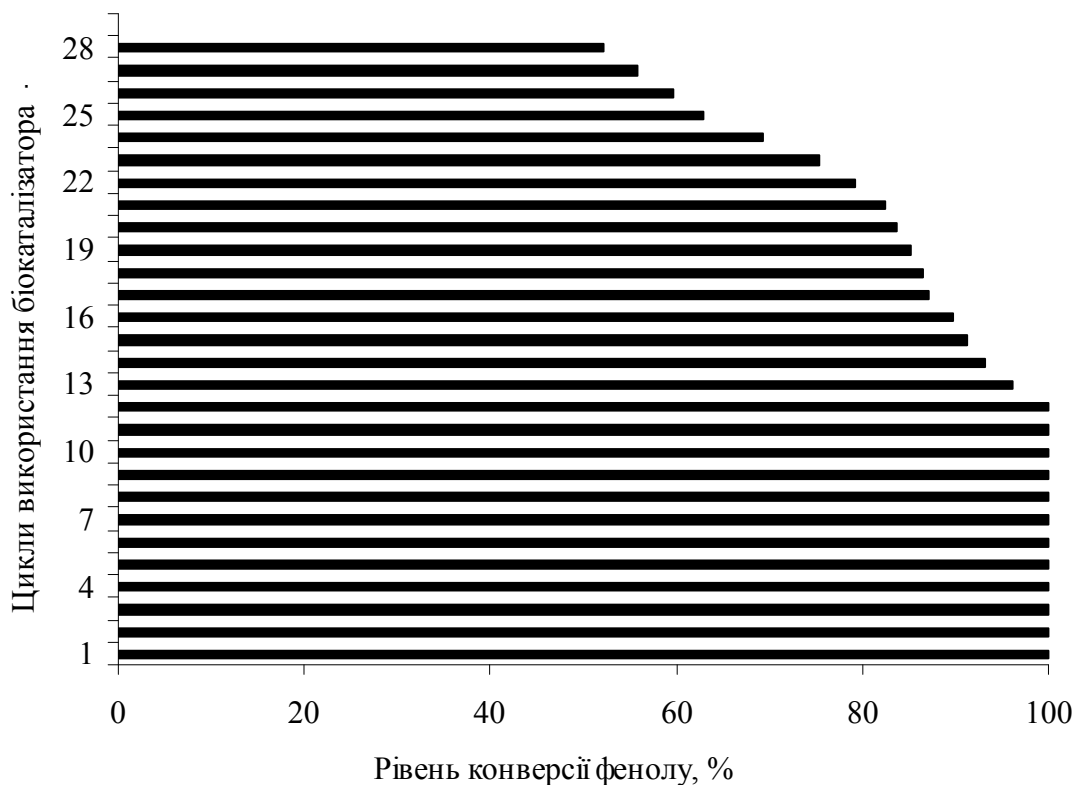


Рис. 4. Кратність використання біокаталізатора для конверсії фенолу (С фенолу 0,5 ммоль/дм³, температура 25 °С, τ 1 год, С ПЕГ-6000 1 %).

ВИСНОВОК. В результаті проведених досліджень розроблені методи елімінації фенолу (0,5-10 ммоль/дм³) з водних розчинів шляхом окиснювальної біоконверсії виділеними вільним та іммобілізованим препаратами ти-

розиноми *Agaricus bisporus* з наступним осадженням продуктів трансформації алюмокалійовими, алюмоамонійними або залізоамонійними галунами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. – М.: Химия, 1975. – 360 с.
2. Пат. 2 956929 США, МКИ 195-68 / Е.М. Cohen, L.L. Lerner. Tyrosinase concentrate and extractant and method for making same – Заявл. 24.04.1958. Оpubл.18.10.1960.
3. Ates S., Cortenlioglu E., Bayraktar E. Production of L-DOPA using Cu-alginate gel immobilized tyrosinase in a batch and packed bed reactor // Enzyme Microb. Technol. – **40**, № 4. – P. 683-687.
4. Bevilaqua J., Cammarota M., Freire D. et al. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments // Brazil. J. Chem. Eng. – 2002. – **19**, № 2. – P. 151-158.
5. Halaouli S., Asther M., Sigoillot J.-C. et al. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications // J. Appl. Microbiol. – 2006. – **100**, № 2. – P. 219-232.
6. Hartree E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. – 1972. – **48**, № 1. – P. 422-427.
7. Ikehata K., Nicell J. Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols // Biotechnol. Prog. – 2000. – **16**, № 4. – P. 533-540.
8. Ikehata K., Nicell J. Color and toxicity removal following tyrosinase-catalyzed oxidation of phenols // Biotechnol. Prog. – 2000. – **16**, № 4. – P. 533-540.
9. Mohy M.S., Hassan E.A., Elmassar M.R. β -galactosidase covalent immobilization on the surface of alginate beads and its application in lactose hydrolysis // Dtsch. Lebensm.-Rundsch. – 2005. – **101**, № 6. – P. 255-259.
10. Solomon E., Sundaram U., Machonkin T. Multicopper oxidases and oxygenases // Chem. Rev. – 1996. – **96**, № 7. – P. 2563-2605.
11. Sun W.-Q., Payne G.F., Moas M.S. Chitosan adsorption for removing phenols from wastewater // Biotechnol. Prog. – 1992. – **8**. – P. 179-186.

ЭЛИМИНАЦИЯ ФЕНОЛА ИЗ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СВОБОДНОЙ И ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ТИРОЗИНАЗЫ ГРИБОВ

О.В. Севастьянов

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ А.В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ, ОДЕССА

Резюме

Исследована элиминация фенола ($0,5-10,0$ ммоль/дм³) из водных растворов путем окисления с помощью выделенной модифицированным методом тирозиназы (выход белка $0,67$ мг/г грибов, содержание меди $0,19$ %, удельная активность 500 ед/мг белка·мин, фракционный состав изучен нативным и SDS-электрофорезом) и осаждения продуктов биоконверсии впервые использованными неорганическими коагулянтами – алюмокалиевыми, алюмоаммонийными и железоаммонийными квасцами ($0,3-2,7$ г/дм³). Имобилизованный в альгинат кальция препарат тирозиназы катализировал полное окисление фенола ($0,25-2,00$ ммоль/дм³) в реакторе периодического действия на протяжении 12 -ти циклов с высоким уровнем биоконверсии в последующие 16 . Показано, что концентрации коагулянтов для осаждения продуктов биоконверсии фенола иммобилизованным ферментом уменьшаются, по сравнению со свободным, в $2,5$ раза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: тирозиназа, *Agaricus bisporus*, иммобилизация, альгинат, фенол, элиминация.

PHENOL ELIMINATION FROM AQUEOUS SOLUTIONS, USING FREE AND IMMOBILIZED MUSHROOM TYROSINASE

O.V. Sevastianov

PHYSICO-CHEMICAL INSTITUTE BY O.V. BOHATSKY, OF NAS OF UKRAINE, ODESSA

Summary

Phenol elimination from aqueous solutions ($0,5-10,0$ mmol/dm³) by the oxidation with isolated by modified method tyrosinase (protein yield $0,67$ mg/g of mushrooms, copper content $0,19$ %, specific activity of 500 U/min·mg of protein, fractional composition was studied by the native and SDS-electrophoresis) and precipitation of bioconversion products with firstly used inorganic coagulant-potash-, ammonium- and iron alums ($0,3-2,7$ g/dm³) was studied. Tyrosinase preparation, immobilized in calcium alginate, had catalyzed the complete oxidation of phenol ($0,25-2,00$ mmol/dm³) in batch reactor during 12 cycles, and with high level of bioconversion during the next 16 cycles. It was shown, that concentrations of coagulants for the elimination of phenol bioconversion products by the immobilized enzyme are reduced $2,5$ -fold comparing with a free one.

KEY WORDS: tyrosinase, *Agaricus bisporus*, immobilization, alginate, phenol, elimination.

Отримано 17.02.2009 р.

Адреса для листування: О.В. Севастьянов, Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України, Люстдорфська дор., 86, Одеса, 65080, Україна.

ГЕМОКСИГЕНАЗНА АКТИВНІСТЬ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ В УМОВАХ ІНГІБУВАННЯ NO-СИНТАЗ

В.П. Филимоненко, І.В. Нікітченко, П.А. Каліман
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В.Н. КАРАЗІНА

Введення хлориду геміну в дозі 1,5 мг/100 г маси тіла спричиняє накопичення загального геміну в сироватці крові та судинах щурів, що супроводжується підвищенням гемоксигеназної активності у судинах. У серці та легенях вміст геміну та гемоксигеназна активність не змінюються. Попереднє введення N^o-нітро-L-аргініну викликає більш виражене підвищення гемоксигеназної активності, а введення лише інгібітора – накопичення геміну і зростання гемоксигеназної активності в судинах. Обговорюється роль геміну та оксиду азоту в регуляції гемоксигеназної активності.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гемоксигеназа, гем, оксид азоту, хлорид геміну, N^o-нітро-L-аргінин.

ВСТУП. Метаболізм геміну притаманний усім клітинам ссавців, оскільки молекула геміну бере участь у реалізації життєво важливих функцій [15]. Проте накопичення геміну в крові та тканинах шкідливе через прооксидантні властивості цієї сполуки і потребує протидії [16]. Одним з головних таких захисних механізмів у ссавців є індукція гемоксигенази – ключового ферменту деградації геміну [8]. Сімейство гемоксигеназ представлено трьома ізоформами – двома конститутивними (ГО-2 і ГО-3) та однією індукцибельною (ГО-1). Індукція саме ГО-1, що відбувається під впливом різних стресорних факторів, проявляє цитопротекторну дію. За багатьох патологій, які супроводжуються індукцією гемоксигенази, спостерігається і підвищення утворення оксиду азоту в NO-синтазних реакціях. Відомо, що NO має антиоксидантні властивості [5]. З іншого боку, надмірне утворення оксиду азоту може спричинити активацію вільнорадикальних процесів. Крім того, дослідження останніх років показали, що NO та його метаболіти здатні регулювати активність гемоксигенази [6, 7, 17, 18]. Але дані щодо впливу пригнічення синтезу оксиду азоту на систему гем–гемоксигеназа суперечливі.

У зв'язку з цим, метою даної роботи було дослідити вміст загального геміну і гемоксигеназну активність у судинах, серці та легенях щурів після сумісного введення хлориду геміну та інгібітора NO-синтаз (N^o-нітро-L-аргініну).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Роботу виконано на щурах-самцях лінії Вістар масою 180-250 г. Хлорид геміну та N^o-нітро-L-аргінин (L-NNA) вво-

дили внутрішньочеревно в дозах 1,5 і 3,5 мг на 100 г відповідно (інгібітор – за 0,5 год до основного впливу). Контрольній групі тварин вводили відповідний об'єм фізрозчину. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом через 2 та 24 год після введення геміну. Об'єктами дослідження були сироватка крові, гомогенат судин та постмітохондріальні фракції серця і легень.

Вміст загального геміну визначали піридин-гемохромним методом [9]. Гемоксигеназну активність визначали методом двопроменевої спектрофотометрії [12] та розраховували за кількістю утвореного білірубіну. Вміст білка визначали за методом Лоурі в модифікації Міллера.

Результати експериментів обробляли статистично, достовірність змін оцінювали за параметричним t-критерієм Стьюдента. Розходження вважали статистично значущими, якщо $p < 0,05$ [1].

У роботі використовували реактиви: NADPH та альбумін виробництва "AppliChem GmbH" (Німеччина), N^o-нітро-L-аргінин і піридин виробництва "Fluka" (Швейцарія), решта реактивів – вітчизняні марки ч.д.а. та х.ч.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Введення хлориду геміну спричиняє накопичення загального геміну в сироватці крові: за 2 год даний показник перевищує контрольний рівень у 3 рази, а за добу – в 1,5 (табл. 1). При цьому надходження геміну із сироватки спостерігається лише до судин у перші години після впливу. Встановлене збільшення вмісту геміну в судинах корелює з динамікою гемовмісних сполук у сироватці ($r=0,77$, $p=0,04$). У серці та легенях рівень загального геміну не змінюється в жоден з досліджених термінів.

Таблиця 1 – Вміст загального гемму в тканинах через 2 і 24 год після введення хлориду геміну, сумісного введення L-NNA і хлориду геміну та введення L-NNA (M±s, n=3-10)

| Тканина | Контроль | Гемін | | L-NNA+гемін | | L-NNA | |
|-----------|-----------|------------|----------|-------------|----------|------------|----------|
| | | 2 год | 24 год | 2 год | 24 год | 2 год | 24 год |
| Сироватка | 14±3 | 41±5* | 21±5*# | 35±8* | 21±5* | 15±7 | 13±4 |
| Судини | 0,38±0,09 | 0,76±0,25* | | 0,66±0,07* | | 0,58±0,09* | |
| | 0,3±0,1 | | 0,3±0,02 | | 0,4±0,13 | | 0,4±0,04 |
| Серце | 1,5±0,6 | 1,5±0,5 | 1,3±0,3 | 1,9±0,5 | 1,6±0,5 | 1,6±0,4 | 1,5±0,4 |
| Легені | 1,2±0,5 | 1,2±0,5 | 0,9±0,3 | 1,1±0,4 | 1,0±0,2 | 1,3±0,6 | 1,3±0,7 |

Примітка. Тут і в таблиці 2: * – p<0,05 відносно контролю; # – p<0,05 відносно “Гемін, 2 год”.

Молекула гемму гідрофобна й тому перебуває у зв'язаному з білками стані. Але якщо в нормі гем та гемопротейни зв'язуються специфічними білками плазми і транспортуються за рецепторопосередкованим механізмом в основному до печінки, то за патологічних умов, коли у крові накопичуються гемовмісні сполуки, гем неспецифічно зв'язується з поверхнями будь-яких клітин та надходить до них безпосередньо крізь мембрани [3]. Відсутність накопичення гемму в серці та легенях, імовірно, пов'язана з переважанням специфічних механізмів транспорту гемму в крові, внаслідок чого основний потік гемму з кров'яного русла направлений до печінки.

Вільний (неспецифічно зв'язаний) гем має прооксидантні властивості [16]. Тому поява гемму в клітинах є стрес-сигналом, що викликає цілий каскад захисних реакцій [3], в тому числі пригнічення синтезу цієї сполуки, індукцію гемозв'язуючих білків та індукцію ключового ферменту деградації гемму – ГО-1.

Останнє спостерігається і в нашому експерименті. Підвищення гемоксигеназної активності відбувається у судинах через 2 год та зберігається і за добу (табл. 2). У серці та легенях активність ферменту не відрізняється від контрольного рівня. З літератури відомо, що використання більшої дози геміну (2,5 мг/100 г маси тіла) викликає індукцію ГО-1 у серці за добу після впливу [4].

Як видно з отриманих нами результатів, підвищення ГО активності встановлено лише

в судинах, де спостерігається збільшення вмісту гемму, тобто, очевидно, опосередковано накопиченням гемму та зумовлено синтезом де novo індукцибельної форми ферменту. Відомо, що гем підсилює експресію гена ГО-1 з участю транскрипційних факторів Bach 1 (Bach Transcription Target 1), Nrf2 (nuclear related factor 2) та NF-κB (nuclear factor κB) [8, 11, 19].

Попереднє введення неспецифічного конкурентного інгібітора NO-синтаз, N^o-нітро-L-аргініну, не впливає на динаміку накопичення гемму в сироватці крові та судинах після ін'єкції хлориду геміну (див. табл. 1). Базальний рівень загального гемму в сироватці за введення L-NNA не змінюється в жоден з досліджених термінів. Разом із тим, у судинах сам N^o-нітро-L-аргінін викликає збільшення базального рівня гемму в перші години.

За сумісного введення N^o-нітро-L-аргініну та хлориду геміну в судинах спостерігається більш виражене підвищення гемоксигеназної активності (див. табл. 2), що, очевидно, пов'язано з різними шляхами, за якими реалізують свої ефекти ці агенти. При цьому введення самого інгібітора підвищує активність ферменту через 2 год та не впливає на даний показник за добу.

Вміст загального гемму та гемоксигеназна активність у серці й легенях не змінюються ні після сумісного введення L-NNA та хлориду геміну, ні після введення лише N^o-нітро-L-аргініну в жоден з досліджених термінів (див. табл. 1, 2).

Таблиця 2 – Гемоксигеназна активність у тканинах через 2 і 24 год після введення хлориду геміну, сумісного введення L-NNA і хлориду геміну та введення L-NNA (M±s або Me (квартилі) для ГО в судинах, n=3-5)

| Тканина | Контроль | Гемін | | L-NNA+гемін | | L-NNA | |
|---------|---------------|----------------|----------------|-----------------|---------------|----------------|---------------|
| | | 2 год | 24 год | 2 год | 24 год | 2 год | 24 год |
| Судини | 21 (19÷23) | 32 (29÷42)* | 26 (25÷34)* | 53 (45÷59)*# | 26 (22÷26) | 39 (32÷44)* | 20 (18÷21) |
| Серце | 26±4 | 24±2 | 27±3 | 24±4 | 26±4 | 22±3 | 24±5 |
| Легені | 28±3 | 30±5 | 27±4 | 26±2 | 28±6 | 30±6 | 25±3 |

Підвищення ГО активності у судинах після введення L-NNA може бути пов'язане зі збільшенням активності як ГО-2, так і ГО-1. Відомо, що нітрозилування гему оксидом азоту в гем-регуляторних сайтах молекули ГО-2 інгібує активність ізоферменту [6]. Автори роботи [18] встановили, що підвищення ГО активності у судинній стінці за сильної гіпоксії, коли заінгібовані NO-синтази, зумовлене активацією саме ГО-2. Але у нашому експерименті за введення інгібітора спостерігається накопичення гему в судинах, тому зростання активності ферменту може бути й наслідком індукції ГО-1. У роботі [13] показано збільшення ГО активності в умовах зниження утворення NO при атеросклерозі судин за рахунок індукції ГО-1.

N^o-нітро-L-аргінін відносять до неселективних інгібіторів, але в ряді робіт виявлена значно більша ефективність L-NNA щодо інгібування конститутивних ізоформ NO-синтаз, ніж індукційної [2]. Пригнічення ендотеліальної

NO-синтази судинної стінки може викликати звуження судин через нестачу основного вазодилатора – оксиду азоту. Відомо, що монооксид вуглецю також може функціонувати як судинорозслаблюючий фактор [14], а головним джерелом CO у клітинах ссавців є гемоксигеназна реакція [10]. У зв'язку з цим, підвищення ГО активності за умов зниження утворення NO може бути компенсаторним механізмом для підтримання нормального тону судин.

ВИСНОВКИ. Введення хлориду геміну в дозі 1,5 мг/100 г маси тіла призводить до накопичення загального гему в сироватці крові, його надходження лише до судин та підвищення в них гемоксигеназної активності. Попереднє введення N^o-нітро-L-аргініну викликає більш виражене зростання ГО активності. Сам інгібітор також збільшує цей показник в судинній стінці, ймовірно, за рахунок індукції ГО-1 вільним гемом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
2. Граник В.Г., Григорьев Н.Б. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств. – М.: Вузовская книга, 2004. – 360 с.
3. Калиман П.А., Баранник Т.В. Метаболизм гема и оксидативный стресс // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 1. – С. 5-15.
4. Кукоба Т.В., Мойбенко О.О., Коцюруба А.В. Кардіопротективна дія індукції гемоксигенази-1 за допомогою геміну при ішемії-реперфузії ізольованого серця щура // Фізіол. журн. – 2003. – **49**, № 6. – С. 14-21.
5. Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма "Слово", 2006. – 556 с.
6. Ding Y., McCoubrey W.K., Maines M.D. Interaction of heme oxygenase-2 with nitric oxide donors. Is the oxygenase an intracellular "sink" for NO? // Eur. J. Biochem. – 1999. – **264**, № 3. – P. 854-861.
7. Foresti R., Hoque M., Bains S. et al. Haem and nitric oxide: synergism in the modulation of the endothelial haem oxygenase-1 pathway // Biochem. J. – 2003. – **372**, № 2. – P. 381-390.
8. Maines M.D. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 1997. – **37**, № 1. – P. 517-554.
9. Paul K.G., Theorell H., Akeson A. The molar light absorption of pyridine ferroprotoporphyrin (pyridine haemochromogen) // Acta Chem. Scand. – 1953. – **7**, № 9. – P. 1284-1287.
10. Rodgers P.A., Vreman H.J., Dennery P.A., Stevenson D.K. Sources of carbon monoxide (CO) in biological systems and applications of CO detection technologies // Semin. Perinatol. – 1994. – **18**, № 1. – P. 2-10.
11. Ryter W.S., Alam J., Choi A.M.K. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications // Physiol. Rev. – 2006. – **86**, № 2. – P. 583-650.
12. Sardana M.K., Sassa S., Kappas A. Hormonal regulation of heme oxygenase induction in avian hepatocyte culture // Biochem. Pharmacol. – 1985. – **34**, № 16. – P. 2937-2944.
13. Siow R.C., Sato H., Mann G.E. Heme oxygenase-1-carbon monoxide signaling pathway in atherosclerosis: anti-atherogenic action of bilirubin and carbon monoxide? // Cardiovasc. Res. – 1999. – **41**, № 2. – P. 385-394.
14. Stec D.E., Drummond H.A., Vera T. Role of carbon monoxide in blood pressure regulation // Hypertension. – 2008. – **51**. – P. 597-604.
15. Tsiftoglou A.S., Tsamadou A.I., Papadopoulou L.C. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: molecular, cellular and pharmacological aspects // Pharmacol. Ther. – 2006. – **111**, № 2. – P. 327-345.
16. Wagener F.A.D.T.G., Volk H.D., Willis D. et al. Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation // Pharmacol. Rev. – 2003. – **55**, № 3. – P. 551-571.
17. Wang J., Lu S., Moenne-Loccoz P., de Montellano P.R.O. Interaction of nitric oxide with human heme oxygenase-1 // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**, № 4. – P. 2341-2347.
18. Wu L., Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions and pharmacological applications // Pharmacol. Rev. – 2005. – **57**, № 4. – P. 585-630.
19. Zenke-Kawasaki Y., Dohi Y., Katoh Y. et al. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1 // Mol. Cell. Biol. – 2007. – **27**, № 19. – P. 6962-6971.

ГЕМОКСИГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ NO-СИНТАЗ

В.П. Филимоненко, И.В. Никитченко, П.А. Калиман
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.Н. КАРАЗИНА

Резюме

Введение хлорида гемина в дозе 1,5 мг/100 г массы тела служит причиной накопления общего гема в крови и сосудах крыс, которое сопровождается повышением гемоксигеназной активности в сосудах. В сердце и легких уровень гема и гемоксигеназная активность не изменяются. Предварительное введение N^o-нитро-L-аргинина вызывает более выраженное повышение гемоксигеназной активности, а введение только ингибитора – накопление гема и возрастание гемоксигеназной активности в сосудах. Обсуждается роль гема и оксида азота в регуляции гемоксигеназной активности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гемоксигеназа, гем, оксид азота, хлорид гемина, N^o-нитро-L-аргинин.

HEME OXYGENASE ACTIVITY IN RAT TISSUES UNDER NO-SYNTHASES INHIBITION

V.P. Fylymonenko, I.V. Nikitchenko, P.A. Kaliman
KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY BY V.N. KARAZIN

Summary

The hemin chloride administration in dose 1,5 mg/100 g of body weight was found to cause the accumulation of the total heme in rat blood serum and vessels. It was accompanied by increase of heme oxygenase activity in vessels. The changes of the total heme level and heme oxygenase activity in heart and lung were not observed. The elevation of heme oxygenase activity in vessels was strengthened by preliminary administration of N^o-nitro-L-arginine. The N^o-nitro-L-arginine alone caused the accumulation of the total heme and the increase of heme oxygenase activity in vessels. The role of heme and NO in regulation of the heme oxygenase activity is discussed.

KEY WORDS: heme oxygenase, heme, nitric oxide, hemin chloride, N^o-nitro-L-arginine.

Отримано 30.01.2009 р.

Адреса для листування: В.П. Филимоненко, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61077, Україна.

СИНТЕЗ ТА АНТИМІКОБАКТЕРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ 4'-ГІДРОКСИ-3'-ЕТОКСИБЕНЗИЛІДЕНГІДРАЗИДІВ 1-R-4-ГІДРОКСИ-2- ОКСО-1,2-ДИГІДРОХІНОЛІН-3-КАРБОНОВИХ КИСЛОТ

Л.В. Сидоренко, І.В. Українець, О.С. Головченко, Т.В. Алексєєва
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

З метою визначення структурно-біологічних закономірностей здійснено синтез серії 4'-гідрокси-3'-етоксибензиліденгідразидів 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонних кислот. Проведено порівняльний аналіз антимікобактеріальних властивостей одержаних речовин з їх ваніліновими аналогами.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: бензиліденгідразида, 4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонні кислоти, протитуберкульозна активність.

ВСТУП. Всесвітня організація охорони здоров'я ще у 1995 р. дійшла висновку про початок епідемії туберкульозу в Україні. Епідеміологічні показники в нашій країні у 10-12 разів перевищують аналогічні характеристики розвинувтих країн. Сьогодні, за даними МОЗ України, 1,4 % населення охоплено цією хворобою, причому за останні 15 років показник захворюваності зріс у 2,6 раза, а смертності – у 2,9 раза. Наведена статистика красномовно вказує на те, що туберкульоз в Україні став проблемою загальнонаціонального масштабу [2, 11]. Незважаючи на практичну реалізацію державної програми протидії туберкульозу, розрахованої на період 2007-2011 рр. (Закон України від 08.02.2007 р. № 648-V), епідемічна ситуація все ще залишається загрозливою. Причиною такого становища є послаблення вироблених багаторічним досвідом профілактичних заходів протидії звичайному туберкульозу, але більшою мірою – значне поширення хіміо-, мультирезистентних та атипичних форм хвороби, які розповсюджуються дуже швидко і при цьому важко піддаються лікуванню традиційними антимікобактеріальними препаратами [12]. Чимало складних проблем додає також і туберкульоз, асоційований з ВІЛ-інфекцією [13]. У зв'язку з цим, розробка та впровадження в практику нових ефективних лікарських засобів для хіміотерапії туберкульозу мають першочергове значення для сучасної фармації та фтизіатрії.

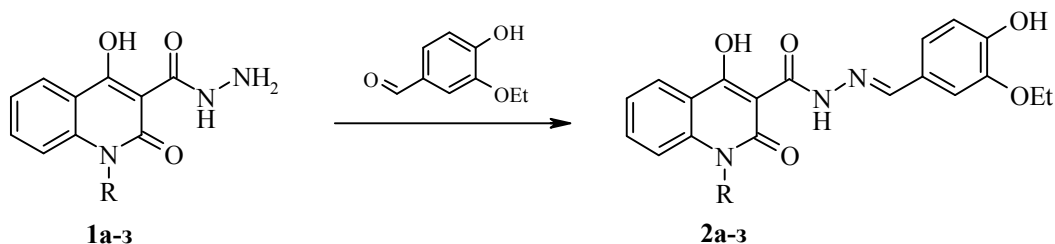
Важлива роль у вирішенні означеної проблеми належить похідним гідразину [4]. Можливості хімічної трансформації цієї сполуки

© Л.В. Сидоренко, І.В. Українець, О.С. Головченко, Т.В. Алексєєва, 2010.

практично не обмежені, що робить її досить зручною матрицею для синтезу найрізноманітніших продуктів. Типовим прикладом нуклеофільних властивостей гідразину є його взаємодія з різноманітними карбонільними сполуками, в результаті чого утворюються такі похідні, як гідразиди, дигідразиди, гідразони, азини та ін. [3]. Саме на таких хімічних реакціях і базується систематичний пошук потенційних протитуберкульозних засобів, що проводиться нами в ряді амідованих похідних 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонних кислот, серед яких особливо високу активність неодноразово відмічали у гідразидів та продуктів їх конденсації з ароматичними альдегідами [5, 6, 8-10, 17]. На окрему увагу заслуговують синтезовані за прикладом фтивазиду похідні ваніліну, тобто 4'-гідрокси-3'-метоксибензиліденгідразида відповідних хінолін-3-карбонних кислот, які продемонстрували значний антимікобактеріальний ефект і, що досить важливо, низьку цитотоксичність [5]. Що стосується виявлення нових структурно-біологічних закономірностей, то цікавою є заміна ваніліну його синтетичним гомологом – 4-гідрокси-3-етоксибензальдегідом. Як відомо, цей ароматичний альдегід має запах, дуже близький до ваніліну, але у 3-4 рази більш інтенсивний, завдяки чому його широко використовують як ароматизатор і дешевий заміник ваніліну в кондитерській, хлібопекарській, лікєро-горілчаній та парфумерно-косметичній промисловості під назвами етилванілін, ванілаль або харчовий ванілін [1]. Прослідкувати, як вплине на біологічні властивості означена структурна модифікація, і покликане наше дослідження.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В синтезі цільових 4'-гідрокси-3'-етоксибензиліденгідрозидів 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонових кислот (2а-з) використана типова

синтетична схема, яка передбачає взаємодію гідрозидів відповідних хінолін-3-карбонових кислот (1а-и) з етилваніліном у середовищі киплячого етанолу (схема 1).



1-2: а R = H; б R = CH₃; в R = C₂H₅; г R = CH₂CH=CH₂; д R = C₃H₇; е R = C₄H₉; ж R = C₅H₁₁; з R = C₆H₁₃

Схема 1.

Всі синтезовані таким чином 4'-гідрокси-3'-етоксибензиліденгідрозиди 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонових кислот (2а-з) являють собою практично не розчинні у воді жовті кристалічні речовини з чіткими температурами плавлення (табл. 1). Їх хімічна будова підтверджена спектрами ЯМР ¹H (табл. 2). Цікаво, що притаманна структурам з відносно жорстким вуглець-азот подвійним зв'язком геометрична ізомерія, яка призводить до утворення ізомерних сумішей і зазвичай легко реєструється за допомогою спектроскопії ЯМР, в даному випадку взагалі не спостерігається.

Іншими словами, ніякого характерного для таких речовин подвоєння сигналів [7] в експериментальних спектрах ЯМР бензиліденгідрозидів 2а-з не виявлено. Можливо, причиною цього явища є висока швидкість *син*→*анти*-інверсії, внаслідок чого протонний обмін між геометричними ізомерами відбувається надто швидко. Однак не можна виключати й того, що, подібно до кристалічного стану [10], досліджувані сполуки за рахунок міцних внутрішньомолекулярних водневих зв'язків і в розчині здатні існувати у вигляді лише одного просторового ізомеру.

Таблиця 1 – Характеристики 4'-гідрокси-3'-етоксибензиліденгідрозидів 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонових кислот (2а-з)

| Сполука | Емпірична формула | Т. пл., °С | Знайдено, % | | | Вирахувано, % | | | Вихід, % |
|---------|---|------------|-------------|------|-------|---------------|------|-------|----------|
| | | | С | Н | N | С | Н | N | |
| 2а | C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₅ | 337-339 | 62,24 | 4,77 | 11,30 | 62,12 | 4,66 | 11,44 | 98 |
| 2б | C ₂₀ H ₁₉ N ₃ O ₅ | 205-207 | 63,13 | 5,16 | 11,08 | 62,99 | 5,02 | 11,02 | 95 |
| 2в | C ₂₁ H ₂₁ N ₃ O ₅ | 186-188 | 63,65 | 5,45 | 10,51 | 63,79 | 5,35 | 10,63 | 93 |
| 2г | C ₂₂ H ₂₁ N ₃ O ₅ | 152-154 | 64,73 | 5,08 | 10,20 | 64,86 | 5,20 | 10,31 | 96 |
| 2д | C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₅ | 161-163 | 64,64 | 5,73 | 10,17 | 64,54 | 5,66 | 10,26 | 92 |
| 2е | C ₂₃ H ₂₅ N ₃ O ₅ | 154-156 | 65,36 | 6,08 | 10,01 | 65,24 | 5,95 | 9,92 | 90 |
| 2ж | C ₂₄ H ₂₇ N ₃ O ₅ | 168-170 | 66,00 | 6,34 | 9,47 | 65,89 | 6,22 | 9,60 | 91 |
| 2з | C ₂₅ H ₂₉ N ₃ O ₅ | 140-142 | 66,42 | 6,38 | 9,22 | 66,50 | 6,47 | 9,31 | 94 |

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА. Спектри ЯМР ¹H синтезованих речовин зареєстровано на спектрометрі Bruker AC-300, робоча частота складала 300 МГц, розчинник ДМСО-D₆, внутрішній стандарт – ТМС. Вихідні гідрозиди 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонових кислот (1а-з) одержано відомим способом [16].

4'-Гідрокси-3'-етоксибензиліденгідрозиди 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонових кислот (2а-з). Загальна методика одержання. До розчину 0,01 моль гідрозиду

відповідної 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти (1) в 50 мл етилового спирту додають 1,83 г (0,011 моль) етилваніліну і кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Реакційну суміш охолоджують, осад 4'-гідрокси-3'-етоксизаміщеного бензиліденгідрозиду 2а-з відфільтровують, промивають етанолом, сушать. Кристалізують з ДМФА або його суміші з етанолом.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Здатність синтезованих бензиліденгідрозидів 2а-з впли-

Таблиця 2 – Спектри ЯМР ¹H синтезованих сполук, δ, м.д.*

| Сполука | NHN (1H, с) | 4'-ОН (1H, с) | СН=N (1H, с) | H аром. бензиліденового залишку | | | 3'-OEt | | R |
|---------|-------------|---------------|--------------|---------------------------------|--------------|--------------|--------------------------|-------------------------|--|
| | | | | 2'-H (1H, с) | 6'-H (1H, д) | 5'-H (1H, д) | OCH ₂ (2H, κ) | CH ₃ (3H, τ) | |
| 2а | 13,21 | 9,28 | 8,26 | 7,34 | 7,19 | 6,85 | 4,11 | 1,40 | 11,94 (1H, с, NH) |
| 2б | 13,18 | 9,26 | 8,33 | 7,35 | 7,20 | 6,88 | 4,13 | 1,41 | 3,69 (3H, с, Me) |
| 2в | 13,17 | 9,20 | 8,32 | 7,34 | 7,18 | 6,84 | 4,13 | 1,41 | 4,21(2H, κ, NCH ₂); 1,33 (3H, τ, Me) |
| 2г | 13,24 | 9,24 | 8,30 | 7,37 | 7,18 | 6,89 | 4,12 | 1,43 | 5,99 (1H, м, CH=); 5,24 (2H, м, =CH ₂); 4,91 (2H, д, NCH ₂) |
| 2д | 13,20 | 9,22 | 8,31 | 7,36 | 7,19 | 6,85 | 4,11 | 1,42 | 4,30 (2H, τ, NCH ₂); 1,77 (2H, м, NCH ₂ CH ₂); 1,03 (3H, τ, Me) |
| 2е | 13,23 | 9,24 | 8,30 | 7,36 | 7,20 | 6,89 | 4,11 | 1,44 | 4,32 (2H, τ, NCH ₂); 1,73 (2H, кв, NCH ₂ CH ₂); 1,37 (2H, м, CH ₂ Me); 1,00 (3H, τ, Me) |
| 2ж | 13,20 | 9,21 | 8,31 | 7,38 | 7,20 | 6,88 | 4,13 | Див. R | 4,30 (2H, τ, NCH ₂); 1,71 (2H, кв, NCH ₂ CH ₂); 1,46 (7H, м, 3'-OCH ₂ Me + (CH ₂) ₃ Me); 0,94 (3H, τ, Me) |
| 2з | 13,22 | 9,29 | 8,33 | 7,35 | 7,21 | 6,86 | 4,12 | 1,47 | 4,32 (2H, τ, NCH ₂); 1,70 (2H, кв, NCH ₂ CH ₂); 1,36 (6H, м, (CH ₂) ₃ Me); 0,92 (3H, τ, Me) |

Примітка. * Протони 4-ОН-груп проявляються синглетами інтенсивністю 1H у слабкому полі при 14,13-13,76 м.д. Сигнали ароматичних протонів хінолонового фрагмента мають вигляд: 5-H – дублет при 8,19-8,03 м.д.; 7-H – триплет при 7,80-7,71 м.д.; 8-H – дублет при 7,61-7,49 м.д.; 6-H – триплет при 7,42-7,30 м.д.

вати на життєдіяльність туберкульозної палички вивчена Національним інститутом алергії та інфекційних захворювань США радіометрично [14, 15] на штамх *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294. Одержані при цьому дані мікробіологічних досліджень свідчать про те, що додаткова СН₂-ланка в алкоксильному угрупованні бензиліденової частини молекули призводить до значного спаду протитуберкульозних властивостей. Відносно високу активність – пригнічення росту тест-культури на 97-99 % – показали лише дві сполуки: амільна (2ж) та гексильна (2з) похідні, причому в дозі 12,5 мкг/мл (тобто вдвічі вищій, ніж вивчених раніше похідних ваніліну [5]). Дійсна мінімальна інгібуюча концентрація цих сполук суттєво зросла і становила 6,25 та 3,13 мкг/мл відповідно (проти 0,39 мкг/мл у ванілінових аналогів). Малоактивними були вони і відносно збудників нетуберкульозних мікобактеріозів – комплексу *Mycobacterium avium*.

Таким чином, проведене дослідження дозволяє однозначно стверджувати, що заміна природного ваніліну в синтезі бензиліденгідрозидів 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрокси-

нолін-3-карбонових кислот його синтетичним гомологом супроводжується значною втратою антимікобактеріальної активності й тому є недоцільною.

ВИСНОВКИ. 1. З метою виявлення закономірностей взаємозв'язку "хімічна структура – біологічна дія" здійснено синтез серії 4'-гідрокси-3'-етоксибензиліденгідрозидів 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідроксинолін-3-карбонових кислот та проведено порівняльний аналіз їх антимікобактеріальних властивостей з ваніліновими аналогами.

2. За даними мікробіологічного скринінгу встановлено, що введення всього лише однієї додаткової метиленової ланки в алкоксильний замісник бензиліденового фрагмента досліджуваних сполук призводить до суттєвого спаду протитуберкульозної активності.

Автори щиро вдячні Національному інституту алергії та інфекційних захворювань США за проведене в межах Міжнародної програми TAACF (Tuberculosis Antimicrobial Acquisition & Coordinating Facility) вивчення протитуберкульозних властивостей синтезованих нами речовин (контракт № 01-AI-45246).

ЛІТЕРАТУРА

1. Войткевич С.А. 865 Душистых веществ для парфюмерии и бытовой химии. – М.: Пищевая промышленность, 1994. – С. 412.
2. Гордиенко С.М. Туберкулез. Оценка ситуации // Здоров'я України. – 2004. – № 22. – С. 16-17.
3. Зеленин К.Н. Гидразин // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 5. – С. 59-65 // <http://www.pereplet.ru/obrazovanie/stsoros/548>.
4. Машковский М.Д. Лекарственные средства: Пособие для врачей. – 13-е изд. – Харьков: Торсинг, 1997. – 2. – С. 331-346.
5. Сидоренко Л.В., Головченко О.С., Українець І.В., Алексеєва Т.В. Синтез та протитуберкульозна активність 4'-гідрокси-3'-метоксибензиліденгідрозидів 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоновых кислот // Вісник фармації. – 2008. – № 2 (54). – С. 3-6.
6. Ткач А.О., Головченко О.С., Українець І.В., Петрушова Л.О. 3-Фтор-бензиліденгідрозиди галогензаміщених 4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоновых кислот та їх протитуберкульозні властивості // Журнал орган. та фармац. хімії. – 2007. – 5, вип. 4 (20). – С. 36-40.
7. Туров О.В., Воловченко Т.А., Туров О.О., Воловченко Ю.М. Вивчення ізомерії ацилгідрозонів з гетероциклічними фрагментами // Журнал орган. та фармац. хімії. – 2006. – 4, вип. 2 (14). – С. 30-36.
8. Українець І.В., Джарадат Нідаль Амін, Безуглий П.О. та ін. Бензиліденгідрозиди 1-R-4-гідрокси-2-оксохінолін-3-карбоновых кислот – нова група потенційних протитуберкульозних засобів // Вісник фармації. – 2000. – № 1 (21). – С. 13-15.
9. Українець І.В., Прокопенко О.С., Сидоренко Л.В., Горохова О.В. Синтез та антимікобактеріальні властивості фторзаміщених бензиліденгідрозидів 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбоновых кислот // Вісник фармації. – 2004. – № 3 (39). – С. 3-8.
10. Українець І.В., Сидоренко Л.В., Прокопенко О.С. и др. Синтез, строение и противотуберкулезная активность 3-хлор-(бром)-бензиліденгідрозидов 1-R-2-оксо-4-гідроксихінолін-3-карбоновых кислот // Журнал орган. та фармац. хімії. – 2004. – 2, вип. 4 (8). – С. 17-24.
11. Фещенко Ю.І., Мельник В.М., Матусевич В.Г., Антонечко Л.Ф. Епідеміологія туберкульозу у світі, сучасні підходи до організації протитуберкульозних заходів // Укр. пульмонол. журн. – 2003. – № 4. – С. 5-10.
12. Atun R., Olynik I. Resistance to implementing policy change: the case of Ukraine // Bull. World Health Organ. – 2008. – 86, № 2. – P. 147-154.
13. Dubrovina I., Miskinis K., Lyepshina S. et al. Drug-resistant tuberculosis and HIV in Ukraine: a threatening convergence of two epidemics? // Int. J. Tuberc. Lung Dis. – 2008. – 12, № 7. – P. 756-762.
14. Heifets L.B. Drug susceptibility tests in the management of chemotherapy of tuberculosis // In: Drug Susceptibility in the Chemotherapy of Mycobacterial Infections / Ed. Heifets L.B. – Boca Raton: CRC Press, 1991. – P. 89-122.
15. Siddiqui S.H. Radiometric (BACTEC) tests for slowly growing mycobacteria // In: Clinical Microbiology Procedures Handbook / Ed. Isenberg H.D. – Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1992. – 1. – P. 5.14.2-5.14.25.
16. Ukrainets I.V., Bezuglyi P.A., Treskach V.I. et al. 4-Hydroxy-2-quinolones. 5. Synthesis, physico-chemical and biological properties of new pyrazole derivatives // Chem. Heterocycl. Comp. – 1992. – 28, № 8. – P. 912-916.
17. Ukrainets I.V., Sidorenko L.V., Golovchenko O.S. 4-Hydroxy-2-quinolones. 132. Synthesis, chemical and biological properties of 1-R-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acids 2-nitrobenzylidenehydrazides // Chem. Heterocycl. Comp. – 2007. – 43, № 11. – P. 1434-1439.

СИНТЕЗ И АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА 4'-ГИДРОКСИ-3'-ЭТОКСИБЕНЗИЛИДЕНГИДРАЗИДОВ 1-R-4-ГИДРОКСИ-2- ОКСО-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИН-3-КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Л.В. Сидоренко, И.В. Українець, О.С. Головченко, Т.В. Алексеєва
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

С целью определения структурно-биологических закономерностей осуществлен синтез серии 4'-гидрокси-3'-этоксисбензиліденгідрозидов 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоновых кислот. Проведен сравнительный анализ антимікобактеріальних свойств полученных веществ и их ванилиновых аналогов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бензиліденгідрозиды, 4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоновые кислоты, противотуберкулезная активность.

**THE SYNTHESIS AND ANTIMYCOBACTERIAL PROPERTIES OF
1-R-4-HYDROXY-2-OXO-1,2-DIHYDROQUINOLINE-3-CARBOXYLIC ACID
4'-HYDROXY-3'-ETHOXYBENZYLIDENEHYDRAZIDES**

L.V. Sidorenko, I.V. Ukrainets, O.S. Golovchenko, T.V. Alexeeva
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

The synthesis of 1-R-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acid 4'-hydroxy-3'-ethoxybenzylidenehydrazides has been carried out with the purpose of determining structural and biological regularities. The comparative analysis of antimycobacterial properties of the substances obtained and their vanillin analogues has been performed.

KEY WORDS: benzylidenehydrazides, 4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acids, antitubercular activity.

Отримано 26.01.2009 р.

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

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ВПЛИВ ПРОСТИХ ПОЛІЕФІРІВ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МІТОХОНДРІЙ ГЕПАТОЦИТІВ ЩУРІВ

О.А. Наконечна

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Вивчено вплив простих поліефірів на функціональний стан мітохондрій щурів. Виявлено порушення окиснювального фосфорилування та тканинного дихання, зниження продукції АТФ за умов дії 1/100 ДЛ₅₀. Досліджувана група ксенобіотиків призводить до роз'єднання тканинного дихання та окиснювального фосфорилування.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: прості поліефіри, мітохондрії, тканинне дихання, окиснювальне фосфорилування.

ВСТУП. Група простих поліефірів (ППЕ) належить до поширених забруднювачів навколишнього середовища, що пов'язано з їх широким використанням у багатьох галузях народного господарства як стартових сполук для одержання пластмас, поліуретанів, лаків, емалей тощо. Деякі ксенобіотики з цієї групи застосовують у практичній і експериментальній медицині як протектори, пролонгатори лікарських препаратів та для консервування тканин, біологічних об'єктів [7, 8].

У попередніх роботах доведено активацію мікосомальної окиснювальної системи гепатоцитів, посилення в них вільнорадикальних процесів та перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), а також суттєві зміни у співвідношенні фосфоліпідних фракцій біологічних мембран за умов дії ППЕ. За даними літератури, особливо чутливі до ПОЛ мембрани мітохондрій клітин печінки [4].

У фізіологічних умовах в процесі роботи дихального ланцюга у мітохондріях гепатоцитів при окиснювальному фосфорилуванні виділяється значна кількість активних форм кисню (АФК) – супероксид-аніон-радикал, гідроксил-радикал та інші. Відомо, що дія деяких ксенобіотиків на організм може супроводжуватися роз'єднанням процесів окиснення і фосфорилування, в результаті чого зростає утворення АФК [4, 5].

Метою даної роботи було вивчення стану окиснювального фосфорилування в мітохондріях гепатоцитів щурів за умов тривалої дії простих поліефірів у дозі 1/100 ДЛ₅₀.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження виконано на 90 статевозрілих щурах-самцях по-

© О.А. Наконечна, 2010.

пуляції 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 пропіленгліколі (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 дози речовини для введення проводили з огляду на дані про параметри їх токсичності. В попередніх дослідженнях було встановлено, що найбільш оптимальною дозою для вивчення стану показників біохімічних процесів в організмі експериментальних тварин є доза 1/100 ДЛ₅₀, 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 функціонального стану мітохондрій гепатоцитів проводили через 30 днів після початку експерименту. Щурів декапітували гільйотинним ножом, попередньо анестезуючи тіопенталом натрію у дозі 50 мг/кг маси тварин. У дослідних і контрольних групах налічувалось по 10 тварин. Печінку відмивали від еритроцитів шляхом її перфузії холодним середовищем виділення (100 мл 0,25 М сахарози і 0,01 М етилендіамінтетраацетату) та гомогенізували. Мітохондрії виділяли шляхом диференційного центрифугування [5].

Оцінку метаболічного стану мітохондрій гепатоцитів за умов дії ППЕ проводили полярографічним методом з використанням платинового електрода Кларка [3]. В реакційне

середовище, яке містило 200 мМ маннітолу, 50 мМ сахарози, 10 мМ K_2PO_4 , 30 мМ трис- HCL буфера (рН 7,4), вносили сукцинат як субстрат окиснення (8 мМ) та АТФ (250 мкМ). Визначали основні параметри окиснювального фосфорилування за Чансом: V_2 – швидкість поглинання кисню після додавання субстрату, V_3 – швидкість поглинання кисню в присутності акцептора – АДФ, V_4 – швидкість поглинання кисню в безакцепторному середовищі [8], а також у присутності роз'єднувача 2,4-динітрофенолу (ДНФ 50 мкМ) – V_{4p} . Розраховували коефіцієнт фосфорилування, тобто співвідношення АДФ/О, який характеризує спряження процесів окиснення та фосфорилування в дихальному ланцюзі, дихальний коефіцієнт Ларді (ДК) – співвідношення швидкості поглинання кисню в стані V_3 до швидкості поглинання кисню в стані V_4 . Отримані результати досліджень підлягали обробці параметричним засобом варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента.

Таблиця 1 – Вплив простих полієфірів на окиснювальне фосфорилування в мітохондріях гепатоцитів щурів ($M \pm m$; $n=10$)

| Речовини | Основні показники | | | | |
|-----------|-------------------|------------|------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| | V_3 | V_4 | V_{4p} | Дихальний коефіцієнт (V_3/V_4) | Коефіцієнт фосфорилування (АДФ/О) |
| Контроль | 5,97±0,49 | 1,75±0,07 | 7,12±0,56 | 3,42±0,25 | 2,56±0,15 |
| ПГ-192 | 3,99±0,42* | 1,38±0,15* | 4,35±0,43* | 2,89±0,21* | 1,33±0,12* |
| ПГ-540 | 3,86±0,32* | 1,32±0,06* | 3,98±0,40* | 2,92±0,15* | 1,22±0,08* |
| ПГ-1120 | 4,18±0,32* | 1,44±0,16* | 4,54±0,46* | 2,90±0,14* | 1,35±0,15* |
| ПГ-2106 | 3,92±0,41* | 1,35±0,07* | 4,02±0,41* | 2,78±0,17* | 1,27±0,14* |
| ГлПГ-1136 | 3,54±0,43* | 1,25±0,15* | 3,65±0,448 | 2,83±0,18* | 1,20±0,14* |
| ГлПГ-498 | 4,45±0,54* | 1,43±0,16* | 4,87±0,52* | 3,07±0,15* | 1,46±0,16* |
| ПнПГ-790 | 4,56±0,49* | 1,45±0,15* | 4,91±0,45* | 3,06±0,16* | 1,52±0,14* |
| ПнПГ-700 | 4,54±0,41* | 1,46±0,16* | 4,93±0,40* | 3,05±0,13* | 1,54±0,17* |

Примітка. V_{4p} , V_3 , V_4 виражені в нмоль О/хв-мг білка; * – $p < 0,05$ відносно контролю.

Для досліджуваних речовин характерним було також зменшення швидкості дихання в присутності роз'єднувача – 2,4-ДНФ у середньому на 38 %, що супроводжувалося зниженням дихального коефіцієнта в середньому до (2,90±0,16) від.од.

ППЕ у дозі 1/100 DL_{50} призводили до зниження окиснювального фосфорилування в мітохондріях гепатоцитів щурів та синтезу АТФ, збільшення ваги вільного дихання. Про це свідчило зменшення інтенсивності дихання в безакцепторному середовищі та в метаболічному стані V_3 після додавання АДФ. Дихальний коефіцієнт (АДФ/О) значно знижувався, що вказувало на роз'єднання тканинного ди-

Всі експериментальні дослідження та евантазію щурів проводили з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати досліджень показали, що ППЕ у дозі 1/100 DL_{50} на 30-ту добу спостереження суттєво впливають на функціональну активність мітохондрій (табл. 1).

В печінці контрольних тварин відмічали високий рівень енергетичного стану мітохондрій.

За умов дії досліджуваної групи ксенобіотиків у стані V_3 спостерігалось зниження дихання в середньому на 31 %. Найбільш виражений ефект чинили ГлПГ-1136 (41 %) та ПГ-540 (35 %). Відомо, що цей стан відображає активність дихального ланцюга при функціонуванні H^+ -АТФ-синтетази. Тому можна вважати, що ППЕ призводять до зниження активності даного ферменту.

хання та окиснювального фосфорилування, розсіювання енергії у вигляді тепла.

ВИСНОВКИ. ППЕ за умов тривалої дії у дозі 1/100 DL_{50} призводять до порушення окиснювального фосфорилування та тканинного дихання, зниження продукції макроергічних субстратів (АТФ), які використовують для відновних процесів клітинного апарату. Досліджувана група ксенобіотиків впливає на процеси біоенергетики, роз'єднує тканинне дихання та окиснювальне фосфорилування, викликає розвиток гіпоксії в організмі експериментальних тварин. За умов дії ППЕ порушуються функції системи енергозабезпечення та детоксикації субклітинних структур печінки.

ЛІТЕРАТУРА

1. Годован В.В., Креснон В.І. Корекція перекисного окиснення ліпідів при токсичному гепатиті новими комплексними сполуками германію з біолігандами // Досягнення біології та медицини. – 2007. – № 2. – С. 13-16.
2. Губский Ю.И. Коррекция химического поражения печени. – К.: Здоров'я, 1989. – 168 с.
3. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У. и др. Справочник биохимика. – М.: Мир, 1991. – 543 с.
4. Кожевников Ю.В. О перекисном окислении липидов в норме и патологии // Вопр. мед. химии. – 1985. – № 5. – С. 2-7.
5. Alfroy V. The isolation of subcellular component // Biochemistry, physiology, morphology. – 1969. – **11**, № 7. – P. 254-255.
6. Chance B., Williams G. Adv. Enzymol. – 1956. – **17**. – P. 65-134.
7. Torchilin V.P. Immunoliposomes and PEGylated immunoliposomes: possible use for targeted delivery or imaging agents // Immunomethods. – 1994. – **4**, № 3. – P. 244-258.
8. Torchilin V.P., Omelyanenko V.G., Papisov M.J. et al. Polyethylene glycol on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity // Biochim. Biophys. Acta. – 1994. – **1195**, № 1. – P. 11-20.

ВЛИЯНИЕ ПРОСТЫХ ПОЛИЭФИРОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ ГЕПАТОЦИТОВ КРЫС

О.А. Наконечная

ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Изучено влияние простых полиэфиров на функциональное состояние митохондрий гепатоцитов крыс. Выявлены нарушения окислительного фосфорилирования и тканевого дыхания, снижение продукции АТФ в результате действия $1/100 DL_{50}$. Исследуемая группа ксенобиотиков приводит к разобщению тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **простые полиэфиры, митохондрии, тканевое дыхание, окислительное фосфорилирование.**

INFLUENCE OF POLYETHERS ON RAT MITOCHONDRIAS FUNCTIONAL STATE OF HEPATOCYTES

O.A. Nakonechna

KHARKIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

Summary

The present research investigates the influence of polyethers on rat mitochondrias functional state. The results show impairment of oxidative phosphorylation and tissue respiration as well as decrease in ATP production at conditions of action of $1/100 DL_{50}$. The experimental xenobiotics group leads to uncoupling the tissue respiration from oxidative phosphorylation.

KEY WORDS: **polyethers, mitochondrias, tissue respiration, oxidative phosphorylation.**

Отримано 17.02.2009 р.

Адреса для листування: О.А. Наконечная, вул. А. Барбюса, 3-а, кв. 31, Харків, 61022, Україна.

ЕЛЕМЕНТНИЙ СКЛАД СИРОВИНИ ТА ГУСТИХ ЕКСТРАКТІВ З БОРАГО ЛІКАРСЬКОГО

В.В. Машталер, Т.М. Гонтова, О.П. Хворост
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

За допомогою методу атомно-емісійної спектроскопії було вивчено елементний склад трави, насіння та густих екстрактів з даних видів сировини бораго лікарського. В досліджених об'єктах встановлено наявність 19 елементів та визначено їх кількісний вміст.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: елементи, трава, насіння, густі екстракти, бораго лікарський.

ВСТУП. Лікарські рослини є цінним джерелом не тільки біологічно активних сполук, а й елементів, життєво необхідних для обмінних процесів в організмі людини [2]. Екологічні умови вирощування рослин, забруднення навколишнього середовища потребують вивчення елементного складу рослинної сировини, яка є основою для створення фітопрепаратів [4].

Бораго лікарський (*Borago officinalis* L.) родини шорстколисті (*Boraginaceae*) широко культивується як їстівна та лікарська рослина. Так, за кордоном та в Україні траву використовують у народній медицині як протизапальний, спазмолітичний, пом'якшувальний, діуретичний, потогінний, жарознижуючий, вітамінний та антидепресивний засіб [1, 3, 5, 8, 9].

Відомостей про вивчення якісного складу та кількісного вмісту елементів у цій рослині в доступній нам літературі не знайдено.

Метою нашої роботи було порівняння елементного складу трави і насіння б. лікарського та ґрунту, зібраного з місця заготівлі сировини, а також визначення динаміки вилучення елементів у густі екстракти з даних видів сировини.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Траву збирали в Донецькій області у фазу масового цвітіння (червень 2008 р.), насіння – у фазу масового плодоношення (липень 2008 р.). Сировину висушували на повітрі до сухого стану, густі екстракти отримували за загальновідомими методами [7], як екстрагент використовували воду очищену. Якісний склад та кількісний вміст мінеральних сполук в досліджуваних зразках визначали методом атомно-емісійної

спектроскопії з атомізацією в повітряно-ацетиленовому полум'ї [6] під керівництвом старшого наукового співробітника ДНУ НТК "Інститут монокристалів" НАН України М.І. Шевцова.

Калібрувальні графіки в інтервалі вимірюваних концентрацій елементів будували за допомогою стандартних проб розчинів солей металів (ICOPM-23-27). Для розчинення міді та ванадію застосовували азотну кислоту ч., а при аналізі інших елементів – реактиви кваліфікації х.ч. та двічі очищену воду. Проби випарювали з кратерів графітових електродів у розряді дуги змінного струму силою 16 А при експозиції 60 с; як джерело збудження спектрів використовували ІВС-28. Реєстрували спектри на фотоплівці за допомогою спектрографа ДФС-8 з трилінзовою системою освітлення щілини та дифракційною решіткою 600 штр/мм. Фотометрували лінії спектрів при довжині хвилі від 230 до 347 нм. Вимірювання інтенсивності ліній у спектрах досліджуваних проб та градувальних зразків проводили за допомогою мікрофотометра МФ-1.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати визначення якісного складу та кількісного вмісту елементів досліджуваних об'єктів наведено в таблиці 1. Такі елементи, як силіцій, алюміній, ферум, кальцій та калій, що в ґрунті містилися в більшій кількості, в сировину мігрували також у значній кількості (табл. 1). З визначених макроелементів у траві та насінні бораго лікарського у великій кількості накопичувався калій. Його вміст у густому екстракті насіння був в 1,4 раза, а в густому екстракті трави – в 1,2 раза вищим, ніж у відповідній сировині. Вміст силіцію та кальцію був однаковим у траві – по 1950,00 мг/100 г. В густий

© В.В. Машталер, Т.М. Гонтова, О.П. Хворост, 2010.

Таблиця 1 – Елементний склад трави та насіння, густих екстрактів борого лікарського

| № з/п | Об'єкт дослідження | Вміст елементів*, мг/100 г | | | | | | | | | | | | | |
|-------|-------------------------|----------------------------|--------|---------|----------|--------|---------|---------|---------|---------|------|------|-------|-------|-------|
| | | Na | Mg | Al | Si | P | K | Ca | Mn | Fe | Ni | Cu | Zn | Mo | Pb |
| 1 | насіння | 830,00 | 420,00 | 210,00 | 830,00 | 170,00 | 4860,00 | 740,00 | 4,00 | 40,00 | 0,10 | 0,30 | 7,00 | 0,07 | 0,10 |
| 2 | трава | 1420,00 | 730,00 | 490,00 | 1950,00 | 290,00 | 7320,00 | 1950,00 | 20,00 | 150,00 | 0,40 | 0,40 | 5,00 | 1,00 | 0,20 |
| 3 | густий екстракт насіння | 1810,00 | 700,00 | 7,00 | 1860,00 | 460,00 | 6960,00 | 1390,00 | 7,00 | 5,00 | 1,00 | 1,00 | 2,00 | <0,03 | <0,03 |
| 4 | густий екстракт трави | 2250,00 | 720,00 | 30,00 | 1500,00 | 400,00 | 8500,00 | 1500,00 | 10,00 | 8,00 | 0,30 | 0,80 | 3,00 | <0,03 | <0,03 |
| 5 | грунт | 1300,00 | 900,00 | 6900,00 | 32680,00 | 390,00 | 1800,00 | 1850,00 | 1300,00 | 3500,00 | 5,00 | 6,00 | 10,00 | 2,00 | 3,00 |

Co<0,03, Cd<0,01, As<0,01, Hg<0,01, Sr< 0,01

Примітка. * – для трави та коренів у перерахунку на абсолютно суху сировину, для густих екстрактів у перерахунку на сухий залишок.

екстракт ці елементи також вилучалися в однаковій кількості – по 1500,00 мг/100 г, що в 1,3 раза менше, ніж в сировині. Вміст натрію був вищим в густому екстракті насіння, ніж в сировині, в 2,2 раза, а в густому екстракті трави – в 1,6 раза більшим, ніж в сировині. В усіх досліджених зразках у найменшій кількості накопичувався фосфор (табл. 1).

У траві та насінні б. лікарського в більшій кількості містилися алюміній та ферум (табл. 1). Для трави слід відмітити значний вміст мангану (20,00 мг/100 г). В густому екстракті насіння

купруму містилося 1,00 мг/100 г, а в густому екстракті трави – 0,80 мг/100 г. Вміст алюмінію та мангану в густому екстракті трави складав 30,00 і 10,00 мг/100 г відповідно.

ВИСНОВКИ. 1. Вперше було досліджено елементний склад трави, насіння та густих екстрактів з цих видів сировини б. лікарського і ґрунту з місця заготівлі сировини.

2. Було встановлено наявність 19 елементів, їх кількісний вміст, досліджено міграцію з ґрунту в сировину та перехід в густі екстракти, що використано в подальшій роботі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Безкоровайна О.І., Терещенкова І.І. Лікарські трави в медицині: Монографія. – Х.: Факт, 2002. – 480 с.
2. Гриффит Винтер. Витаміни, трави, мінерали і пищевые добавки: Справочник. – ФАИР-ПРЕСС, 2008. – 1056 с.
3. Дикорастущие полезные растения России / Отв. ред. А.Л. Буданцев, Е.Е. Лесиовская. – СПб.: Издательство СГХФА, 2001. – 663 с.
4. Кудрияш О.И., Гравель И.В. Определение содержания тяжелых металлов в сырье и настоях из цветков ромашки аптечной разными методами // Межвуз. сборник науч. трудов с международным участием, посвящ. 25-летию каф. фармакогнозии и ботаники: Тез. докл. – Ярославль, 2009. – С. 37-40.

5. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство Boraginaceae. – Л.: Наука, 1990. – С. 112-113.
6. Хавезов И., Цалиев Д. Атомно-адсорбционный анализ. – Л.: Химия, 1983. – 144 с.
7. Чуешов В.І., Чернов М.Ю., Хохлова Л.М. та ін. Промислова технологія ліків: Підручник у 2-х т. / За ред. проф. В.І. Чуешова. – Х.: Основа; Вид-во УкрФА, 1999. – Т. 2. – 704 с.
8. Conforti F., Sosa S., Marrelli M. et al. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants // *Ethnopharmacol.* – 2008. – **116**, № 1. – P. 144-151.
9. Gilani A., Bashir S., Khan A. Pharmacological basis for the use of *Borago officinalis* in gastrointestinal, respiratory and cardiovascular disorders // *Ethnopharmacol.* – 2007. – **114**, № 3. – P. 393-399.

ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ СЫРЬЯ И ГУСТЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ БОРАГО ЛЕКАРСТВЕННОГО

В.В. Машталер, Т.М. Гонтова, О.П. Хворост
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

С помощью метода атомно-эмиссионной спектроскопии было изучено элементный состав травы, семян и густых экстрактов с данных видов сырья бораго лекарственного. В исследованных объектах установлено наличие 19 элементов и определено их количественное содержание.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **элементы, трава, семена, густые экстракты, бораго лекарственный.**

ELEMENT COMPOSITION OF RAW MATERIAL AND ROPY DRAWS FROM THE BORAGE

V.V. Mashtaler, T.M. Hontova, O.P. Chvorost
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

*Using an emission spectrographic method the study of element composition of the herb, seeds and ropy draws from the *Borago officinalis* L. was conducted. Presence 19 elements in the investigated objects and their quantitative content were determined.*

KEY WORDS: **elements, herb, seeds, ropy draws, Borage.**

Отримано 23.11.2009 р.

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

МЕТОДИ ВИДІЛЕННЯ ДЕЗЛОРАТАДИНУ З БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

І.С. Дребот, О.Б. Поляк

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Вивчено умови ізолювання дезлоратадину з біологічного матеріалу за методами О.О. Васильєвої, Стаса-Отто, В.П. Крамаренка, В.А. Карташова. Показано, що метод О.О. Васильєвої дозволяє виділити близько 16 % препарату з модельних сумішей дезлоратадину з печінкою, метод Стаса-Отто – 15 %, метод В.П. Крамаренка – 28 %, а метод В.А. Карташова – 50 %. Запропоновано ефективну методику ізолювання дезлоратадину хлороформом, яка дає можливість виділити 50 % препарату з біологічного матеріалу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: дезлоратадин, біологічний матеріал, ізолювання, очистка, виявлення, кількісне визначення.

ВСТУП. Дезлоратадин (дезкарбоетоксило- ратадин, еріус, фрибрис, едем) – високоефек- тивний пероральний антигістамінний препа- рат III покоління, активний метаболіт лората- дину, інгібітор алергічного каскаду.

В літературі описано неодноразові випад- ки токсичної дії лоратадину на серцево-судин- ну систему людини [6]. Також доведено, що незначне підвищення концентрації дезлора- тадину може призвести до антихолінергічних ефектів [10], крім того, він має антиму斯卡ри- нову активність та збільшує частоту серцевих скорочень як у здорових собак, так і в собак із серцевою недостатністю [8]. В літературі [9] описано, що дезлоратадин може блокувати M₂- рецептори та викликати синусову тахікардію в морських свинок, а також в концентрації 1 мг/кг збільшувати у щурів частоту серцевих скорочень на 33 %.

Отже, можливо, негативна дія лоратадину на серцево-судинну систему людини частко- во викликана антихолінергічною дією його ак- тивного метаболіту – дезлоратадину. Тому ми вважаємо, що вивчення дезлоратадину в хіміко-токсикологічному відношенні є актуаль- ним і своєчасним.

Попередньо нами було розроблено мето- ди ідентифікації [4] та кількісного визначення дезлоратадину, вивчено ефективність екст- ракції дезлоратадину органічними розчинни- ками з водних розчинів при різних значен- нях рН середовища [5] та проведено ТШХ- скринінг (ненапрявлене хроматографічне

дослідження) хлороформної витяжки з біо- логічного матеріалу на лоратадин та дезло- ратадин [7].

У зв'язку з відсутністю в літературі даних щодо систематичного вивчення методів виді- лення дезлоратадину з біологічного матеріа- лу, ми поставили за мету в даній роботі вирі- шити це завдання.

Нами вивчена можливість виділення дез- лоратадину з біологічного матеріалу за загаль- ноприйнятими у хіміко-токсикологічному аналізі методами: О.О. Васильєвої (ізолюван- ня водою, підкисленою кислотою оксалатною), Стаса-Отто (ізолювання етанолом, підкисле- ним кислотою оксалатною), В.П. Крамаренка (ізолювання водою, підкисленою кислотою сульфатною) [3], В.А. Карташова (ізолювання ацетоном) [2], а також можливість розробки більш експресної та ефективнішої методики ізолювання препарату.

Одним із важливих чинників, які вплива- ють на процес ізолювання, є ступінь екстракції препарату з водних розчинів органічними роз- чинниками. Попередньо ми досліджували ступінь екстракції дезлоратадину з водних розчинів залежно від рН середовища і при- роди органічних розчинників, які застосову- ють в хіміко-токсикологічному аналізі. Було встановлено, що найпридатнішим розчинни- ком для виділення дезлоратадину з водних розчинів є хлороформ, який при рН 7,0-8,0 екстрагує близько 94,0 % препарату. Екстрак- ція гексаном практично не залежить від рН середовища й становить 7,0-11,0 %, тому його ми використовували для очистки водних ви-

© І.С. Дребот, О.Б. Поляк, 2010.

тяжок, які містили препарат, від співекстрактивних речовин [5].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для ізолювання дезлоратадину з біологічного матеріалу ми використовували модельні суміші печінки трупа людини, яка загинула від травми, що не зазнала гнилісних змін, з дезлоратадином.

До 10 г подрібненої печінки додавали 1,0 мл розчину дезлоратадину в 0,1 моль/л розчині кислоти хлоридної, що містив 2000 мкг препарату, ретельно перемішували і залишали на 24 год. Паралельно ставили контрольний дослід.

Ізолювання дезлоратадину з біологічного матеріалу проводили за методами О.О. Васильєвої, Стаса-Отто, В.П. Крамаренка, а також відповідно до розробленої нами методики елюювання дезлоратадину з біологічного матеріалу хлороформом. Новизна підходу полягала в зменшенні наважок біологічного матеріалу до 10 г. Відповідно, було зменшено й об'єми розчинників. При використанні зазначених методів екстракцію дезлоратадину з підкисленої водної витяжки проводили хлороформом 3 рази по 10 мл. Ізолювання дезлоратадину з біологічного матеріалу методом В.А. Карташова здійснювали згідно з методикою, описаною в літературі [2].

В літературі [1] описано високоефективний метод ізолювання органічних речовин основного характеру за допомогою хлороформу. У зв'язку з цим, ми вивчили можливість використання даного методу стосовно дезлоратадину.

Методика ізолювання дезлоратадину з біологічного матеріалу за допомогою хлороформу. 10 г печінки, що містила препарат, розтирали у ступці з 30 г безводного натрій сульфату до утворення сипучої маси (якщо утворювалася волога маса, її залишали на 2 год для висихання на повітрі). Сипучу масу переносили у скляну колонку діаметром 20 мм, у вузьку нижню частину якої перед заповненням поміщали невеликий ватний тампон. Сипучу масу ущільнювали шляхом легко постукування по колонці. Через відкритий кран у колонку за допомогою гумової груші засмоктували хлороформ до утворення "дзеркала" над поверхнею товщиною до 2 см. Кран закривали і над колонкою встановлювали ділильну лійку з 100 мл хлороформу. Хлороформ пропускали через колонку зі швидкістю 60-80 крапель за хвилину, утримуючи "дзеркало" над біологічним матеріалом. За цих умов утворюється до 100 мл хлороформної витяжки. Паралельно проводили контрольний дослід.

Для виявлення дезлоратадину у витяжках з біологічного матеріалу використовували метод хроматографії в тонких шарах сорбенту на пластинках "Sorbfil" (сілікагель СТХ-1А, тип підкладки ПЕТФ, розмір пластинок 10x15 см) та УФ-спектрофотометрію [4].

Хроматографічні пластинки попередньо чистили ацетоном, висушували й активували в сушильній шафі при 120 °С протягом 20 хв. На лінію старту скляними капілярами наносили три проби: стандартний розчин дезлоратадину в хлороформі; хлороформну витяжку з біологічного матеріалу з препаратом; хлороформну витяжку з біоматеріалу, отриману в контрольному досліді.

Об'єм нанесених проб відповідав 0,5 г біологічного матеріалу при ізолюванні за методами О.О. Васильєвої або Стаса-Отто та 0,2 г при ізолюванні за методами В.П. Крамаренка, В.А. Карташова чи хлороформом.

Системою розчинників була суміш *n*-бутанол-ацетатна кислота-вода (1:1:1). Пластинки елюювали в камері об'ємом 1000 см³ зі шляхом пробігу системи розчинників 10 см і висушували на повітрі. Для проявлення плям використовували УФ-світло та пари йоду.

Значення R_f дезлоратадину для всіх методів ізолювання складали 0,47-0,50. В УФ-світлі плями дезлоратадину мали фіолетовий колір, у парах йоду – оранжево-коричневий. Зазначені проявники визначають і плями співекстрактивних речовин.

З метою очистки від співекстрактивних речовин пластинки з нанесеними пробами попередньо 3 рази елюювали в камері з хлороформом до лінії фінішу. Після висушування пластинки досліджували в УФ-світлі. Плями дезлоратадину при цьому залишалися на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрували з фронтом розчинників. Потім пластинки елюювали в системі *n*-бутанол-ацетатна кислота-вода (1:1:1), висушували і досліджували в УФ-світлі або проявляли парами йоду. За цих умов мав місце задовільний розподіл плям дезлоратадину і співекстрактивних речовин.

Кількісне визначення дезлоратадину проводили за допомогою розробленого нами методу УФ-спектрофотометрії [5].

Попередньо нами було встановлено, що співекстрактивні речовини, які містяться у витяжках з біологічного матеріалу, отриманих описаними методами ізолювання, заважають виявленню дезлоратадину в етанолі методом УФ-спектрофотометрії. У зв'язку з цим, проби витяжок піддавали додатковій очистці мето-

дом тонкошарової хроматографії (ТШХ) або екстракційної очистки гексаном.

Методика УФ-спектрофотометрично-го визначення дезлоратадину. Пробу хлороформної витяжки, отриману одним із вказаних методів ізолювання, поміщали у порцелянову чашку, залишали для вивітрювання розчинника. Сухий залишок розчиняли в 10 мл етанолу та знімали значення оптичної густини на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі (246 ± 2) нм. Як розчин порівняння використовували розчин, одержаний при проведенні контрольного досліду. Концентрацію дезлоратадину визначали за допомогою градувального графіка.

У разі очистки від співекстрактивних речовин методом тонкошарової хроматографії ми попередньо сухий залишок розчиняли в 0,5 мл хлороформу. На лінію старту хроматографічної пластинки "Sorbfil" наносили рискою 2 см 0,05 мл упареної хлороформної витяжки з біологічного матеріалу, що еквівалентна 1 г біологічного матеріалу. На відстані 2 см від цієї риски на лінію старту наносили аналогічну риску 0,01 мл (20 мкг) стандартного розчину дезлоратадину. Пластинку двічі піддавали елююванню в камері з хлороформом до лінії фінішу і хроматографували в системі розчинників *n*-бутанол–ацетатна кислота–вода (1:1:1). Після цього пластинку висушували і досліджували в УФ-світлі. За даних умов хроматографування спостерігався задовільний поділ плям дезлоратадину та співекстрактивних речовин, які залишалися на лінії старту і мігрували за лінію фінішу, тоді як плями дезлоратадину знаходилися посередині пластинки. Знімали скальпелем шар сорбенту розміром 3x1,5 см із плямою дезлоратадину з біологічного матеріалу на рівні знаходження плями стандартного розчину лоратадину. З цього шару сорбенту лоратадин тричі елюювали в пробірці 10 мл хлороформу протягом 10 хв, фільтрували, переносили у порцелянову чашку та випаровували на повітрі. Потім розчиняли сухий залишок в 10 мл етанолу та знімали значення оптичної густини на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі (246 ± 2) нм. Як розчин порівняння використовували розчин, одержаний при проведенні контрольного досліду. Концентрацію дезлоратадину визначали за допомогою градувального графіка.

У разі ізолювання дезлоратадину з біологічного матеріалу хлороформом вимірювали об'єм отриманої хлороформної витяжки, відбирали у ділильну лійку третину, збовтували 3

рази по 10 мл з новими порціями 0,1 моль/л розчину кислоти хлоридної протягом 5-7 хв. У верхніх водних шарах утворювалась пінна емульсія, яку руйнували шляхом центрифугування (протягом 5 хв зі швидкістю 6000 об./хв). Кислу водну витяжку ($pH \approx 2$) відокремлювали за допомогою ділильної лійки, двічі збовтували протягом 5 хв з новими порціями гексану (по 10 мл). Гексанові шари відокремлювали і далі не досліджували. Кислу водну витяжку підлужнювали 25 % розчином амоніаку до pH 8 за універсальним індикатором і тричі збовтували з новими порціями хлороформу (по 10 мл). Хлороформні витяжки об'єднували та аналізували. Кількісне визначення дезлоратадину проводили методом УФ-спектроскопії.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При розробці методики кількісного визначення дезлоратадину методом УФ-спектрофотометрії встановлено, що оптична густина розчинів підпорядковується основному закону світлопоглинання при вмісті дезлоратадину від 2 до 22 мкг в 1 мл етанолу. Метрологічні характеристики: $\bar{X} = 100,30$ % (середнє з 9 визначень), при $\alpha = 95$ % – $S = 0,779$, $S_{\bar{X}} = 0,260$, $\Delta \bar{X} = 0,60$, $\epsilon = 0,60$ %.

Результати визначень концентрації дезлоратадину у витяжках з біологічного матеріалу за допомогою УФ-спектрофотометричного методу наведено в таблиці 1.

Результати ізолювання дезлоратадину з біологічного матеріалу свідчать про те, що за допомогою загальноприйнятих у хіміко-токсикологічному аналізі методів можна виділити до 50 % препарату (за методом В.А. Карташова). Найбільш оптимальною є запропонована нами методика ізолювання хлороформом, яка дозволяє виділити також близько 50 % препарату з біологічного матеріалу (табл. 1), проте є більш експресною.

Метод УФ-спектрофотометрії дає можливість визначати дезлоратадин у витяжках з біологічного матеріалу із застосуванням екстракційної очистки гексаном або, крім того, додаткової очистки методом ТШХ. Результати досліджень свідчать про те, що при хроматографічній чистці втрати дезлоратадину коливаються в межах 20 %. Це призводить до погіршення результатів кількісного визначення порівняно з результатами, одержаними до вказаної очистки (табл. 1).

ВИСНОВКИ. 1. Вивчено умови ізолювання дезлоратадину з біологічного матеріалу в мо-

Таблиця 1 – Результати ізолювання дезлоратадину з біологічного матеріалу (модельні суміші з печінкою) та їх метрологічні характеристики (середнє з 5 визначень, $\alpha=0,95$)

| Метод ізолювання | Метод аналізу | |
|------------------------|--|---|
| | УФ-спектрофотометричний, без очистки методом ТШХ | |
| | Виділено лоратадину, % | Метрологічні характеристики |
| О.О. Васильєвої | 15,88 | $\bar{X}=15,88$ %; S=0,482; S \bar{x} =0,216; $\Delta \bar{X} = \pm 0,60$; $\epsilon = \pm 3,78$ % |
| Стаса-Отто | 15,50 | $\bar{X}=15,50$ %; S=0,791; S \bar{x} =0,354; $\Delta \bar{X} = \pm 0,98$; $\epsilon = \pm 6,32$ % |
| В.П. Крамаренка | 28,44 | $\bar{X}=28,44$ %; S=0,921; S \bar{x} =0,412; $\Delta \bar{X} = \pm 1,15$; $\epsilon = \pm 4,04$ % |
| В.А. Карташова | 49,50 | $\bar{X}=49,50$ %; S=2,50; S \bar{x} =1,118; $\Delta \bar{X} = \pm 3,11$; $\epsilon = \pm 6,28$ % |
| Ізолювання хлороформом | 50,50 | $\bar{X}=50,50$ %; S=1,681; S \bar{x} =0,752; $\Delta \bar{X} = \pm 2,09$; $\epsilon = \pm 4,14$ % |

дельних сумішах з печінкою за методами О.О. Васильєвої, В.П. Крамаренка, Стаса-Отто, В.А. Карташова.

2. Запропоновано ефективну експресну методику ізолювання дезлоратадину хлоро-

формом, яка дозволяє виділити близько 50 % препарату.

3. Встановлено, що для визначення вмісту дезлоратадину у витяжках з біологічного матеріалу може бути використаний УФ-спектрофотометричний метод.

ЛІТЕРАТУРА

1. Болотов В.В., Ахмедов Е.Ю. Порівняльна оцінка методів виділення трамалу з біологічного матеріалу // Вісник фармації. – 2001. – № 1 (25). – С. 16-19.
2. Болотов В.В., Стадніченко Е.І., Бондар В.С. Посібник до практичних занять з токсикологічної хімії. – Х.: Основа, 1997. – 169 с.
3. Крамаренко В.П. Хіміко-токсикологічний аналіз. – К.: Вища школа, 1995. – 423 с.
4. Поляк О.Б. Ідентифікація дезлоратадину хімічними та фізико-хімічними методами // Фармац. часопис. – 2008. – № 4. – С. 57-61.
5. Поляк О.Б. Спектрофотометричне визначення та екстракція дезлоратадину органічними розчинниками з водних розчинів залежно від рН середовища // Мед. хімія. – 2009. – № 1. – С. 67-70.
6. Поляк О.Б. Хіміко-токсикологічне дослідження лоратадину: Дис. ... канд. фармац. наук. – Харків, 2005. – 160 с.
7. Поляк О.Б., Бондар В.С. ТШХ-скринінг лоратадину та дезлоратадину // Актуальні питання фарма-

цевничної та медичної науки та практики. – 2007. – XX випуск. – С. 184-189.

8. Igawa A., Cheng C.P., Little W.C. Desloratadine, but not fexofenadine, increases heart rate in dogs before and after heart failure // Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC, USA.

9. Kramer J., Obejero-Paz C., Brown A. et al. Descarboethoxyloratadine is more potent than diphenhydramine, loratadine, and fexofenadine at inhibiting muscarinic type 2 (M_2) receptor-activated K^+ current in atrial guinea pig cardiomyocytes // Chan Test Inc Neo Parkway, Cleveland, OH, USA; Departments of Psychiatry and Pharmacology, Perm State University College of Medicine, Hershey, PA, USA.

10. Offord S.J., Molnar C. Comparison of the H₁-histamine and muscarinic receptor binding profiles of fexofenadin // Aventis Pharma. Departments of Psychiatry and Pharmacology, Hershey Medical Center, Perm State University.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ДЕЗЛОРАТАДИНА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

И.С. Дребот, О.Б. Поляк

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

Изучены условия изолирования дезлоратадина из биологического материала с помощью методов А.А. Васильевой, Стаса-Отто, В.Ф. Крамаренко, В.А. Карташова. Показано, что метод А.А. Васильевой позволяет выделить около 16 % препарата из модельных смесей дезлоратадина с печенью, метод Стаса-Отто – 15 %, метод В.Ф. Крамаренко – 28 %, а метод В.А. Карташова – 50 %. Предложена эффективная методика изолирования дезлоратадина хлороформом, которая даёт возможность выделить 50 % препарата из биологического материала.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дезлоратадин, биологический материал, изолирование, очистка, обнаружение, количественное определение.

ISOLATION METHODS OF DESLORATIDINE FROM BIOLOGICAL MATERIAL

I.S. Drebot, O.B. Polyak

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

The conditions of desloratadine isolation from a biological material with the help of methods by O.O. Vasilyeva, Stas-Otto, V.P. Kramarenko, V.A. Kartashova have been investigated. It is shown that Vasilyeva method allows isolating 16 % of loratadine, Kramarenko method – 28 % and Stas-Otto method – about 15 %, Kartashova – 50 %. The effective method of desloratadine isolation with the chloroform has been collaborated. It allows isolating 50 % of the preparation from a biological material.

KEY WORDS: desloratadine, biological material, isolation, cleaning, discovery, quantitative determination.

Отримано 8.12.2009 р.

Адреса для листування: О.Б. Поляк, Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, вул. Руська, 36, Тернопіль, 46001, Україна.



**ДО 70-РІЧЧЯ ЧЛЕНА-КОРЕСПОНДЕНТА
НАН УКРАЇНИ В.П. ЧЕРНИХА**

дидатів наук, середній вік яких складає 45 років. У 1991 р. Харківський фармацевтичний інститут одним із перших серед 900 ВНЗ отримав статус акредитованого на союзному рівні. У 1999 р. у першій п'ятірці ВНЗ України набув статусу національного, став другим національним ВНЗ у м. Харкові.

Під керівництвом В.П. Черниха здійснено кадровий "прорив" у НФаУ: з 1980 р. підготовлено понад 130 докторів наук та майже 650 кандидатів наук. За рейтингом ЮНЕСКО, серед 200 кращих університетів держави НФаУ має один з найвищих показників якості науково-педагогічного потенціалу – 83 %. За останні 15 років у НФаУ відкрито 13 нових спеціальностей, Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації, коледж. Упродовж всього періоду керування університетом В.П. Черних забезпечив стабільний фінансовий стан закладу, створив ефективну систему соціального захисту співробітників і студентів.

Протягом останніх десятиріч НФаУ займає лідерські позиції в Україні, у національному рейтингу є другим серед 18 медичних ВНЗ та третім серед харківських університетів, є флагманом фармацевтичної освіти серед навчальних закладів країн СНД. Це університет європейського рівня, визнаний у світі спеціалізований ВНЗ, що забезпечує комплексну підготовку фахівців високої якості за всіма напрямками фармацевтичної галузі, в якому отримали вищу фармацевтичну освіту понад 50 тисяч фахівців, серед яких більше 6 тисяч магістрів фармації для 82 країн світу. Підготовка фахівців для зарубіжжя є вагомим фактором піднесення міжнародного іміджу нашої держави та освіти.

З метою реалізації державної політики кадрового забезпечення галузі В.П. Черних запропонував систему підготовки фахівців "на місцях" шляхом відкриття мережі з 20 фармацевтичних факультетів при медичних ВНЗ, забезпечення їх науково-педагогічними кадрами, навчально-методичною літературою. В університеті здійснюється підготовка науково-педагогічних кадрів для фармацевтичних факультетів ВНЗ, практичної фармації України та зарубіжних країн.

Вперше у системі фармацевтичної освіти України створено навчально-методичні комплекси навчальної літератури з усіх дисциплін обсягом понад 2 тисячі найменувань. Навчальний процес на 100 % забезпечено на-

5 січня 2010 р. виповнилось 70 років ректору Національного фармацевтичного університету Валентину Петровичу Черниху – члену-кореспонденту Національної академії наук України, лауреату Державної премії України, доктору фармацевтичних наук, доктору хімічних наук, професору, який понад 50 років свого життя віддав служінню благородній місії – підготовці фахівців для фармацевтичної галузі, наукових і науково-педагогічних кадрів, розбудові та реорганізації Національного фармацевтичного університету, головного фармацевтичного вищого навчального закладу України з 200-літньою історією, реформуванню вищої фармацевтичної освіти та фармацевтичної галузі України.

Пройшов шлях від студента, аспіранта, асистента, доцента, професора, завідувача кафедри, декана, проректора з навчальної роботи до ректора Національного фармацевтичного університету, який очолює протягом 30 років, з 1980 р. Сьогодні колектив університету нараховує понад 20 тисяч співробітників і студентів.

Під керівництвом видатного організатора Харківський фармацевтичний інститут, в якому навчались 1600 студентів за однією спеціальністю "Фармація" та працювали 6 докторів наук і 73 кандидати наук, виріс в унікальний науково-освітній комплекс – Національний фармацевтичний університет, в якому сьогодні навчаються 17,5 тисяч студентів за 14 спеціальностями та займаються науково-педагогічною діяльністю 110 докторів наук і 500 кан-

вчально-методичною літературою державною та іноземними мовами, якою користуються всі фармацевтичні факультети України і деяких країн СНД. До наукової спадщини університету входять понад 490 підручників і навчальних посібників, 300 монографій, більше 1100 патентів, розроблено та впроваджено у виробництво 261 новий лікарський препарат. В НФаУ створено 16 наукових шкіл, які плідно працюють.

В.П. Черних є ініціатором та одним з авторів розробки Концепції розвитку фармацевтичної галузі та освіти України, розширення спектра спеціальностей для фармацевтичної галузі, засновником новітнього напрямку у фармації: фармацевтичної опіки хворих, системи контролю якості ліків, у т.ч. впровадження біоеквівалентності на засадах належної клінічної практики, відповідно до світових вимог.

Для піднесення авторитету і визнання на державному рівні фармацевтичної галузі за ініціативою та безпосередньою участю В.П. Черниха в Україні встановлено професійне свято – День фармацевтичного працівника, запроваджено нову державну нагороду – почесне звання заслуженого працівника фармації України. Під безпосереднім керівництвом Валентина Петровича культурна скарбниця Харківщини збагачена унікальною скульптурною композицією “Фармація у віках”, першим у світі пам’ятником фармацевтові. В.П. Черних став ідеологом зміцнення галузі та організатором проведення на базі університету V і VI Національних з’їздів фармацевтів України, створення Фармацевтичної асоціації України.

Видатний учений в галузі органічної хімії, праці якого широко відомі науковій спільноті України і зарубіжжя, є автором 1156 наукових робіт, серед яких підручник “Органічна хімія” у 3-х томах, удостоєний Державної премії України в галузі науки і техніки у 2000 р., перший підручник для вищої фармацевтичної освіти України. Створено новий науковий напрямок, новизну і пріоритетність наукових досліджень підтверджують 108 патентів України і Росії, 348 авторських свідоцтв. Понад 40 років віддано підготовці докторів і кандидатів наук для вищої школи і практичної фармації, створено вітчизняну школу хіміків-синтетиків, у межах якої вченим підготовлено більше 60 докторів і кандидатів наук та створено 16 нових лікарських препаратів. За результатами багатолітніх наукових досліджень в галузі синтезу біологічно активних речовин у 1997 р. його обрано членом-кореспондентом НАН України. В історії фармації України ця подія стала першим прикладом представництва фармацевтичної галузі в академічній науці.

В.П. Черних – відомий державний і громадський діяч, ініціатор видання 7 наукових журналів ВАК України. Протягом 30 років працював у Експертних радах ВАК СРСР та України. На сьогодні очолює республіканську Проблемну комісію “Фармація” МОЗ України, є головою науково-методичної комісії з фармації Міністерства освіти і науки України, членом вченої ради ДП “Державний фармакологічний центр” МОЗ України, членом президії Фармакопейного комітету МОЗ України, членом вченої медичної ради МОЗ України, членом бюро Державного фармакологічного центру з реєстрації ЛЗ і ЛП, членом секції хімії та хімічної технології Комітету з Державних премій в галузі науки і техніки, членом колегії Держінспекції з контролю якості лікарських препаратів МОЗ України. В.П. Черних – віце-президент Фармацевтичної асоціації України, президент Фармацевтичної асоціації Харківщини. Його обирали депутатом Київської районної ради народних депутатів м. Харкова (1986) та міської ради народних депутатів (1985-1987). У 1999 р. Міжнародний біографічний центр та Американський біографічний інститут визнали В.П. Черниха одним із найбільш впливових і видатних учених світу. Валентин Петрович активно займається міжнародною та просвітницькою діяльністю.

Звитяжна праця та видатні заслуги відомого вченого, педагога, організатора, державного і громадського діяча були неодноразово вшановані державою: нагороджений орденами “Знак Пошани”, “Трудового Червоного Прапора”, орденами України “За заслуги” I, II, III ступенів, князя Ярослава Мудрого V ступеня, Почесною грамотою Верховної Ради України, почесними грамотами та відзнаками МОЗ і МОН України “Відмінник охорони здоров’я”, “Відмінник освіти України”, “Винахідник СРСР”, “Петро Могила”, відзнакою Харківської облдержадміністрації “Слобожанська слава”, йому присвоєно почесні звання заслуженого винахідника УРСР, заслуженого діяча науки і техніки УРСР.

Науково-педагогічна й академічна громадськість, колектив і студенти Національного фармацевтичного університету, колеги, друзі, учні від щирого серця вітають відомого вченого, талановитого педагога, знаного організатора і реформатора вищої фармацевтичної освіти, невтомного ентузіаста і патріота фармації, життя якого є яскравим прикладом відданого служіння інтересам освіти, науки, здоров’я людей, інтересам нашої славної України.

Нових Вам, Валентине Петровичу, звершень і злетів, невичерпного творчого натхнення, наснаги і довголіття на науково-освітній ниві України.



ДО 80-РІЧЧЯ ПРОФЕСОРА Я.І. ГОНСЬКОГО

вача кафедри біологічної хімії, на якій працює професором і досі.

Сфера наукових інтересів професора Я.І. Гонського – це вивчення патогенезу хімічного ураження печінки. Під його керівництвом всебічно досліджено роль процесів вільнорадикального, мітросомального та енергозабезпечувального окиснення в механізмах токсичних гепатитів; патогенетично обґрунтовано використання при хімічному гепатиті різних антиоксидантів, розроблено їх ефективні комбінації; вивчено механізми позитивного ефекту мікрохвильової резонансної терапії при хворобах печінки; досліджено ефективність при токсичному гепатиті ліпосом з включеними в них антиоксидантами; показано ефективність трансплантації донорських гепатоцитів при хімічному ураженні печінки; досліджено молекулярні механізми дії при гепатитах різних ентеросорбентів. Професор Я.І. Гонський – автор нових сорбентів “Фібрабет” і “Фібросил”, які широко використовують у клініці. Під його керівництвом виконано і захищено більше 30 кандидатських, 3 докторських дисертації, на даному етапі виконується ще 3 наукові роботи. Він є автором підручника “Біохімія людини”, “Посібника для практичних робіт з біохімії”, “Тлумачного довідника з медико-біологічної термінології”, “Керівництва для фельдшерів”, понад 200 наукових праць та 10 патентів на винахід.

Професор Я.І. Гонський є дійсним членом Української академії наук національного прогресу, заступником головного редактора журналу “Медична хімія”, тривалий час був членом спеціалізованої вченої ради із захисту кандидатських та докторських дисертацій при Чернівецькому університеті.

Ярослав Іванович – щирий патріот Української держави. Він був активним учасником створення Народного руху на Тернопільщині, є членом проводу обласного відділення Конгресу української інтелігенції, постійно виступає зі зверненнями, лекціями, доповідями з питань української мови та культури, соціального захисту українців, піднімає питання повернення забутих імен українських учених, з його ініціативи Тернопільській медичній академії присвоєно ім'я видатного українського наукового і політичного діяча І.Я. Горбачевського. Життєвий шлях цього вченого Я.І. Гонсь-

Ярослав Іванович Гонський народився 31 січня 1930 р. у смт Войнилів Калуського району Івано-Франківської області в сім'ї селян. Після закінчення середньої школи вступив на фізико-математичний факультет Станіславського педагогічного інституту, потім служив в армії на Далекій Півночі. У 1953 р. вступив до Станіславського медичного інституту, який закінчив з відзнакою. Працював головним лікарем районного тубдиспансеру, а 1962 р. – асистентом кафедри біохімії Івано-Франківського медінституту. Після захисту кандидатської дисертації отримав звання доцента і став завідувачем курсу біофізики цього ж вузу. Під час роботи в Івано-Франківському медінституті Я.І. Гонський досліджував обмін і біологічну роль мікроелементів в організмі людини, впровадив ряд нових підходів при вивченні проблем злякисного росту, синтезував нові антиканцерогенні сполуки, зокрема металокомплекси з глутаміновою кислотою, запровадив нові методи вивчення біологічного окиснення, за допомогою електронного парамагнітного резонансу досліджував при різних патологіях метаболізм вільних радикалів та структуру парамагнітних центрів металоферментів, запропонував ряд модифікацій хемілюмінисцентного методу дослідження інтенсивності вільнорадикальних процесів.

У 1985 р. Я.І. Гонський захистив докторську дисертацію і був переведений у Тернопільський медичний інститут на посаду завіду-

кий описав у двох монографіях, надрукованих у видавництві “Укрмедкнига”. Професор Я.І. Гонський – висококваліфікований спеціаліст, досвідчений викладач, чудовий лектор. Він уміє зацікавити слухачів, чітко, образно і доступно викласти навчальний матеріал.

Я.І. Гонському властиві скромність, чуйність, уважне ставлення до співробітників і студентів. Він поєднує в собі всі найкращі риси виклада-

ча, наукового співробітника, вчителя. Спілкування з Ярославом Івановичем надихає на творчі пошуки, пробуджує цікавість до нового, до знань.

Усі співробітники кафедри медичної біохімії та клініко-лабораторної діагностики, редакція журналу “Медична хімія”, а також учні, вчителем яких був і є Ярослав Іванович, вітають ювіляра з 80-річчям від дня народження, бажають йому міцного здоров’я ще на довгі роки.