

Т.О. Векліч¹, О.А. Шкрабак¹, І.І. Геращенко², В.Ф. Горчев¹, С.О. Костерін¹
 ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМЕНІ О.В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ¹, КИЇВ
 ІНСТИТУТ ХІМІЇ ПОВЕРХНІ ІМЕНІ О.О. ЧУЙКА НАН УКРАЇНИ², КИЇВ

ВПЛИВ НАНОРОЗМІРНОГО КРЕМНЕЗЕМУ НА Na⁺,K⁺-АТФазу АКТИВНІСТЬ У ПЛАЗМАТИЧНІЙ МЕМБРАНІ ГЛАДЕНЬКОМ'ЯЗОВИХ КЛІТИН

Вивчено вплив нанорозмірного кремнезему на Na⁺,K⁺-АТФазу та "базальну" Mg²⁺-АТФазу ферментативну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин міометрія *in vitro*. Встановлено, що нанокремнезем у діапазоні концентрацій від 0,001 до 0,1 % вірогідно стимулює активність Na⁺,K⁺-АТФази і практично не впливає на ферментативну активність Mg²⁺-АТФази. Адсорбційну взаємодію частинок нанокремнезему з плазматичними мембранами, наслідком якої може бути зміна активності мембранозв'язаних ферментів, підтверджено методом лазерної кореляційної спектроскопії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нанорозмірний кремнезем (нано-SiO₂), Na⁺,K⁺-АТФаза, Mg²⁺-АТФаза, ферментативний гідроліз АТФ, плазматична мембрана, міометрій, гладеньком'язові клітини, лазерна кореляційна спектроскопія.

ВСТУП. Нанорозмірний аморфний кремнезем (нано-SiO₂) має унікальні фізико-хімічні властивості: велику питому поверхню, хімічну чистоту, гідрофільність, значну адсорбційну активність. Встановлено високу тропність нано-SiO₂ до біологічних мембран, в основі якої, як передбачається, лежить адсорбційна взаємодія з білками біомембран [4]. Вивчення мембранотропних властивостей, зокрема впливу на активність мембранозв'язаних ферментів, слід розглядати як один з етапів комплексного дослідження взаємодії дисперсних матеріалів з біоб'єктами [6].

Na⁺,K⁺-АТФаза (натрієва помпа), яка локалізована в плазматичній мембрані клітин збудливих тканин, у тому числі й гладеньких м'язів, та селективно інгібується убаїном, являє собою електрогенну Ca²⁺-незалежну Mg²⁺,Na⁺,K⁺,АТФ-залежну транспортну систему, що здійснює активне трансмембранне перенесення іонів Na⁺ та K⁺ (стехіометрія – 3:2) і, тим самим, підтримує їх електрохімічні градієнти, необхідні для нормального функціонування клітини. Йдеться про забезпечення електричної збудливості нервової та м'язової тканин, енергозабезпечення Na⁺-залежного вторинного активного транспорту іонів кальцію (обмін Na⁺-Ca²⁺) та протонів (обмін Na⁺-H⁺), регуляцію клітинного об'єму тощо [8, 11-13, 16].

Беручи до уваги високу тропність нано-SiO₂ до біологічних мембран, ми поставили перед собою завдання вивчити вплив кремнезему на Na⁺,K⁺-АТФазу ферментативну активність у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин міометрія.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Фракцію плазматичних мембран гладеньком'язових клітин виділяли з міометрія свині, як було описано раніше [2, 9]. Вміст білка у фракції плазматичних мембран визначали реакцією з розчином Ку-масі-G250 за методом М. Bradford [14]. Кількість білка мембранної фракції в пробі становила 20-30 мкг.

"Загальну" Mg²⁺,Na⁺,K⁺-АТФазу активність визначали у фракції плазматичних мембран клітин міометрія при 37 °С у стандартному середовищі (об'єм – 0,4 мл), до складу якого входять (мМ): 1 АТФ, 3 MgCl₂, 125 NaCl, 25 KCl, 1 ЕГТА (хелатор ендогенних іонів Ca²⁺ у середовищі), 20 Нерес-Tris-буфер (рН 7,4), 1 NaN₃ (інгібітор АТФази мітохондрій [15]), а також 0,1 мкМ тапсигаргін (селективний інгібітор Ca²⁺,Mg²⁺-АТФази ендосарко)-плазматичного ретикулула [15]) і 0,1 % дигітонін (фактор перфорації плазматичної мембрани [3]). Ферментативну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації 20 мкл суспензії плазматичних мембран. Суміш інкубували протягом 4 хв, після чого додавали 1 мл "стоп-розчину", що містить 1,5 М ацетату натрію, 3,7 % формаль-

© Т.О. Векліч, О.А. Шкрабак, І.І. Геращенко,
 В.Ф. Горчев, С.О. Костерін, 2010.

дегіду, 14 % етанолу, 5 % трихлороцтової кислоти (рН 4,3 при 8 °С).

“Базальну” Mg^{2+} -АТФазну активність визначали в тому ж інкубаційному середовищі, але за присутності 1 мМ убаїну – селективного інгібітора Na^+, K^+ -АТФази [18, 19]. Раніше нами було доведено, що ця убаїннечутлива активність є Na^+, K^+ -незалежною (використовували умову $[Na^+] + [K^+] = 150$ мМ) [2].

“Убаїннечутливу” Na^+, K^+ -АТФазну активність розраховували за різницею між величинами “загальної” АТФазної і “базальної” Mg^{2+} -АТФазної активностей.

Контролем на неферментативний гідроліз АТФ у всіх дослідах слугувало середовище інкубації зі складом, аналогічним описаному вище, але яке не містило фрагментів плазматичної мембрани. Контролем на кількість ендogenous неорганічного фосфору (P_i) в мембранному препараті було середовище, що містило тільки фрагменти плазматичних мембран у водному розчині. Отже, питому “загальну” АТФазну ферментативну активність розраховували за різницею між кількістю P_i , що утворився в середовищі інкубації за присутності та відсутності фрагментів плазматичної мембрани, з урахуванням поправки на неферментативний гідроліз АТФ та вміст ендogenous P_i в мембранному препараті. Кількість продукту реакції P_i визначали за методом W. Rathbun et V. Betlach [17].

Нано- SiO_2 з питомою поверхнею близько 300 м²/г було синтезовано на дослідно-експериментальному заводі Інституту хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України, м. Калуш. За допомогою ультразвукової обробки готували вихідну 1 % водну суспензію нано- SiO_2 .

З метою вивчення впливу нано- SiO_2 на питому активність Na^+, K^+ -АТФази та Mg^{2+} -АТФази використовували стандартне середовище інкубації, описане вище, до якого додавали аліквоти вихідної суспензії нанокремнезему, необхідні для створення кінцевої концентрації нано- SiO_2 в діапазоні 0,001-0,1 %. За 100 % (“нульова точка”) брали значення АТФ-гідролітичної активності, яке визначали за відсутності нано- SiO_2 у середовищі інкубації.

Значення уявних констант активації K_a розраховували з використанням лінеаризованих графіків Хілла відповідно до емпіричного рівняння Хілла: $lg[(A_{max} - A)/(A - A_0)] = -n_H / g K_a + n_H / g [I]$, де A – питома ферментативна активність за присутності в середовищі інкубації нано- SiO_2 в концентрації $[I]$, A_0 та A_{max} – питомі активності за відсутності (“нульова точка”) та максимальна активність за присутності в середовищі інкубації нано- SiO_2 відповідно. У випадку

таких графіків значення величини достовірності апроксимації R^2 становило 0,90-0,99.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили за допомогою стандартних методів з використанням t-критерію Стьюдента. Кінетичні та статистичні розрахунки здійснювали в режимі програмного забезпечення на персональному комп’ютері IBM PC.

Для визначення ферментативної активності застосовували реактиви: АТФ, Непес, убаїн, тапсигаргін (“Sigma”, США); Tris-гідроксиметиламінометан (“Reanal”, Угорщина); дигітонін (“Merck”, Німеччина); ЕГТА (“Fluka”, Швейцарія). Інші реактиви були вітчизняного виробництва кваліфікації ч.д.а. та х.ч.

Методом лазерної кореляційної спектроскопії (ЛКС) у динаміці (протягом 15 хв) досліджували розмірні характеристики частинок в суспензіях плазматичних мембран та нано- SiO_2 до і після їх взаємодії. Дослідження виконували за допомогою лазерного кореляційного спектрометра “ZetaSizer-3” (Malvern Instrument, Велика Британія), який обладнаний корелятором “multi computing correlator, type 7032 ce”. Зразок об’ємом 1,5 мл розташовували в циліндричній скляній кюветі діаметром 10 мм, яку вміщували в лунку приладу, та проводили реєстрацію розсіяного від суспензії під кутом 90° лазерного випромінювання (використовували гелій-неоновий лазер ЛГ-111, потужність – 25 мВт, довжина хвилі – 633 нм) протягом 300-400 с. З отриманої автокореляційної функції за допомогою стандартної комп’ютерної програми PCS-Size mode v 1 розраховували функцію розподілу мікрочастинок за гідродинамічним діаметром. Суспензія плазматичних мембран містилась у середовищі такого складу (мМ): 50 NaCl, 100 KCl, 1 ЕГТА, 20 Непес-Tris-буфер (рН 7,4).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Раніше нами було показано, що для сарколеми клітин міометрія свині питомі ферментативні активності Na^+, K^+ -АТФази і Mg^{2+} -АТФази становлять (10,2±0,7) та (18,1±1,2) мкмоль P_i /мг білка за 1 год відповідно ($M \pm m$; $n=7$) [2].

Результати досліджень впливу нано- SiO_2 в різних концентраціях на активність Na^+, K^+ -АТФази та Mg^{2+} -АТФази наведено на рисунку 1. Як видно, присутність нанокремнезему сприяє підвищенню активності Na^+, K^+ -АТФази. Наприклад, нано- SiO_2 у концентраціях 0,01 та 0,1 % стимулює, порівняно з контролем (за відсутності нано- SiO_2 в середовищі інкубації), Na^+, K^+ -АТФазу на 35 та 53 % відповідно. За цих самих умов нано- SiO_2 практично не впливає на ферментативну активність Mg^{2+} -АТФази. Лише

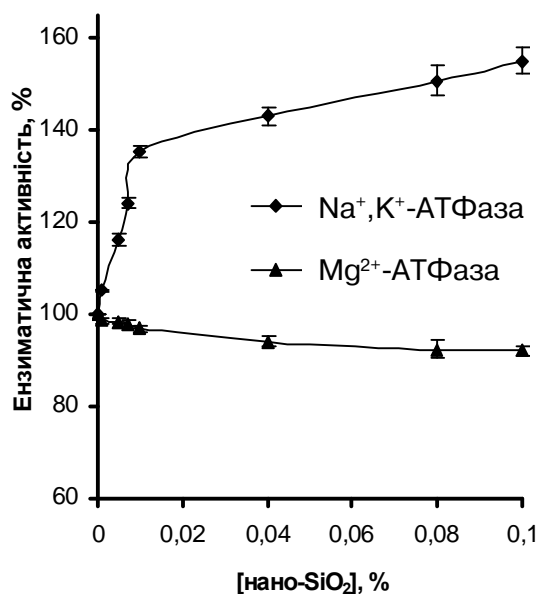


Рис. 1. Концентраційні залежності впливу нанокремнезему на активність Na⁺,K⁺-АТФази та Mg²⁺-АТФази у фракції плазматичних мембран клітин міомерія.

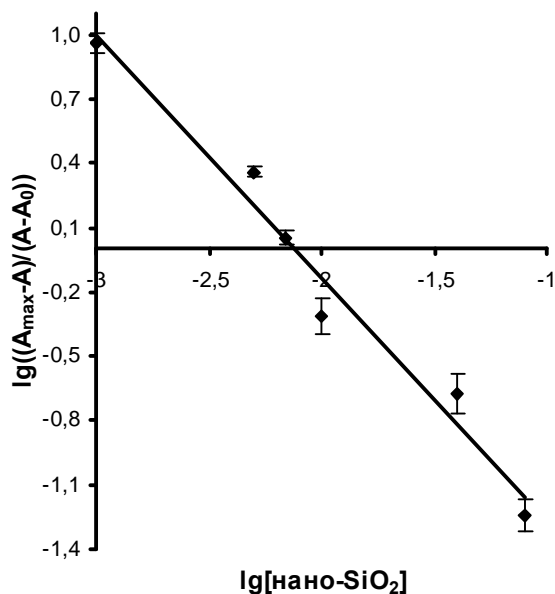


Рис. 2. Лінеаризована в координатах Хілла крива залежності Na⁺,K⁺-АТФазної активності від концентрації nano-SiO₂ (M±m; n=5).

при концентрації nano-SiO₂ 0,1 % відбувається незначне пригнічення Mg²⁺-АТФазної активності – не більше ніж на 10 % відносно контрольного значення.

Лінеаризація концентраційних залежностей ефекту nano-SiO₂ на активність Na⁺,K⁺-АТФази у координатах Хілла дала можливість встановити, що значення уявної константи активації K_a складає (0,0078±0,0005) %, а значення коефіцієнта Хілла n_H – 1,10±0,05 (M±m; n=5) (рис. 2). Отже, стимулювальний вплив nano-SiO₂ на Na⁺,K⁺-АТФазу є некооперативним: це підтверджується величиною коефіцієнта Хілла n_H, який практично дорівнює 1.

Одержані дані дещо несподівані, оскільки результати багатьох попередніх досліджень свідчать про те, що адсорбція ферментів з розчинів на носіях різної природи призводить зазвичай до часткової втрати каталітичної активності; це пояснюють адсорбцією ферменту в неактивній конформації, екранізацією його активного центру або іншими причинами [1, 5]. Отже, активуючий вплив nano-SiO₂ на каталітичну активність натрієвої помпи навряд чи є результатом їх безпосередньої взаємодії. Гіпотетично цей ефект можна пов'язати з підвищенням доступності катіонзв'язуючих центрів біомембрани для іонів Na⁺ та/чи K⁺ внаслідок її ушкодження частинками nano-SiO₂. Останнє може мати місце у зв'язку з кремнеземіндукованим мембранолізисом, який було досліджено на прикладі еритроцитів [4]. Можна припустити, що активація Na⁺,K⁺-АТФази викликана зв'язуванням додаткових іонів

натрію на відповідних центрах Na⁺,K⁺-АТФази. Підтвердженням того, що причина стимуляції активності Na⁺,K⁺-АТФази під дією nano-SiO₂ полягає у збільшенні доступності моновалентних катіонів (Na⁺, K⁺), але не іонів Mg²⁺, для мембранозв'язаного ферменту, є такий факт: збільшується саме убаїнчутливий Na⁺,K⁺,Mg²⁺-залежний ензиматичний гідроліз АТФ (забезпечується суто Na⁺,K⁺-АТФазою), але не убаїнчутливий Na⁺,K⁺-незалежний Mg²⁺-залежний гідроліз нуклеозидтрифосфату (забезпечується "базальною" Mg²⁺-АТФазою; в цьому випадку при концентрації кремнезему 0,1 % спостерігається навіть деяке гальмування ферментативної активності) (рис. 1). Для одержання більшої інформації щодо взаємодії nano-SiO₂ з плазматичною мембраною застосовано метод ЛКС.

Цим методом було показано, що вихідна суспензія nano-SiO₂ представлена двома фракціями, причому більш дисперсна (нано-розмірна) фракція дає незначний внесок за масою, але складає близько 99 % за кількістю частинок. Середній (найбільш вірогідний) гідродинамічний діаметр частинок в 0,1 % суспензії nano-SiO₂ становить (242,5±0,8) нм (n=5). Одержана за допомогою диференційного центрифугування фракція везикул плазматичної мембрани міомерія містить досить широкий набір частинок різного розміру. Проте більшість частинок має розміри в діапазоні 100-600 нм, що відповідає літературним даним [7, 10]. Частинки, що мають менший гідродинамічний діаметр та наявні у досліджуваній

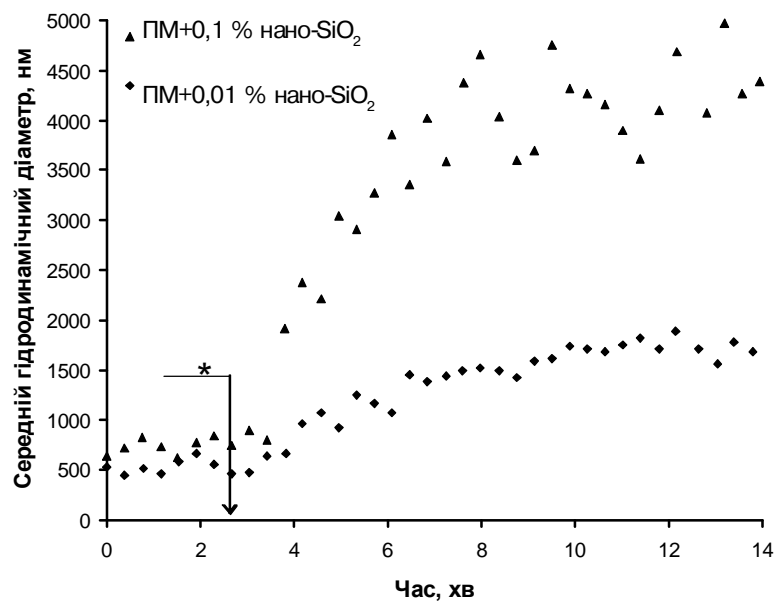


Рис. 3. Кінетика збільшення середнього гідродинамічного діаметра світлорозсіюючих частинок в результаті взаємодії плазматичних мембран (ПМ) з суспензією нанокремнезему. Реєстрація кожні 20 с (*) – момент введення нано-SiO₂.

фракції, імовірно, являють собою високомолекулярні протеїнові комплекси та невезикульовані фрагменти мембран. У незначній кількості присутні також великі частинки діаметром близько 1 мкм, якими можуть бути скупчення мітохондрій та везикул різного походження. Середній гідродинамічний діаметр везикул плазматичних мембран міометрія складає (401±17) нм (n=13).

Кінетика збільшення середнього гідродинамічного діаметра світлорозсіюючих частинок в результаті взаємодії плазматичних мембран з нано-SiO₂ залежить від концентрації кремнезему в середовищі (рис. 3). За присутності 0,01 % нано-SiO₂ спостерігається плавне зростання середнього гідродинамічного діаметра, тоді як у випадку 0,1 % відбувається його різке збільшення, причому цей показник стабілізується для обох концентрацій приблизно після 10 хв. Можливо, спочатку поверхня ве-

зикал насичується наночастинками кремнезему (саме ця фракція, на нашу думку, є відповідальною за активацію Na⁺,K⁺-АТФази), а потім з везикулами переважно взаємодіють великі, мікрометрового розміру, частинки кремнезему.

Ми вважаємо, що вищенаведені експериментальні дані можуть бути корисними при подальшому з'ясуванні механізму мембранотропної дії нанорозмірного кремнезему.

ВИСНОВКИ. 1. Нанокремнезем у діапазоні концентрацій 0,001-0,1 % у модельному інкубаційному середовищі вірогідно активує Na⁺,K⁺-АТФазу і практично не впливає на ферментативну активність Mg²⁺-АТФази у плазматичній мембрані гладеньком'язових клітин міометрія.

2. Однією з можливих причин підвищення активності Na⁺,K⁺-АТФази під дією нано-SiO₂ є збільшення доступності моновалентних катіонів (Na⁺,K⁺) до мембранозв'язаного ферменту.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Богданова Н.П. Каталитические свойства иммобилизованных ферментов: Сб. научн. тр. / Ин-т цитологии АН СССР. – 1977. – № 18. – С. 16-18.
2. Векліч Т.О., Костерін С.О. Порівняльне дослідження властивостей Na⁺,K⁺-АТФ-ази та Mg²⁺-АТФ-ази плазматичної мембрани клітин міометрія // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 2. – С. 66-75.
3. Векліч Т.О., Костерін С.О., Шинлова О.П. Катіонна специфічність системи акумуляції Ca²⁺ в мітохондріях клітин гладенького м'яза // Укр. біохім. журн. – 2002. – **74**, № 1. – С. 42-48.
4. Геращенко І.І. Мембранотропні властивості нанорозмірного кремнезему // В сб.: Поверхность /

Под ред. Н.Т. Картеля. – К.: Наук. думка, 2009. – Вып. 16 (1). – С. 288-306.

5. Геращенко І.І., Левицкий В.Ю., Можаяв В.В., Богомаз В.И. Термоинактивация трипсина и α-химотрипсина, иммобилизованных адсорбцией на высокодисперсном кремнеземе // Вестн. Моск. ун-та, Сер. 2, Химия. – 1992. – **33**, № 2. – С.173-175.

6. Геращенко І.І., Гунько В.М., Ніцак О.В. Порівняння мембранотропних властивостей силіксу й ентеросгелю // Мед. хімія. – 2009. – **11**, № 1. – С. 25-29.

7. Данилович Ю.В., Карахім С.О. Дія нітрит-аніонів і пероксиду водню на поверхневій властивості плаз-

матичної мембрани гладеньком'язових клітин // Укр. біохім. журн. – 2008. – **80**, № 5. – С. 52-61.

8. Капля А.А. Физиологическая и адаптационная значимость изоферментов Na^+, K^+ -АТФ-азы // Укр. біохім. журн. – 1998. – **70**, № 3. – С. 3-11.

9. Кондратюк Т.П., Быченко С.Ф., Прищеп Л.А. и др. Выделение и характеристика фракции плазматических мембран миомерия свиньи // Укр. біохім. журн. – 1986. – **58**, № 4. – С. 50-56.

10. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. – К.: Наукова думка, 1990. – 216 с.

11. Лопина О.Д. Взаимодействие каталитической субъединицы Na^+, K^+ -АТФазы с клеточными белками и другими эндогенными регуляторами // Биохимия. – 2001. – **66**, вып. 6. – С. 1389-1400.

12. Avkiran M., Snabaitis A.K. Regulation of cardiac sarcolemmal Na^+/H^+ exchanger activity: potential pathophysiological significance of endogenous mediators and oxidant stress // J. Tromb. Thrombolysis. – 1999. – **8**. – P. 25-32.

13. Boldyrev A.A. Na^+, K^+ -ATPase: 40 years of investigations // Membr. Cell. Biol. – 2000. – **13**, № 6. – P. 715-719.

14. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. – 1976. – **72**. – P. 248-282.

15. Flynn E.R.M., Bradley K.N., Muir T.C., McCarron J.G. Functionally separate intracellular Ca^{2+} stores in smooth muscle // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, № 39. – P. 36411-36418.

16. Greger R. Physiology of renal sodium transport // Am. J. Med. – 2000. – **319**. – P. 51-62.

17. Rathbun W., Betlach V. Estimation of enzymically produced orthophosphate in the presence of cysteine and adenosine triphosphate // Anal. Biochem. – 1969. – **28**, № 1-3. – P. 436-445.

18. Valente R.C., Capella L.S., Monteiro R.Q. et al. Mechanisms of ouabain toxicity // FASEB J. – 2003. – **17**, № 12. – P. 1700-1702.

19. Wang H., Haas M., Liang M. et al. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na^+/K^+ -ATPase // J. Biol. Chem. – 2004. – **279**, № 17. – P. 17250-17259.

Т.А. Веклич¹, А.А. Шкрабак¹, И.И. Геращенко², В.Ф. Горчев¹, С.А. Костерин¹
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ А.В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАИНЫ¹, КИЕВ
ИНСТИТУТ ХИМИИ ПОВЕРХНОСТИ ИМЕНИ А.А. ЧУЙКО НАН УКРАИНЫ², КИЕВ

ВЛИЯНИЕ НАНОРАЗМЕРНОГО КРЕМНЕЗЕМА НА Na^+, K^+ -АТФазную АКТИВНОСТЬ В ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫХ КЛЕТОК

Резюме

Изучено влияние наноразмерного кремнезема на Na^+, K^+ -АТФазную и “базальную” Mg^{2+} -АТФазную ферментативную активность в плазматической мембране гладкомышечных клеток миомерия *in vitro*. Установлено, что нанокремнезем в диапазоне концентраций от 0,001 до 0,1 % достоверно стимулирует активность Na^+, K^+ -АТФазы и практически не влияет на ферментативную активность Mg^{2+} -АТФазы. Адсорбционное взаимодействие частиц нанокремнезема с плазматическими мембранами, результатом которого может быть изменение активности мембраносвязанных ферментов, подтверждено методом лазерной корреляционной спектроскопии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: наноразмерный кремнезем (нано- SiO_2), Na^+, K^+ -АТФаза, Mg^{2+} -АТФаза, ферментативный гидролиз АТФ, плазматическая мембрана, миомерий, гладкомышечные клетки, лазерная корреляционная спектроскопия.

T.O. Veklich¹, O.A. Shkrabak¹, I.I. Herashchenko², V.F. Horchev¹, S.O. Kosterin¹
O.V. PALLADIN INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE¹, KYIV
O.O. CHUIKO INSTITUTE OF SURFACE CHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE 2, KYIV

IMPACT OF NANOSIZED SILICA ON ACTIVITY OF Na^+, K^+ -ATPase IN PLASMATIC MEMBRANE OF CELLS OF SMOOTH MUSCLES

Summary

The impact of nanosized silica on enzymatic activity of Na^+, K^+ -ATPase and Mg^{2+} -ATPase in plasmatic membrane of the cells of smooth muscles of miometrium *in vitro* has been studied. There have been ascertained the nanosized silica in contents of 0,001 to 0,1 % reliably activates the Na^+, K^+ -ATPase and practically does not impact on the activity of Mg^{2+} -ATPase. Adsorptive interaction of the particles of nanosized silica with the plasmatic membranes which causes the change of activity of mambrane-connected enzymes have been confirmed by the photon correlation spectroscopy measurements.

KEY WORDS: nanosized silica (nano- SiO_2), Na^+, K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase, enzymatic hydrolysis of ATP, plasmatic membrane, miometrium, cells of smooth muscles, photon correlation spectroscopy.

Отримано 29.05.10

Адреса для листування: І.І. Геращенко, вул. Драгоманова, 5, кв. 223, Київ, 02068, Україна.

ВЗАЄМОДІЯ ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ EGR-1 ТА SP1 В ПАТОГЕНЕЗІ ЗАПАЛЬНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ КИШЕЧНИКА

Вперше показано збільшення експресії цинкзв'язаного транскрипційного фактора Egr-1 та зменшення – Sp1 в патогенезі експериментального виразкового коліту, спричиненого 6 % розчином йодоацетаміду, в щурів. Розвиток йодоацетамідвикликаного виразкового коліту пов'язаний з підвищенням ДНК-зв'язуючої активності Egr-1 і змінами ступеня міжбілкової взаємодії між Egr-1 та Sp1 в слизовій оболонці товстої кишки тварин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: Egr-1, Sp1, запальні захворювання кишечника, виразковий коліт.

ВСТУП. В останні роки великого значення надають ролі ангиогенезу та проангіогенних факторів у патогенезі запальних захворювань кишечника (ЗЗК), до яких належать виразковий коліт та хвороба Крона. Клінічні та експериментальні дослідження показали збільшення кровоносних мікросудин у слизовому та підслизовому шарах кишечника при його запальних захворюваннях [5, 6], а також значне підвищення рівня проангіогенних факторів: фактора росту кровоносних судин (VEGF) [8, 10], фактора росту фібробластів (bFGF) [10], тромбоцитарного фактора росту (PDGF) [10, 20]. Більш того, пригнічення активності VEGF мало позитивний ефект на процеси загоєння ураження при виразковому коліті. Лікування пацієнтів із хворобою Крона потужним антиангіогенним препаратом талідамідом було асоційоване зі зниженням рівня прозапальних медіаторів TNF- α та інтерлейкіну-12 [3]. У пацієнтів із хворобою Крона, які отримували терапію з анти-TNF- α антитілом (Інфліксімаб), спостерігали швидке та стійке зниження рівня VEGF та bFGF [7].

Транскрипційний фактор Egr-1 (також відомий як Krox-24, NGFI-A, zif268) – білок “ранньої відповіді”, який відіграє фундаментальну роль в активації експресії проангіогенних факторів у відповідь на оксидативний стрес, гіпоксію, іонізуюче випромінювання і механічне напруження [9, 12] та запускається MAP-кіназним шляхом трансдукції сигналу [19]. ДНК-зв'язуючий домен Egr-1 містить три “цинкових пальці”, які стабілізовані координаційними

зв'язками між двома залишками цистеїну та гістидину і розпізнають послідовність ДНК ГЦГГ/ТГГГЦГ. Egr-1 здатний трансактивувати гени багатьох проангіогенних факторів (bFGF, PDGF-A, PDGF-B, VEGF та VEGF рецептор-1/Flt1) шляхом безпосередньої взаємодії з ДНК-зв'язуючим доменом проксимальної промоутерної ділянки гена чи шляхом міжбілкової взаємодії з іншими транскрипційними факторами [13, 17, 22]. Показано, що зв'язуючий домен Egr-1 частково перекривається зі зв'язуючим доменом іншого цинкзв'язаного транскрипційного фактора Sp1 в спільній (-ГГГЦГГ-) зоні промоутера [19]. У ході досліджень *in vitro* із застосуванням рекомбінантних протеїнів було встановлено, що ці транскрипційні фактори можуть взаємозаміщувати один одного в промоутерній ділянці залежно від їх концентрації в ядрі ендотеліальних клітин, а також афінності до місця зв'язування [12]. Так, дослідження механізму трансактивації гена PDGF-A в культурі ендотеліальних клітин показали, що пошкодження чи дія інших факторів росту викликають швидке підвищення рівня Egr-1, який витісняє Sp1 з промоутерної ділянки та збільшує транскрипцію. Автори зробили висновки, що Sp1 відіграє роль у регуляції конститутивної експресії, тоді як Egr-1 – індукційної [11, 13]. Shi Q. та співавт. [18] показали провідну роль Sp1 в конститутивній активності VEGF промоутера.

Беручи до уваги той факт, що порушення оксидантного балансу [15] та спотворення процесу ангиогенезу [5, 6] в стінках кишечника є патогенетичними факторами при запальних захворюваннях кишечника, ми припусти-

© Г.М. Толстанова, Л.І. Остапченко, 2010.

Медична хімія – т. 12, № 3, 2010

ли, що розвиток уражень товстої кишки при 3ЗК асоційований зі змінами експресії та транскрипційної активності Egr-1 і його взаємодії з Sp1. Тому метою досліджень було визначити зміни експресії Egr-1 та Sp1, а також рівень зв'язування з ДНК і ступінь їх взаємодії в різні терміни експериментального коліту.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на щурах-самках лінії Sprague-Dawley масою 160-200 г. Виразковий коліт викликали шляхом одноразового ректального введення (7 см від анального отвору) 0,1 мл 6 % розчину йодоацетаміду (Sigma, США), розчиненого в 1 % розчині метилцелюлози (Sigma, США), за допомогою гумового катетера S8 (Rusch, Німеччина) [16]. Тваринам контрольної групи вводили 0,1 мл 1 % розчину метилцелюлози. Щурів умертвляли шляхом інгаляції з CO₂ та наступною цервікальною дислокацією через 0,5, 1, 2, 6, 24 год і 3, 7 днів після введення йодоацетаміду чи метилцелюлози. Потім видаляли ділянку товстої кишки довжиною 7 см від анального отвору та відразу занурювали її в рідкий азот.

Ізольовану ділянку товстої кишки гомогенізували в лізуючому буфері з додаванням інгібітора протеїназ (Sigma, США). Концентрацію загального білка визначали за методом Бредфорда з використанням набору "Bio-Rad для білкового аналізу" (Bio-Rad, США). Розділення та визначення білка (100 мкг заг.білка/зразок) методом Вестерн блот проводили в 10 % SDS поліакриламідному гелі з наступним перенесенням на Hybond-ECL нітроцелюлозну мембрану (Amersham Biosciences, США) відповідно до стандартного протоколу фірми Bio-Rad. Антитіла проти Egr-1 (1:500; Santa-Cruz Biotech., США) та Sp1 (PEP2) (1:500; Santa-Cruz Biotech., США) застосовували для визначення рівня відповідних білків у стінці товстої кишки з наступною інкубацією із вторинним HRP-кон'югованим антитілом (1:3000; Santa-Cruz Biotech., США). Експресію протеїнів GAPDH (анти GAPDH антитіло 1:3000; EnCor Biot, США) використовували як контроль кількості загальних білків у зразку. Візуалізацію Вестерн блот проводили ECL-реагентом (Amersham Biosciences, США).

Для визначення ступеня транскрипційної активності Egr-1, а також його взаємодії з Sp1 в слизовій оболонці товстої кишки щурів на фоні йодоацетамідвикликаного виразкового коліту використовували TranSignal TF-TF Interaction Assay Kit (Panomics Inc., США) згідно з інструкцією виробника. Основний принцип цього аналізу базується на нековалентному

зв'язуванні послідовності ДНК з певним транскрипційним фактором. Для проведення аналізу 100 мкг екстракту ядерних білків слизової оболонки товстої кишки щурів, які були ізольовані за допомогою набору "Nuclear Extraction Kit" (Panomics Inc., США), інкубували впродовж 30 хв (T=15 °C) з біотинміченою двоцукровою послідовністю олігонуклеотидів (кДНК), що відповідає cis-елементам Egr-1 та Sp1. Далі отримані комплекси (кДНК/білок) імунопреципітували за допомогою 2 мкг/зразок антитіла проти Egr-1 (Santa-Cruz Biotechnology, Inc, США) та ізолювали його з використанням протеїн G Dynabeads (Invitrogen, США). Після відмивання вільних cis-елементів та протеїнів ізольований комплекс (антитіла проти Egr-1/білок/кДНК) піддавали елюції, після чого мічені кДНК-проби гібридували на мембрані TranSignal™ Protein/DNA Array – I. Візуалізацію інтенсивності сигналу ДНК-проб проводили за допомогою кон'югату стрептавідину з пероксидазою хрому з наступною інкубацією з ECL-реагентом (Amersham Biosciences, США).

Інтенсивність сигналу визначали за допомогою денситометричного аналізу з використанням програмного забезпечення Phoretix 1D.

Статистичну обробку результатів проводили за t-тестом Стюдента. Дані представлено у вигляді M±SD, n – кількість тварин у групі. Статистично значущою для всіх показників вважали різницю p<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У даній роботі ми використовували модель хімічновикликаного виразкового коліту, спричиненого 6 % розчином йодоацетаміду. Йодоацетамід – цитотоксичний алкілятор, що реагує із сульфгідрильними (SH) групами за цистеїновими залишками протеїнів та призводить до формування S-ацетамід тіоефір аддуктів. Важливо зауважити, що ковалентне зв'язування йодоацетаміду з протеїнами та формування аддуктів безпосередньо не викликають смерті клітини. Спричинений йодоацетамідом цитотоксичний вплив опосередковується через виснаження глутатіону, оксидативний стрес та пероксидацію ліпідів [4]. Відповідно, цитотоксична активність йодоацетаміду блокується відновниками тіолу, зокрема дитіотріолом, десфероксамідом, без впливу на зв'язування йодоацетаміду з протеїнами [14]. Крім того, ми та інші показали підвищення проникності кровоносних судин, а також експресії проангіогенних факторів VEGF, PDGF, bFGF у слизовій оболонці товстої кишки на фоні йодоацетамідвикликаного виразкового коліту [1, 2, 20].

З огляду на це, розвиток уражень при йодоацетамідвикликаному виразковому коліті достатньою мірою відображає патогенетичні процеси розвитку коліту в людей і є адекватною моделлю для проведення даних досліджень.

У нашій роботі ректальне введення йодоацетаміду викликало швидке підвищення експресії протеїну Egr-1 в слизовій оболонці товстої кишки щурів. Так, вже через 0,5 год цей рівень був в 1,9 раза вищим за показники контрольної групи тварин, які отримували ректально 1 % розчин метилцелюлози. Через 1 та 2 год, коли на гістологічних зрізах спостерігався периваскулярний набряк (гостре запалення) [16, 21], експресія була збільшена, відповідно, в 4,4 та 5,2 раза, через 6 год (поверхневі ерозії) – в 4,7 раза. На 3-й та 7-й дні після введення йодоацетаміду, що гістологічно відповідає початку формування грануляційної тканини з ознаками неоангіогенезу [16], експресія Egr-1 була зменшена порівняно з гострою фазою розвитку уражень (0,5-6 год), але залишалась вищою в 3,3 та 2,3 раза відповідно за показники в контрольній групі (рис. 1, А).

Протилежна картина спостерігалася в експресії Sp1. Введення йодоацетаміду викликало швидке короткочасне підвищення експресії протеїну Sp1 в 1,4 раза через 0,5 год. Уже через 1 год цей показник зменшився в 1,3 раза. Загострення йодоацетамідвикликаного коліту далі супроводжувалось зменшенням експресії Sp1 і досягало максимального зниження на 3-й день (рис. 1, Б).

Зважаючи на те, що ДНК-зв'язуюча активність транскрипційних факторів не завжди корелює з рівнем їх експресії, далі ми провели TranSignal TF-TF Interaction Assay-1. Даний метод дозволяє визначити ступінь зв'язування Egr-1 з Egr-1 cis-елементом та рівень його взаємодії з іншими транскрипційними факторами, ДНК-проби яких локалізовані на тест-мембрані TranSignal™ Protein/DNA Array. За нормальних умов (контрольна група щурів) Egr-1, локалізований в ядрі, перебував у зв'язаному стані з ДНК (рис. 2). Введення йодоацетаміду та асоційований з ним розвиток запалення в стінці товстої кишки викликали значне підвищення транскрипційної активності

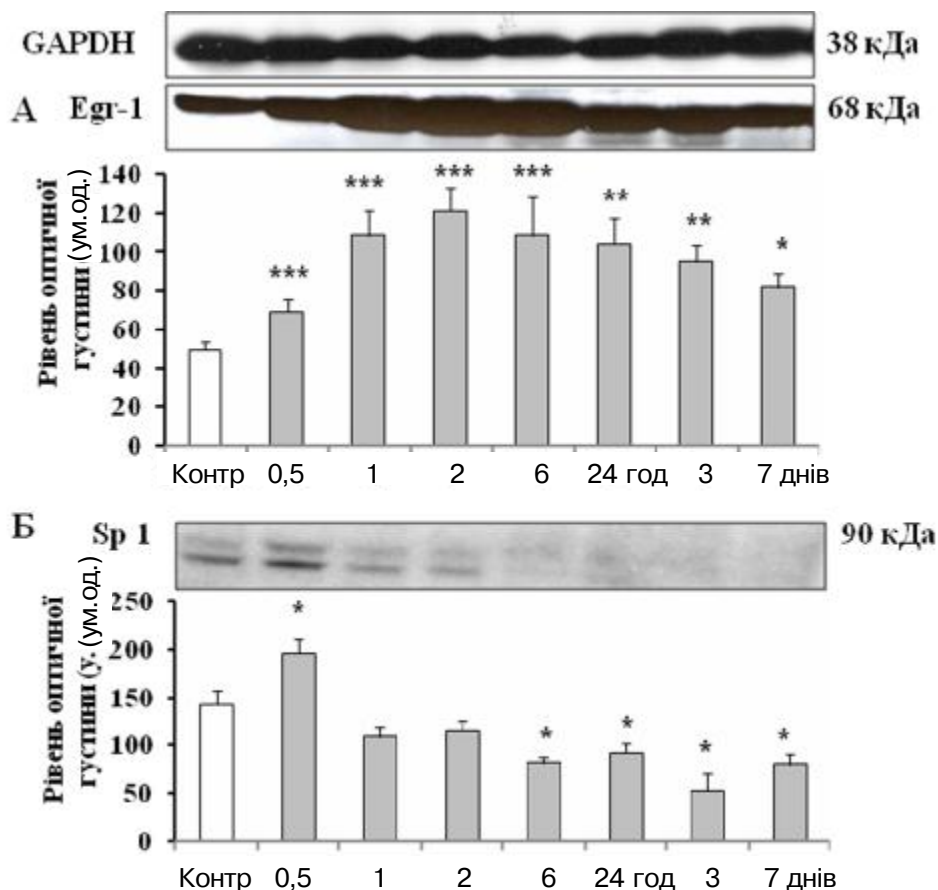


Рис. 1. Експресія протеїнів Egr-1 (А) та Sp1 (Б) у слизовій оболонці товстої кишки щурів у нормі (Конт.) та в різні терміни розвитку виразкового коліту, спричиненого йодоацетамідом (0,5, 1, 2, 6, 24 год, 3 та 7 днів). Вестерн блот, n=3, M±SD. * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001 відносно показників у контрольній групі щурів (Конт.).

Egr-1 вже через 0,5 год, що проявилось збільшенням його зв'язування з ДНК в 1,6 раза до проб з вихідним рівнем ДНК (1:1) та в 9,6 раза до ДНК-проб, розведених у 10 разів (1:10). Через 6 год, коли спостерігались ознаки ерозивних процесів, ступінь транскрипційної активності Egr-1 не зменшився. Так, його зв'язування до проб з вихідним рівнем ДНК (1:1) було в 1,9 раза вищим за контрольний рівень та в 7,3 раза до ДНК-проб, розведених у 10 разів (1:10).

Взаємодія між транскрипційними факторами Egr-1 та Sp1 була показана в регуляції експресії різних генів, оскільки зв'язуючі ДНК-домени цих факторів частково перекриваються. Надмірна експресія чи активація одного фактора призводить до збільшення його концентрації в клітині з наступним витісненням "суперника" з промоторної ділянки гена [13, 19]. Zhang X. та Liu Y. [23] в дослідженнях на куль-

турі епітеліальних клітин сечового міхура показали, що оксидативний стрес викликає посилення міжбілкової взаємодії між Egr-1 та Sp1. Формування комплексу Sp1/Egr-1 зменшує кількість вільних молекул протеїну Sp1 і, таким чином, пригнічує його транскрипційну активність.

Ми показали, що за нормальних умов (контрольна група щурів) (рис. 2) Egr-1 взаємодіє з Sp1, який одночасно був зв'язаний з відповідним *cis*-елементом. Введення йодоацетаміду викликало швидке збільшення міжбілкової взаємодії між Egr-1 та Sp1 (0,5 год), що асоціювалось із зростанням концентрації обох протеїнів у клітині (рис. 1). Через 6 год дії йодоацетаміду комплекс Egr-1/Sp1 розпався, що збіглось у часі зі зниженням рівня Sp1 в слизовій оболонці товстої кишки щурів, тоді як концентрація Egr-1 та ступінь його зв'язування з ДНК залишились значно підвищеними.

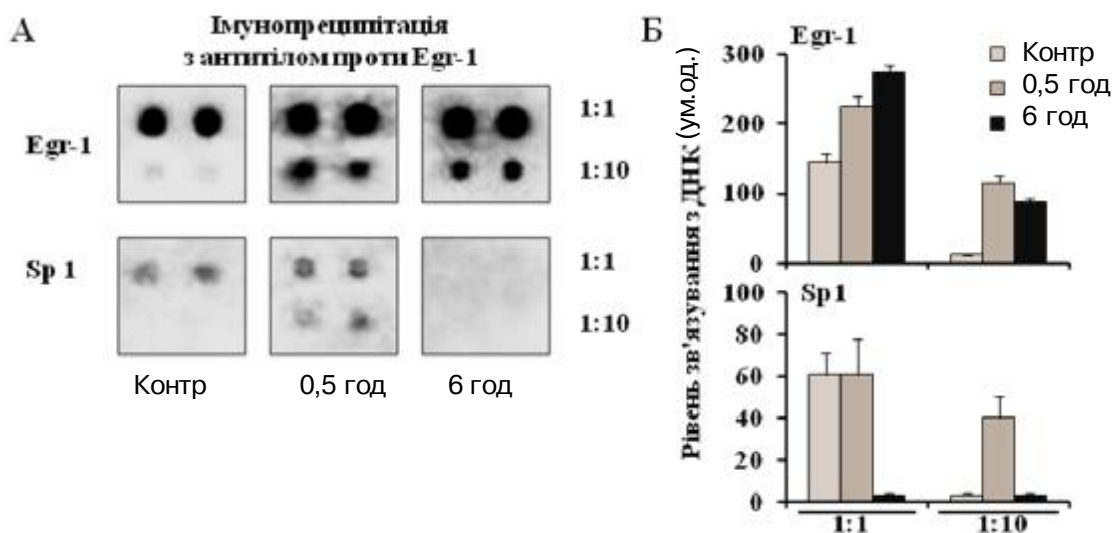


Рис. 2. Зв'язування Egr-1 з Egr-1 *cis*-елементом та рівень його взаємодії з транскрипційним фактором Sp1 у нормі (Конт.) та в різні терміни розвитку виразкового коліту, спричиненого йодоацетамідом (0,5 та 6 год). (А) Аналіз проводили з використанням мембрани TranSignal™ Protein/DNA Array, яка містить парні ДНК-проби до *cis*-елементів Egr-1 та Sp1: I ряд – вихідна кількість ДНК (1:1), II ряд – ДНК розведена в 10 разів (1:10). (Б) Денситометричний аналіз рівня зв'язування з ДНК. n=2.

Таким чином, розвиток запалення з наступним формуванням ерозій та виразок на фоні йодоацетамідвикликаного виразкового коліту асоційований зі збільшенням індукбельної транскрипційної активності Egr-1, частково за рахунок зменшення Sp1 транскрипційної активності.

ВИСНОВКИ. 1. Показано збільшення експресії транскрипційного фактора Egr-1 та

зменшення – Sp1 в патогенезі експериментального виразкового коліту в щурів.

2. Розвиток йодоацетамідвикликаного виразкового коліту пов'язаний з підвищенням ДНК-зв'язуючої активності Egr-1.

3. Встановлено міжбілкову взаємодію між транскрипційними факторами Egr-1 та Sp1 в слизовій оболонці товстої кишки щурів, ступінь якої змінюється при розвитку виразкового коліту, спричиненого йодоацетамідом.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Толстанова Г.М., Берегова Т.В., Остапченко Л.І. Зміни експресії васкулярного ендотеліального фактору росту (VEGF) та VEGFR-2 рецептора при експериментальних запальних захворюваннях кишечника // Фізика живого. – 2009. – **17**, № 1. – С. 150-154.
2. Толстанова Г.М., Хоменко Т.А., Остапченко Л.І. та ін. Роль src тирозинкіназ в підвищенні проникності кровоносних судин при експериментальному виразковому коліті // Укр. біохім. журн. – 2010. – **81**, № 1. – С. 117-122.
3. Bauditz J., Wedel S., Lochs H. Thalidomide reduces TNF α and interleukin 12 productions in patients with chronic active Crohn's disease // Gut. – 2002. – **2**. – P. 196-200.
4. Chen Q., Stevens J.L. Inhibition of iodoacetamide and t-butylhydroperoxide toxicity in LLC-PK1 cells by antioxidants: a role for lipid peroxidation in alkylation induced cytotoxicity // Arch. Biochem. Biophys. – 1991. – **284**, № 2. – P. 422-430.
5. Chidlow JH.Jr., Langston W., Greer J.J.M. et al. Differential angiogenic regulation of experimental colitis // Am. J. Pathol. – 2006. – **169**. – P. 2014-2030.
6. Danese S., Sans M., Motte C.D.L. et al. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis // Gastroenterology. – 2006. – **130**. – P. 2060-2073.
7. Di Sabatino A., Ciccioppo R., Benazzato L. et al. Infliximab downregulates basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in Crohn's disease patients // Aliment. Pharmacol. Ther. – 2004. – **19**. – P. 1019-1024.
8. Griga T., Tromm A., Spanger J., May B. Increased serum level of vascular endothelial growth factor in patients with inflammatory bowel disease // Scand. J. Gastroenterol. – 1998. – **33**. – P. 504-508.
9. Huang R.P., Adamson E.D. Characterization of the DNA-binding properties of the early growth response-1 (Egr-1) transcription factor: evidence for modulation by a redox mechanism // DNA Cell Biol. – 1993. – **12**, № 3. – P. 265-273.
10. Kanazawa S., Tsunoda T., Onuma E. et al. VEGF, basic-FGF, and TGF- β in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation // Am. J. Gastroenterol. – 2001. – **96**. – P. 822-828.
11. Khachigian L.M., Collins T. Inducible Expression of Egr-1-Dependent Genes A Paradigm of Transcriptional Activation in Vascular Endothelium // Circulation Research. – 1997. – **81**. – P. 457-461.
12. Khachigian L.M., Lindner V., Williams A.J., Collins T. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury // Science. – 1996. – **271**, № 5254. – P. 1427-1431.
13. Khachigian L.M., Williams A.J., Collins T. Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal PDGF-A promoter in cultured vascular endothelial cells // J. Biol. Chem. – 1995. – **270**. – P. 27679-27686.
14. Liu H., Lightfoot R., Stevens J.L. Activation of heat shock factor by alkylating agents is triggered by glutathione depletion and oxidation of protein thiols // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, № 9. – P. 4805-4812.
15. Rezaie A., Parker R.D., Abdollahi M. Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause? // Dig. Dis. Sci. – 2007. – **52**, № 9. – P. 2015-2021.
16. Satoh H., Sato F., Takami K., Szabo S. New ulcerative colitis model induced by SH blockers in rats and the effects of antiinflammatory drugs on the colitis // Jpn. J. Pharmacol. – 1997. – **73**. – P. 299-309.
17. Shimoyamada H., Yazawa T., Sato H. Early Growth Response-1 Induces and Enhances Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression in Lung Cancer Cells // Am. J. Pathol. – 2010. – May 20. [Epub ahead of print].
18. Shi Q., Le X., Abbruzzese J.L. et al. Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma // Cancer Research. – 2001. – **61**. – P. 4143-4154.
19. Silverman E.S., Collins T. Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology // Am. J. Pathol. – 1999. – **154**, № 3. – P. 665-670.
20. Szabo S., Sandor Z. Basic fibroblast growth factor and PDGF in GI diseases // Baillieres. Clin. Gastroenterol. – 1996. – **10**, № 1. – P. 97-112.
21. Tolstanova G., Deng X.M., Khomenko T. et al. Endothelial damage and increased colonic vascular permeability precede epithelial "barrier" dysfunction in the development of experimental ulcerative colitis // Gastroenterology – 2009. – **136**, № 5. – P. 774.
22. Yan S.F., Fujita T., Lu J. et al. Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress // Nature Medicine. – 2000. – **6**. – P. 1355-1361.
23. Zhang X., Liu Y. Suppression of HGF receptor gene expression by oxidative stress is mediated through the interplay between Sp1 and Egr-1 // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. – 2003. – **284**, № 6. – P. 1216-1225.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ EGR-1 И SP1 В ПАТОГЕНЕЗЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА

Резюме

Впервые показано увеличение экспрессии цинк-связанного транскрипционного фактора *Egr-1* и уменьшение – *Sp1* в патогенезе экспериментального язвенного колита, вызванного 6 % раствором йодоацетамида, у крыс. Развитие йодоацетамид-вызванного язвенного колита ассоциируется с повышением ДНК-связывающей активности *Egr-1* и изменениями степени межбелкового взаимодействия между *Egr-1* и *Sp1* в слизистой оболочке толстой кишки животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **Egr-1, Sp1, воспалительные заболевания кишечника, язвенный колит.**

H.M. Tolstanova, L.I. Ostapchenko
TARAS SHEVCHENKO KYIV NATIONAL UNIVERSITY

INTERACTION OF TRANSCRIPTION FACTORS EGR-1 AND SP1 IN PATHOGENESIS OF INFLAMMATORY BOWELS DISEASES

Summary

For the first time upregulation of zinc-finger transcription factors *Egr-1* and downregulation of *Sp1* were shown during experimental ulcerative colitis induced by 6 % iodoacetamide in rats. Development of iodoacetamide-induced ulcerative colitis was associated with increased *Egr-1* DNA-binding activity and changes in protein-protein interaction between *Egr-1* and *Sp1* in rat colonic mucosa.

KEY WORDS: **Egr-1, Sp1, inflammatory bowels diseases, ulcerative colitis.**

Отримано 05.07.10

Адреса для листування: Г.М. Толстанова, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64, Київ-33, 01033, Україна.

ФАРМАКОЛОГІЧНИЙ АНАЛІЗ УЧАСТІ МОНОАМІНЕРГІЧНИХ СИСТЕМ У РЕАЛІЗАЦІЇ АНТИНОЦИЦЕПТИВНОЇ ДІЇ ПІРОДАЗОЛУ ПОРІВНЯНО З КЕТОРОЛАКОМ НА МОДЕЛІ ВІСЦЕРАЛЬНОГО БОЛЮ ТА СПИНАЛЬНОМУ РІВНІ

На моделях оцтовокислих "корчів" і "tail-flick" було вивчено здатність резерпіну, норадреналіну, серотоніну, 5-гідрокси-L-триптофану L-ДОФА впливати на анальгезивний ефект кеторолаку і піродазолу. Виявлено зниження функціональної активності моноамінергічних систем, що впливають на анальгезію піродазолу і кеторолаку. Отримані дані зумовлені особливостями дії препаратів на ці системи та особливостями їх функціонування при різних видах болю.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: піродазол, кеторолак, ноцицепція, норадреналін, дофамін, серотонін.

ВСТУП. Больові синдроми – одна з найбільш розповсюджених патологій, які є симптомом багатьох захворювань. На сьогодні проблему лікування болю не можна вважати вирішеною. На даний час існує багато методів для лікування болю, однак одним з найбільш розповсюджених є фармакотерапія [1, 4]. На жаль, досі немає знеболювального засобу, який би оптимально відповідав вимогам клініки [7]. Тому ведеться активний пошук нових знеболювальних засобів та вивчаються механізми їх дії [5, 7, 9, 10].

В Інституті фармакології та токсикології АМН України виконують комплексні наукові дослідження з вивчення механізмів дії знеболювальних препаратів. Із даних літератури відомо, що катехоламінергічні механізми беруть участь у формуванні реакції на біль і належать до ендогенних антиноцицептивних систем [2, 3, 8]. Знеболювальна активність ряду препаратів пов'язана з впливом на адренергічну систему. Виявлено анальгетичну активність інгібіторів моноамінооксидази (фенелзин, трагіцилципрамін) при атипічному лицьовому болю та при інших видах хронічного болю. Агоністи альфа-2-адренорецепторів (клонідин, тизанідин) ефективні в разі появи хронічного головного болю, неонкогенного болю, невропатичного болю при онкологічних захворюваннях. Адренергічний компонент присутній у знеболювальній активності як наркотичних анальгетиків (трамадол та ін.), так і ненаркотичних (амізон, парацетамол) [8].

© О.Є. Ядловський, 2010.

Метою нашого дослідження було вивчення на моделі вісцерального болю адренергічного компонента знеболювання нового неопіоїдного анальгетика піродазолу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Фармакологічний аналіз участі моноамінергічних систем в дії кеторолаку був здійснений в дослідках на білих мишах-самицях масою, відповідно, (20 ± 2) г (розведення віварію Інституту фармакології та токсикології АМН України). У дослідках використовували субстанцію кеторолаку (ФФ "Здоров'я", Харків, Україна).

Як фармакологічні аналізатори моноамінергічних систем застосовано резерпін (2,5 мг/кг, внутрішньочеревно), норадреналін (15 мкг/100 г, інтрацеребрально), серотонін (50 мкг/100 г, інтрацеребрально), 5 гідрокси-L-триптофан (50 мг/кг, внутрішньочеревно), L-ДОФА (100 мг/кг, внутрішньочеревно). При цьому шляхом використання резерпіну досягали зниження функціональної активності моноамінергічних систем за рахунок спустошення лабільних депо моноамінів у різних тканинах, у тому числі в структурах ЦНС. Застосуванням агоністів рецепторів (норадреналін, серотонін) або їх попередників (попередник дофаміну – L-ДОФА, попередник серотоніну – 5 гідрокси-L-триптофан) досягали підвищення функціональної активності моноамінергічних систем. Про участь моноамінергічних систем в анальгезивній дії неопіоїдних анальгетиків (кеторолак, піродазол) судили за здатністю вибраних аналізаторів модулювати антиноцицептивну дію препаратів.

Оцінку знеболювальної активності проводили на моделі хімічної ноцицептивної стимуляції на моделі вісцерального болю ("корчі", викликані оцтовою кислотою) [12]. Піродазол вводили мишам внутрішньошлунково у вигляді водно-спиртової емульсії у середньо-ефективній дозі (ED_{50}), яка складала 0,7 мг/кг. Препарат порівняння кеторолак вводили внутрішньошлунково у вигляді водного розчину в ED_{50} , яка становила 0,7 мг/кг. Оцтовокислі "корчі" моделювали шляхом внутрішньочеревного введення розчину оцтової кислоти з розрахунку 0,1 мл/10 г маси тіла. Порівнювали число "корчів" у тварин дослідних та контрольних груп. Як критерій оцінки ефективності використовували відсоток інгібіції числа "корчів" у тварин.

Оцінку спинального рівня анальгезії проводили методом "tail-flick" на приладі "Tail-flick unit" (Ugo Basil, Італія) [11]. Вимірювання проводили через 30, 60, 90 та 120 хв після введення препаратів. Статистичне опрацювання даних здійснювали за [6].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані експериментальні дані наведено у таблицях 1 і 2.

Як показали результати експериментів (табл. 1), на моделі вісцерального болю кеторолак та піродазол при внутрішньошлунковому введенні мишам проявляли значний та близький за величиною анальгезивний ефект (інгібували число "корчів" на 42,6-59,9 %). Резерпін в тест-дозі 2,5 мг/кг (внутрішньочеревно) суттєво перевищував за анальгезивною активністю досліджувані неопіодні анальгети-

ки (інгібував число "корчів" на 93 %). При введенні піродазолу тваринам на фоні резерпіну реєстрували анальгезивний ефект, близький до такого, як при дії резерпіну, тобто резерпін і піродазол на даній моделі ноцицептивної стимуляції можуть виступати антагоністами. Разом із тим, при поєднаному використанні кеторолаку і резерпіну мало місце підвищення анальгезивного ефекту.

На відміну від результатів, отриманих на моделі вісцерального болю, при термічній ноцицептивній стимуляції (метод "tail-flick") резерпін антиноцицептивної дії не проявляв та одночасно нівелював анальгезивні ефекти кеторолаку і піродазолу.

У цілому можна зробити висновок, що зниження функціональної активності моноамінергічних систем супроводжувалось модуляцією неопіодної анальгезії. Отже, моноамінергічні механізми роблять певний внесок в антиноцицептивну дію вказаних препаратів.

При активації адренергічних систем мозку інтрацеребральним введенням реєстрували його короткочасний анальгезивний ефект в тесті "tail-flick" (табл. 2). На цій моделі ноцицептивної стимуляції, яка відображала перцептуальний компонент больової реакції, поєднане використання норадреналіну та піродазолу супроводжувалось усуненням як анальгезивного ефекту даних препаратів, так і ефекту норадреналіну. Поряд із цим, в даному тесті введення кеторолаку після інтрацеребрального введення норадреналіну супроводжувалось ефектом, близьким до сумачії. Крім того, за даних умов експерименту

Таблиця 1 – Вплив модуляторів адренергічної системи на анальгезивну активність кеторолаку і піродазолу на моделі вісцерального болю ("корчі", викликані оцтовою кислотою)

Група дослідів	Кількість "корчів"		Відсоток інгібіції числа "корчів"
	$M_k \pm m, n=20$	$M_d \pm m, n=6$	
Резерпін	35,70±3,97	2,50±1,29	-93,1*
Кеторолак	35,70±3,97	20,50±3,87	-42,6*
Резерпін+кеторолак	35,70±3,97	0,67±0,32	-92,1***
Піродазол	35,70±3,97	14,30±3,87	-59,9*
Резерпін+піродазол	35,70±3,97	2,66±1,13	-92,5*
L-ДОФА	35,70±3,97	17,50±2,42	-51,0*
L-ДОФА+кеторолак	35,70±3,97	14,20±3,71	-60,3*
L-ДОФА+піродазол	35,70±3,97	15,00±5,97	-58,0*
5-гідрокси-L-триптофан	35,70±3,97	14,80±3,87	-58,5*
5-гідрокси-L-триптофан+кеторолак	35,70±3,97	20,50±3,87	-42,6*
5-гідрокси-L-триптофан+піродазол	35,70±3,97	5,67±3,71	-84,1***

Примітка. M_k – число "корчів" у тварин контрольної групи (введення розчинника); M_d – число "корчів" у тварин дослідної групи; * – статистично достовірні відмінності порівняно з контролем ($p \leq 0,05$); ** – статистично достовірні відмінності порівняно з групою тварин, які отримували резерпін.

Таблиця 2 – Вплив резерпіну на анальгезивну активність кеторолаку і піродазолу в тесті “tail-flick”

Група дослідів, кількість тварин у групі	Латентний період реакції				
	вихідне значення, $M \pm m$, с	відсоток зміни щодо вихідного через:			
		30 хв	60 хв	90 хв	120 хв
Резерпін, n=9	5,82±1,69	-5,8	-7,4	+29,1	+29,0
Кеторолак, n=8	5,04±0,26	+48,2*	+18,7	+14,9	+33,7
Резерпін+кеторолак, n=5	7,42±1,40	-26,1	-12,5	-26,8	-0,8
Піродазол, n=8	4,31±0,21	+36,4*	+37,0*	+20,6	+47,2*
Резерпін+піродазол, n=5	5,52±1,19	-20,6	-11,8	+24,2	-16,8
Серотонін, n=15	5,42±0,30	+35,2*	+20,3	+13,5	+21,8
Серотонін+кеторолак, n=5	4,56±0,61	+66,7*	+35,7	+46,3*	+14,9
Серотонін+піродазол, n=5	4,91±0,69	+14,1	+47,5*	–	+87,4*
Норадреналін, n=15	4,85±0,49	+62,5*	+40,6	+34,4	+38,8
Норадреналін+кеторолак, n=5	4,68±0,67	+106,6*	+101,2*	+113,5*	+100,4*
Норадреналін+піродазол, n=5	4,14±0,29	+13,5	+30,7	+36,2	+60,6*
Резерпін, n=9	5,82±1,69	-5,8	-7,4	+29,1	+29,0
Резерпін+кеторолак, n=5	7,42±1,40	-26,1	-12,5	-26,8	-0,8
Резерпін+піродазол, n=5	5,52±1,19	-20,6	-11,8	+24,2	-16,8

Примітка. * – статистично достовірні відмінності порівняно з вихідним ($p \leq 0,05$).

анальгезивна дія кеторолаку пролонгувалась (табл. 2). L-ДОФА, який є попередником дофаміну та, у свою чергу, попередником норадреналіну, викликав анальгезію у тварин з вісцеральним болем, спричиненим внутрішньочеревним введенням оцтової кислоти. При цьому анальгезивний ефект L-ДОФА був близьким до антиноцицептивного ефекту кеторолаку і піродазолу на даній моделі ноцицептивної стимуляції (табл. 1). При поєднаному використанні L-ДОФА і тестованих препаратів реєстрували анальгезивний ефект, близький до такого ефекту індивідуальних речовин (табл. 1), що свідчило про антагонізм в дії L-ДОФА та досліджуваних неопіїдних анальгетиків на больову чутливість. При підвищенні функціональної активності серотонінергічної системи, якого досягали інтрацеребральним введенням серотоніну, спостерігали анальгезію в тесті “tail-flick” (табл. 2). Анальгезивний ефект короточасний, його реєстрували протягом 45 хв після введення. При поєднаному використанні серотоніну і піродазолу анальгезія розвивалась повільніше. За індивідуального застосування піродазолу значний анальгезивний ефект реєстрували вже через 30 хв після введення, він утримувався приблизно на одному і тому ж рівні протягом 2 год спостереження. При поєднаному використанні із серотоніном значний анальгезивний ефект розвивався лише до 60 хв, тобто після закінчення періоду, в який реєст-

рували анальгезивну дію серотоніну, та, відповідно, 2 год перевищував ефект індивідуальної речовини майже в 1,85 раза (табл. 2). Разом із тим, поєднане застосування серотоніну і кеторолаку давало більш виразний анальгезивний ефект, ніж окремі речовини.

Як показали експерименти (табл. 1), на моделі вісцерального болю попередник серотоніну 5-гідрокси-L-триптофан проявляв анальгезивний ефект на рівні 58,5 %, який близький до антиноцицептивного ефекту кеторолаку і піродазолу на даній моделі ноцицептивної стимуляції. При поєднаному використанні 5-гідрокси-L-триптофану та кеторолаку реєстрували анальгезивний ефект, близький до анальгезії індивідуальних речовин. При введенні піродазолу на фоні введення 5-гідрокси-L-триптофану мало місце підвищення анальгезивного ефекту (табл. 1).

ВИСНОВКИ. 1. Зниження функціональної активності моноамінергічних систем супроводжується модуляцією неопіїдної анальгезії, що вказує на роль моноамінергічних механізмів в антиноцицептивній дії піродазолу та кеторолаку.

2. Отримані дані про характер взаємодії кеторолак-піродазол з моноамінергічними системами зумовлені як особливостями дії препаратів на ці системи, так і особливостями функціонування даних систем при різних видах ноцицептивної стимуляції.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Брагин Е.О. Нейрохимические механизмы регуляции болевой чувствительности / Е.О. Брагин. – М.: Изд-во Университета дружбы народов, 1991. – 248 с.
2. Влияние клонидина на потенциалзависимые натриевые токи сенсорных нейронов / И.Е. Катина, Б.В. Крылов, Р.С. Хрусталева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2005. – **139**, № 1. – С. 44.
3. Зайцев А.А. Центральные адренопозитивные средства как представители нового класса неопиатных анальгетиков / А.А. Зайцев (Московский медицинский институт) // Фармакология и токсикология. – 1991. – **54**, № 1. – С. 4-8.
4. Кай Бруне. Нестероидные противовоспалительные средства как анальгетики / Бруне Кай // Pharmaceuticum. – 1995. – № 1. – С. 5-7.
5. Каннер Р. Секреты лечения боли / Рональд М. Каннер; пер. с англ.; под ред. А.М. Овечкина. – М.: БИНОМ, 2006. – 400 с.
6. Лапач С.Н. Статистика в науке и бизнесе / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: Морион, 2002. – 640 с.
7. Чурюканов В.В. Нейрохимический анализ и фармакологическая регуляция кортикофугальных механизмов контроля ноцицептивных сигналов в афферентных путях / В.В. Чурюканов // Эксперим. и клин. фармакол. – 2003. – **66**, № 2. – С. 19-23.
8. Шатиркіна Т.В. Катехоламінергічні механізми знеболюючої дії неопіоїдних анальгетиків: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: 14.03.05 – фармакологія / Т.В. Шатиркіна. – К., 2002. – 20 с.
9. Aubin N. Aspirin and salicylate protect against MPTP – induced dopamine depletion in mice / N. Aubin, O. Curet, A. Deffois // J. of Neurochem. – 1998. – **71**, № 4. – P. 1635-1642.
10. Goodman A. The pharmacological basis of Therapeutic / A. Goodman, L. Gilman. – 9th ed. – New York: McGraw-Hill, 1996. – Ch. 27. – P. 836-932.
11. Jazati F. The “tonic” pain related behaviour seen in mononeuropathic rats is modulated by morphine and naloxone / F. Jazati, G. Guilbaud // Pain. – 1991. – **44**. – P. 97-102.
12. Wood R.L. Animal models in analgesic testing // Analgesics: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives / Eds: M. Kuhar, J. Pasternak. – New York: Raven Press, 1991. – V. 42. – P. 74.

О.Е. Ядловский

ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ, КИЕВ

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УЧАСТИЯ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИХ СИСТЕМ В РЕАЛИЗАЦИИ АНТИНОЦИЦЕПТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ПИРОДАЗОЛА В СРАВНЕНИИ С КЕТОРОЛАКОМ НА МОДЕЛИ ВИСЦЕРАЛЬНОЙ БОЛИ И СПИНАЛЬНОМ УРОВНЕ

Резюме

На моделях уксуснокислых “корчей” и “tail-flick” было изучено способность резерпина, норадреналина, серотонина, 5-гидрокси-L-триптофана L-ДОФА влиять на анальгезирующий эффект кеторолака и пиродазола. Выявлено снижение функциональной активности моноаминергических систем, влияющих на анальгезию пиродазола и кеторолака. Полученные данные обусловлены особенностями действия препаратов на эти системы и особенностями их функционирования при различных видах боли.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пиродазол, кеторолак, ноцицепция, норадреналин, дофамин, серотонин.

O. Ye. Yadlovskiy

INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY AMS OF UKRAINE, KYIV

THE PHARMACOLOGICAL ANALYSIS OF PARTICIPATION OF MONOAMINERGIC SYSTEMS IN REALISATION OF ANTINOCYCAPTION ACTION OF PYRODAZOL IN COMPARISON WITH KETOROLAC ON THE MODEL OF A VISCERAL PAIN AND SPINAL LEVEL

Summary

On the models of acetic cramps and “tail-flick” has studied been the ability of reserpin, noradrenalin, serotonin, 5-gidroksi-L-tryptophan L-DOPA to influence analgesic effect of ketorolac and pyrodazol. It has been taped the depression of functional activity of monoaminergic systems, influencing on analgesia pyrodazol and ketorolac. The obtained data are caused by features of action of preparations on these systems and features of their functioning at various kinds of pain.

KEY WORDS: pyrodazol, ketorolac, nociception, noradrenalinum, dofaminum, serotonin.

Отримано 19.11.09

Адреса для листування: О.Є. Ядловський, Інститут фармакології та токсикології АМН України, вул. Е. Потьє, 14, Київ, 03057, Україна.

ВПЛИВ ХОЛЕСТЕРИНУ ТА ЙОГО ЕСТЕРІВ НА ТРАНСДЕРМАЛЬНЕ ВВЕДЕННЯ ПОХІДНИХ 1,4-БЕНЗДІАЗЕПІНУ *IN VIVO*

Холестерин та його естери є важливими компонентами епідермісу. Використання холестерину та його складних естерів у складі трансдермальних терапевтичних систем дозволяє досягнути підвищення проникності шкіри для лікарських речовин. У роботі вивчено вплив холестерину та його естерів на введення похідних 1,4-бенздіазепіну. Показано збільшення проникності шкіри для похідних 1,4-бенздіазепіну при використанні холестерину та його естерів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: холестерин, естери, трансдермальний, похідні 1,4-бенздіазепіну.

ВСТУП. Розробка та вивчення нових шляхів введення лікарських речовин – одне із центральних завдань сучасної фармацевтичної хімії. Одним із перспективних шляхів введення лікарських засобів є трансдермальний [2]. Особливий інтерес він викликає при використанні анксиолітиків.

Оскільки 1,4-бенздіазепіни широко застосовують у клінічній практиці, розробка систем трансдермальної доставки для даної групи речовин є актуальною проблемою.

Холестерин і його естери – важливі складові біологічних мембран та можуть слугувати компонентами трансдермальних терапевтичних систем (ТТС) [1]. Основною функцією даних сполук є регуляція фізичних характеристик біомембран. Залежно від концентрації та локалізації в мембрані холестерин і його похідні можуть змінювати показники плинності, температури фазових переходів, впливати на упаковку ліпідів та проникність для ліпофільних сполук [3, 12, 13]. Крім регуляції фізичних властивостей мембран, холестерин і його похідні беруть участь у підтриманні гомеостазу та регуляції проникності шкіри.

Дана робота присвячена вивченню холестерину та його естерів з жирними кислотами як підсилювачами проникності шкіри для похідних 1,4-бенздіазепінів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на білих безпородних мишах обох статей масою 18-22 г, яких утримували в стандартних умовах віварію з вільним доступом до корму та води.

© І.А. Кравченко, Ю.О. Бойко, Н.С. Новікова, 2010.

Як активні сполуки використовували фе-назепам (речовина 1), БД-3 (речовина 2), діазепам (речовина 3), клоназепам (речовина 4).

Застосовували такі підсилювачі проникності, як: холестерин, холестерилкапронат, холестерилпеларгонат, холестерилундецилат, холестериллаурат, холестерилтридецилат, холестерилміристант, холестерилпальмітат і холестерилстеарат.

До складу трансдермальних терапевтичних систем входили: вода, полівініловий спирт, гліцерин, ПЕО-400, розчин активної речовини в 1,2-пропіленгліколі 4:2:1:1:2. До отриманої рідкої матриці додавали розплав холестерину або його естера в кількості 10 % від маси матриці та ретельно перемішували. Отриману ТТС заливали у форму та висушували до постійної маси протягом 3 діб. Концентрація активної речовини в готовій системі складала 0,4 мг/см².

Аплікування ТТС проводили на попередньо вистрижену міжлопаткову ділянку миші. Час аплікації – 2 год. Розмір аплікованої ТТС – 1 см². Кількість проникної речовини оцінювали на основі мінімальних ефективних доз коразолу (МЕД), викликавши клоніко-тонічні судоми (КТС) і тонічну екстензію (ТЕ) при введенні його у хвостову вену експериментальних тварин. Цей ефект є швидко зворотним та концентраційно залежним.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Здатність естерів холестерину підсилювати проникність шкіри зумовлена двома процесами. Перший – включення їх у мембрани кератиноцитів і до складу міжклітинного матриксу. Завдяки ви-

сокій ліпофільності, наявності двох вуглеводневих радикалів та одного полярного угруповання, естери холестерину займають у мембрані асиметричне положення, що призводить до розупорядкованості мембранної будови, збільшення плинності мембрани та, як наслідок, підсилення проникності для речовин, які вводять. Другий процес – гідроліз естерів епідермальними ліпазами. Кислоти, що утворюються при цьому, призводять до зменшення рН, порушення утворення керамідів з фосфоліпідів. Включення кислот до ліпідних бішарів викликає порушення упаковки останніх [6, 7, 10]. Це спричиняє збільшення проникності рогового шару та впливає на біосинтетичні процеси в нижчележачих шарах.

Вплив холестерину на проникність шкіри заслуговує особливої уваги. Властивість холестерину ущільнювати біологічні мембрани давно та широко відома [4, 8, 11]. Вона пояснюється його вбудовуванням до міжмолекулярних карманів ліпідних бішарів, при цьому холестерин займає вертикальне положення; його вуглеводневий радикал опущений у товщу ліпідного бішару, гідроксильна група розташо-

вується на поверхні [9, 14]. Така конфігурація призводить до збільшення щільності, зменшення рухливості й плинності та, як наслідок, зменшення проникності мембран. Проте в досліджах *in vivo* показано однозначне збільшення показників проникності мембран. Такий ефект пов'язаний із жорсткою регуляцією вмісту холестерину в епідермісі. При підвищенні вмісту холестерину під дією ферменту холестеринсульфатази відбувається його етерифікація з утворенням холестеринсульфату. Останній міститься у шкірі в комплексі зі сфінгозидами, які відповідають за рівень активності ряду ферментів, гідратацію, а також швидкість проліферації та десквамації корнеоцитів [5, 7]. У свою чергу, це викликає зростання вмісту води на межі корнеоцит-міжклітковий матрикс, сприяє порушенню зв'язків корнеоцит-міжкліткового матриксу, збільшує злушчування корнеоцитів та призводить до підвищення проникності шкіри.

Вплив холестерину та його похідних на кризьшкірну проникність сполуки 1 демонструють дані щодо протисудомної активності, наведені на рисунку 1.

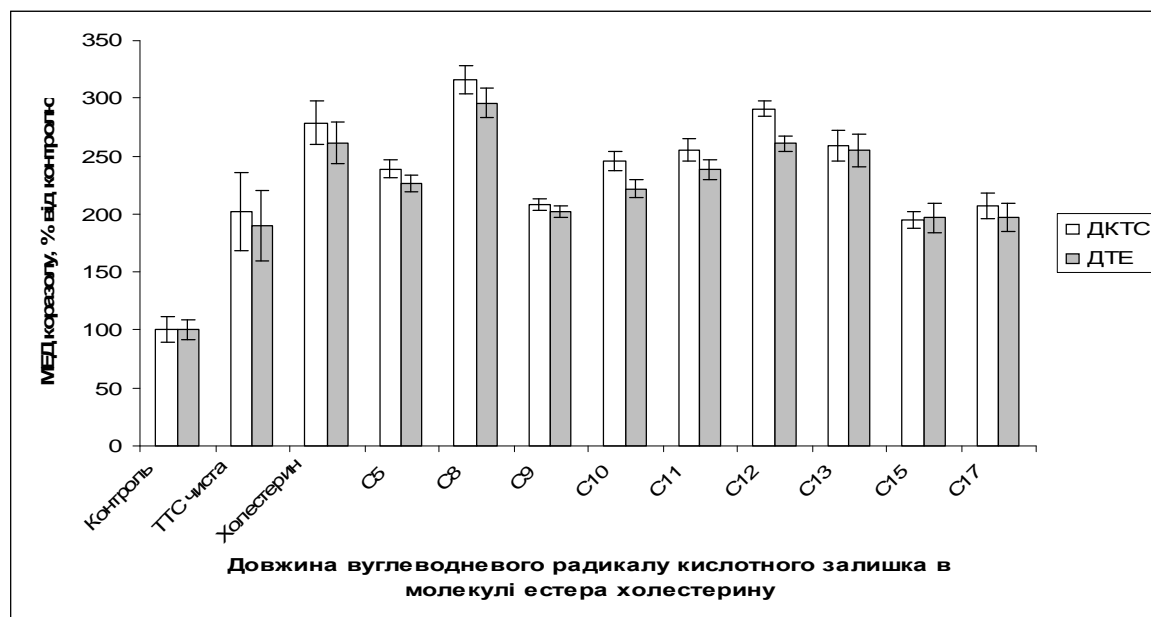


Рис. 1. Протисудомна активність сполуки 1 при використанні холестерину та його складних естерів як підсилювачів проникності.

З рисунка 1 можна побачити, що холестерин та його естери збільшують проникність сполуки 1 в 1,02-1,56 рази порівняно з чистою ТТС (ЧТТС). Найбільший ступінь підсилення проникності спостерігався при використанні холестерилпеларгонату та склав 56 % порівняно зі значенням для ЧТТС. Відмічено високу активність холестерину як підсилювача проникності шкіри

(в 1,38 рази для ДКТС, 1,37 рази для ДТЕ). Серед вивчених естерів тільки естер пальмітинової кислоти призводив до зменшення проникності мембран порівняно з ЧТТС.

Вплив холестерину та його похідних на кризьшкірну проникність сполуки 2 демонструють дані щодо протисудомної активності, наведені на рисунку 2.

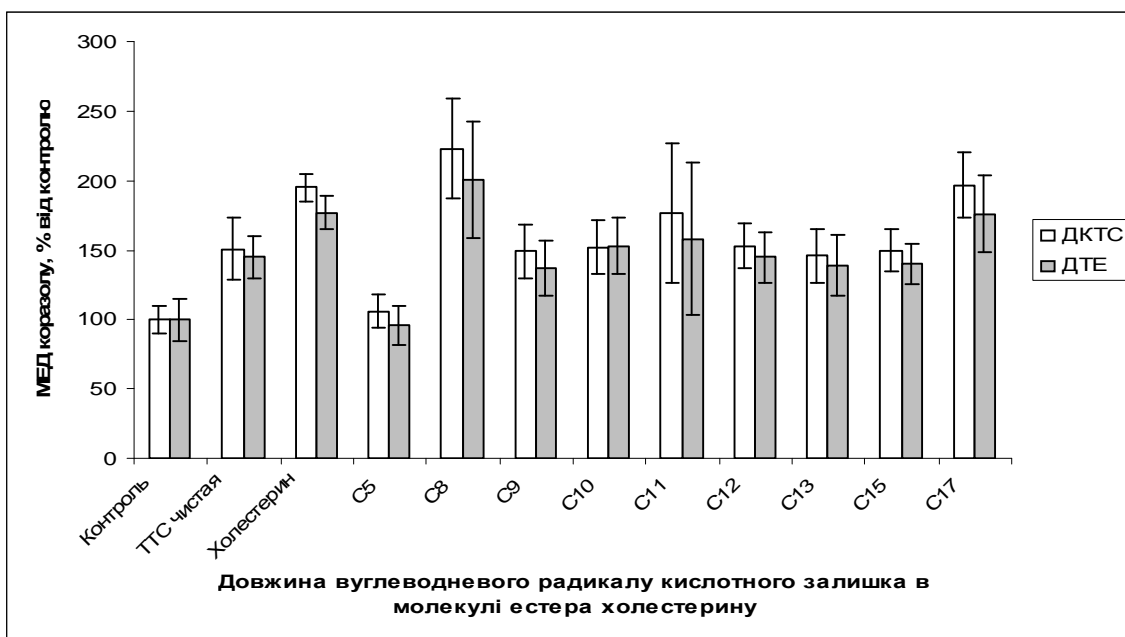


Рис. 2. Протисудомна активність сполуки 2 при використанні холестерину та його складних естерів як підсилювачів проникності.

Здатність підсилювати кризьшкірну проникність сполуки 2 для холестерину та його естерів трохи нижча порівняно зі сполукою 1 (максимальне значення переважали показники контрольної системи: в 1,47 раза для ДКТС та 1,38 раза для ДТЕ). Проте характер прояву підсилювальної активності в ряду похідних аналогічний такому для сполуки 1. Найбільші показники проникності зафіксовано при використанні холестерилпеларгонату, найменші – холестерилкапронату. Високу ак-

тивність відмічено для холестерину та холестерилстеарату. В цілому в ряду похідних показники ДКТС та ДТЕ перебували на рівні ЧТТС або незначно її перевищували.

Схожість такого розподілення активностей між підсилювачами для сполук 1 та 2 досить очікувана. Вони мають подібну будову та, що важливо, досить близькі показники ліпофільності ($\log P=3,57$ та $3,01$ для сполук 1 і 2 відповідно). При дослідженні кризьшкірної проникності сполуки 3 було отримано дані, наведені на рисунку 3.

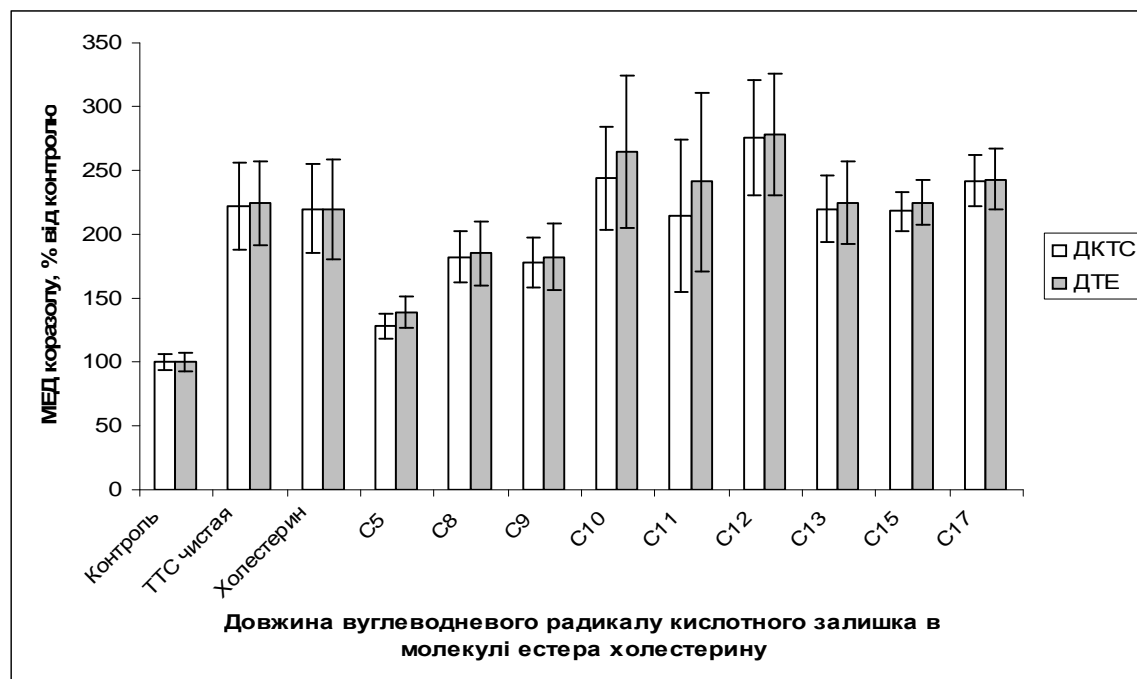


Рис. 3. Протисудомна активність сполуки 3 при використанні холестерину та його складних естерів як підсилювачів проникності.

Щодо сполуки 3 мало місце підсилення проникності при використанні естерів холестерину з вуглеводневим радикалом, що містить 10 та більше атомів вуглецю. Для холестерилтридецилату спостерігали значення, що в 1,24 раза переважало значення ЧТТС (ДКТС – 276 %, ДТЕ – 278 % проти ДКТС – 222 %, ДТЕ – 224 %), дещо менші показники було зафіксовано для холестерилундецилату (ДКТС – 244 %, ДТЕ – 265 %). Для холестерину та холестерилстеарату значення ДКТС та ДТЕ склали 220 і 240 % відповідно, вони незначно перевищували показники ЧТТС. Для холестерилкапронату, як і в попередніх випадках, спостерігали зменшення проникності порівняно з ЧТТС.

Отримані для сполуки 3 дані помітно відрізняються від розглянутих вище даних для

інших похідних, що пояснюється не тільки зменшенням її ліпофільності ($\log P=2,42$). Найбільш можливим є припущення щодо специфічної зміни ліпідної структури мембран, що індукується естерами холестерину з вуглеводневим радикалом, який містить 10-12 атомів вуглецю, що є конформаційно більш сприятливими саме для проникності сполуки 3.

Сполука 4 – найбільш гідрофільна ($\log P=2,18$) з розглянутих нами похідних 1,4-бенздіазепіну. Завдяки цьому, показники підсилення проникності, викликані холестерином та його похідними для цієї сполуки, значно відрізняються від розглянутих раніше. Вплив холестерину та його похідних на крізьшкірну проникність сполуки 4 можна оцінити за протисудомною активністю, представленою на рисунку 4.

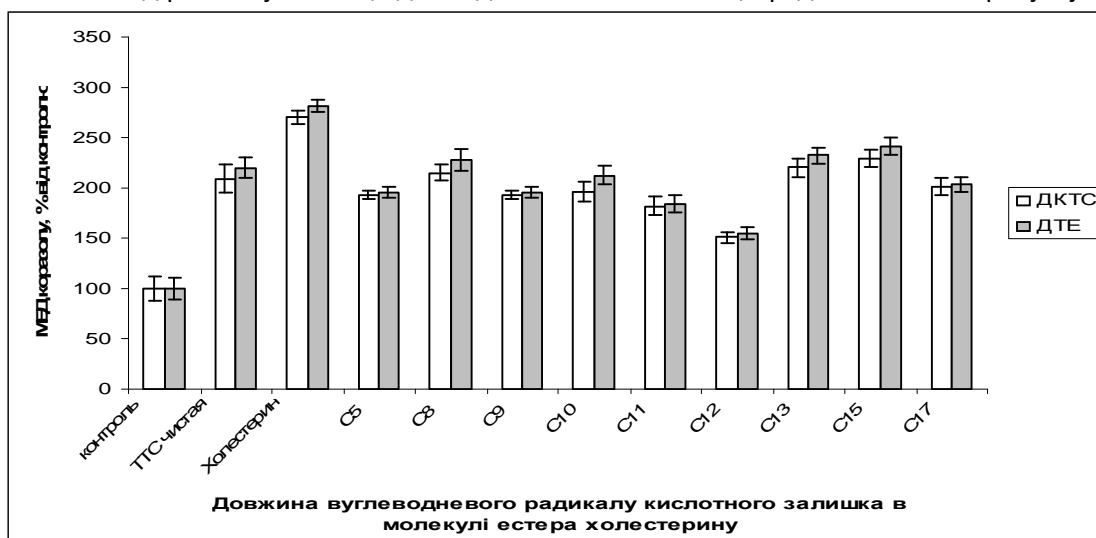


Рис. 4. Протисудомна активність сполуки 4 при використанні холестерину та його складних естерів як підсилювачів проникності.

Найбільші показники підсилення проникності зафіксовано для холестерину (ДКТС – в 1,3 раза, ДТЕ – в 1,27 раза вище значень для чистої ТТС). Механізм впливу холестерину на епідерміс було детально розглянуто вище. Нагадаємо, що ключовим моментом є гідратація рогового шару, підсилена десквамація та порушення зв'язків корнеоцит-міжкліткового матриксу. Можна припустити, що для сполуки 4 як найбільш гідрофільної вирішальним є саме підвищення гідратації рогового шару. Незважаючи на те, що сполука 4 володіє більшою гідрофільністю, ніж описані похідні 1,4-бенздіазепіну, вона проявляє виражену ліпофільність. Сильна гідратація оточення затримує його проходження крізь роговий шар. Таким чином, холестерин утворює найбільш оптимальні умови для проходження сполуки 4, з одного боку ущільнюючи міжклітковий матрикс та підвищуючи його ліпофільність, а з іншого – посилюючи гідратацію межі корнеоцит-міжклітковий матрикс.

Естери холестерину або не впливають на проникність сполуки 4 крізь шкіру, або знижують її (рис. 4). Таким чином, щодо сполуки 4 довжина вуглеводневого радикала в молекулі естера не така важлива, як у випадку сполук 1-3. З огляду на особливості будови (можливо, через зниження показника ліпофільності) для проникнення цієї речовини, рівень гідратації важливіший, ніж безпосередні структурні зміни в ліпідних шарах.

ВИСНОВОК. У ході даної роботи було показано перспективність холестерину та його естерів з жирними кислотами як підсилювачів проникності шкіри. Виявлені особливості проникності похідних 1,4-бенздіазепіну важливі як для безпосереднього розуміння молекулярних механізмів її підсилення, так і для подальшого створення ефективних трансдермальних терапевтичних систем.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болдырев А.А., Кйвярйянен Е.И., Илюха В.А. Биомембранология: Учебное пособие. – Петрозаводск: Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.
2. Кравченко И.А. Трансдермальное введение лекарственных препаратов. – Одесса: Астропринт, 2001. – 220 с.
3. Alanazi F.K. Application of lipoprotein as drug delivery system for anticancer drug and DNA based vaccine. – Georgia: Athens, 2003. – 156 p.
4. Cogan U., Shinitzky M., Weber G. Nis Microviscosity and order in the hydrocarbon region of phospholipid and phospholipid-cholesterol dispersions determined with fluorescent probes // Biochemistry. – 1973. – **12**, № 3. – P. 521-528.
5. Elias P.M., Williams M.L., Holleran W.M. et al. Pathogenesis of permeability barrier abnormalities in the ichthyoses: inherited disorders of lipid metabolism // J. of Lipid Res. – 2008. – **49**, № 4. – P. 697-714.
6. Feingold Kenneth R. The outer frontier: the importance of lipid metabolism in the skin // J. Lipid Res. – 2008. – **50**. – P. 417-422.
7. Feingold Kenneth R. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis // J. Lipid Res. – 2007. – **48**, № 12. – P. 2531-2546.
8. Feinstein M.B., Fernandez S.M., Sha'afi R.I. Fluidity of natural membranes and phosphatidylserine and ganglioside dispersions. Effect of local anesthetics, cholesterol and protein // Biochim Biophys Acta. – 1975. – **413**, № 3. – P. 354-370.
9. Kamlekar R.K., Chandra M.S., Radhakrishnan T.P., Swamy M.J. Interaction of N-myristoyl ethanolamine with cholesterol investigated in a Langmuir film at the air-water interface // Biophys. Chem. – 2009. – **139**, № 1. – P. 63-69.
10. Proksch E., Brander J.M., Jensen J.-M. The skin: an indispensable barrier // Exp. Dermatol. – 2008. – **17**, № 12. – P. 1063-1072.
11. Radda G.K. Enzyme and membrane conformation in biochemical control // Biochem J. – 1971. – **122**, № 4. – P. 385-396.
12. Shrivastava S., Paila Y.D., Dutta A., Chattopadhyay A. Differential effects of cholesterol and its immediate biosynthetic precursors on membrane organization // Biochemistry. – 2008. – **47**, № 20. – P. 5668-5677
13. Yeagle P.L. Cholesterol and cell membrane. – Boca Raton, Florida, In: P.L. Ed., CRC press, 1988. – 420 p.
14. Zhang W., McIntosh A.L., Xu H. et al. Structural analysis of sterol distributions in the plasma membrane of living cells // Biochemistry. – 2005. – **44**, № 8. – P. 2864-2884.

И.А. Кравченко^{1,2}, Ю.А. Бойко², Н.С. Новикова¹

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМЕНИ А.В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ¹, ОДЕССА
ОДЕССКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.И. МЕЧНИКОВА²

ВЛИЯНИЕ ХОЛЕСТЕРИНА И ЕГО ЭСТЕРОВ НА ТРАНСДЕРМАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 1,4-БЕНЗДИАЗЕПИНОВ *IN VIVO*

Резюме

Холестерин и его эстеры являются важными компонентами эпидермиса. Использование холестерина и его сложных эстеров в составе трансдермальных терапевтических систем позволяет добиться повышения проницаемости кожи для лекарственных веществ. В работе изучено влияние холестерина и его эстеров на введение производных 1,4-бенздиазепина. Показано увеличение проницаемости кожи для производных 1,4-бенздиазепина при использовании холестерина и его эстеров.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: холестерин, эстеры, трансдермальный, производные 1,4-бенздиазепина.

I.A. Kravchenko^{1,2}, Yu.O. Boyko², N.S. Novikova¹

O.V. BOHATSKY PHYSICS-CHEMICAL INSTITUTE OF NAS OF UKRAINE¹, ODESSA
I.I. MECHNIKOV ODESSA NATIONAL UNIVERSITY²

INFLUENCE OF CHOLESTEROL AND ITS ESTERS ON TRANSDERMAL DELIVERY OF DERIVATIVES 1,4-BENZDIAZEPINE *IN VIVO*

Summary

Cholesterol and its esters are important components of epidermis. Application of cholesterol and its esters in composition of transdermal therapeutic system allows to reach the increase of skin permeability for drugs. In this work has been investigated influence of cholesterol and its esters on derivatives injection of 1,4-benzdiazepine; has been shown the increase of skin permeability for derivatives of 1,4-benzdiazepine, using cholesterol and its esters.

KEY WORDS: cholesterol, esters, transdermal, 1,4-benzdiazepine.

Отримано 10.02.10

Адреса для листування: І.А. Кравченко, Фізико-хімічний інститут імені О.В. Богатського НАН України, вул. Люстдорфська
дорога, 86, Одеса, 65126, Україна.

**МЕХАНІЗМИ ІНГІБУВАННЯ ТРИПСИНОПОДІБНИХ ФЕРМЕНТІВ ТКАНИН
ДРОЗОФІЛИ СОЛЯМИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ**

Досліджували вплив солей важких металів на частково очищену методами висолювання та гелевої хроматографії трипсиноподібну пептидгідролазу личинок дрозозфіли. Показано механізм дії та константи інгібування для всіх досліджуваних солей важких металів. Установлено, що найбільшим інгібуючим ефектом виділяється хлорид кадмію, а найменшим – хлорид цинку.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: важкі метали, пептидгідролаза, дрозозфіла.

ВСТУП. Регулювання активності ферментів комах різними ефекторами вивчено дуже слабо [3, 4, 6]. У літературі є окремі відомості про функціонування ферментів дегідрогеназ циклу трикарбонових кислот [11], дихального ланцюга [5], а також висвітлено окремі питання, що стосуються механізмів біосинтезу білка в безхребетних.

Інгібіторну дію солей важких металів вивчено відносно ферментів, перш за все хребетних, ссавців зокрема [9, 10]. Що ж стосується комах, то ці об'єкти в плані дії вказаних токсикантів практично не досліджено.

Тому метою нашої роботи було вивчення механізмів дії хлоридів важких металів (кобальту, міді, цинку та кадмію) на активність трипсиноподібних ферментів, які відіграють значну роль у розвитку і життєдіяльності, а також є одними з головних ферментів у процесах травлення дрозозфіли.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Джерелом досліджуваної пептидгідролази слугували личинки третього віку дрозозфіли дикого типу *Drosophila melanogaster* Meigen, які розвивалися в стандартних умовах при температурі 25 °С на стандартному живильному середовищі [8].

Виділення ферменту проводили відповідно до методу, розробленого О.М. Андрієвським [1, 2], з деякими модифікаціями. Очищених від корму личинок висушували і зважували. Знежирення тканин личинок досягали, гомогенізуючи їх в ацетоні за допомогою ножового мікроподрібнювача при 14 000 об. / хв на хо-

лоді. Отриманий гомогенат центрифугували при 10 000 г. Білкові осадки відокремлювали шляхом декантування від ацетонової витяжки і висушували в ліофілізаторі. З ацетонових осадків фермент екстрагували 0,1 М гліцин-NaOH буфером (рН 9,0) шляхом ресуспендування осаду в буфері у співвідношенні 1:10. Отриману суспензію центрифугували при 10 000 г. Висолювання різних білкових компонентів з лужного екстракту проводили шляхом збільшення концентрації сульфату амонію від 0,5 М до 5,0 М з інтервалом 0,5 М. Білки, що випадали в осадок при різних молярних концентраціях солі в розчині, видаляли з екстракту центрифугуванням при 12 000 г протягом 10 хв на холоді. Отримані осадки окремо розчиняли в 1 мл 0,1 М гліцин-NaOH буфері (рН 9,0). Фракцію білків, що містила значну кількість білка, піддавали груповому розділенню на колонці із сефадексом G-100. Знесолювання проводили в системі 0,01 М триацетатного буфера (рН 7,05) при кімнатній температурі. В елюйованих фракціях визначали вміст білка, а також протеолітичну активність. Наступним етапом було іонообмінне хроматографічне розділення на колонці зі сферичною ДЕАЕ-целюлозою, врівноваженою 0,01 М триацетатним буфером (рН 7,5). Білки елюювали розчинами хлористого калію з поступово зростаючими концентраціями (від 0,01 М до 1,0 М). Фракції об'ємом по 3 мл збирали і спектрофотометрували при 280 нм з метою визначення вмісту білка і побудови елютограми. Елюати, що проявляли пептидгідролазну активність, поєднували і піддавали аналізу.

© І.Л. Рижко, Н.В. Мотрук, С.А. Петров, 2010.

В усіх білкових фракціях після висолування та іонообмінної хроматографії, як і у вихідному екстракті, визначали концентрацію білка за методом Лоурі [2, 13, 14], а також протеолітичну активність з використанням як субстрату БАПНА (N,α-бензоїл-L-аргінін-n-нітроаніліду), який застосовували у вигляді 1 мМ водного розчину.

Питому активність (ПА) ферменту виражали в міліодинацях (МО) у розрахунку на 1 мг білка досліджуваного розчину. За одну міліодинацію брали кількість ферменту, що розщеплює 1 мкмоль субстрату за 1 хв інкубації при 37 °С.

Константу Міхаеліса визначали графічно, константу інгібування – з використанням кінетичного методу Лайнуївера–Берка [7].

Отримані дані обробляли статистично [12].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Перш за все ми досліджували дію хлоридів кобальту, міді, цинку та кадмію на активність трипсино-

подібних ферментів у тканинах дрозофіли. В цій серії дослідів використовували достатньо високі концентрації хлоридів металів, які визначаються у навколишньому середовищі в промислових регіонах. Як видно з таблиці 1, хлориди всіх вказаних металів інгібують активність дослідженого ферменту. Однак статистично достовірним цей ефект виявився при застосуванні найбільш високих концентрацій даних токсикантів. Зокрема, для хлориду кобальту та хлориду кадмію така концентрація дорівнювала 2 мМ, а для хлориду міді й цинку – 1 і 2 мМ відповідно. Ці дані свідчать про існування ефекту інгібування трипсиноподібної протеїнази дрозофіли хлоридами всіх досліджених солей металів у високих концентраціях, однак за ними не можна судити про характер інгібуючої дії і, тим більше, про його механізм.

Тому, отримавши дані про інгібуючу дію хлоридів кобальту, міді, цинку та кадмію, ми вирішили дослідити механізми цього явища з використанням кінетичного методу Лайнуїве-

Таблиця 1 – Вплив *in vitro* хлоридів важких металів на активність пептидгідролази личинок дрозофізи на етапах її виділення й очищення

Варіанти	Вихідний екстракт	Концентрація сірчаноокислого амонію				Хроматографічна фракція	
		2,0 М	2,5 М	3,0 М	3,5 М		
Контроль	15,4±0,5	32,5±1,4	65,6±0,6	104,4±0,1	38,8±0,3	115,3±26,7	
CoCl ₂ , мМ	0,2	18,8±4,4*	29,3±1,8*	69,1±0,4*	114,9±1,7*	39,4±2,4	103,4±20,5
	0,4	16,1±2,5	24,9±0,7*	72,1±0,1*	114,6±0,4*	36,5±0,3*	96,0±7,4
	1,0	13,7±1,5*	17,9±0,1*	59,9±2,0*	104,0±1,7	33,9±1,1*	93,2±17,1
	2,0	6,8±0,7*	13,9±4,9*	36,7±0,4*	82,1±3,5*	18,8±4,0*	56,3±8,6*
CuCl ₂ , мМ	0,2	17,1±4,0*	25,7±0,4*	77,5±3,1*	112,8±0,3*	33,4±0,1*	84,1±15,9
	0,4	15,4±2,4	24,9±0,3*	80,7±0,7*	108,2±1,1	31,3±0,7*	81,9±11,4
	1,0	5,5±5,6*	3,6±0,1*	44,9±0,1*	89,6±2,0*	11,2±0,3*	55,2±15,6
ZnCl ₂ , мМ	0,2	10,1±1,1*	22,5±0,7*	99,6±1,8*	106,4±2,7	34,0±0,7*	73,9±22,8
	0,4	11,1±0,8*	22,8±0,1*	113,3±1,0*	99,4±0,1	32,5±2,1*	99,5±13,1
	1,0	3,6±1,7*	8,6±0,6*	68,4±0,4	72,9±1,0*	11,4±0,1*	53,4±14,8*
	2,0	0,1±0,2*	3,6±0,4*	54,7±0,3*	27,3±0,1*	5,5±1,1*	13,7±11,6*
CdCl ₂ , мМ	0,2	8,3±1,3*	17,9±1,3*	76,2±0,1*	100,7±2,0	29,3±1,3*	87,5±18,2
	0,4	7,8±1,2*	16,4±0,1*	76,2±0,3*	107,2±0,1	24,4±1,0*	72,8±8,0
	1,0	7,3±3,2*	15,8±0,1*	142,6±0,6*	92,7±0,6*	25,1±0,1*	2,4±10,8
	2,0	4,3±2,4*	14,2±1,1*	62,5±0,9	81,2±0,4*	14,2±0,1*	60,8±5,1*

Примітка. Дані відображають питому активність пептидгідролази. * – відмінності значень дослідних варіантів, порівняно з відповідним контрольним варіантом, достовірні (p<0,05).

ра–Берка. Аналіз цих даних свідчить перш за все про те, що інгібуючу дію мали лише 3 з 4 досліджених хлоридів – хлориди кобальту, цинку та кадмію. Хлорид міді не проявляв такої дії.

Перетин усіх інгібіторних прямих на осі ординат вказує на конкурентний механізм інгібування трипсиноподібних ферментів цими солями (рис. 1). Причому величина максимальної

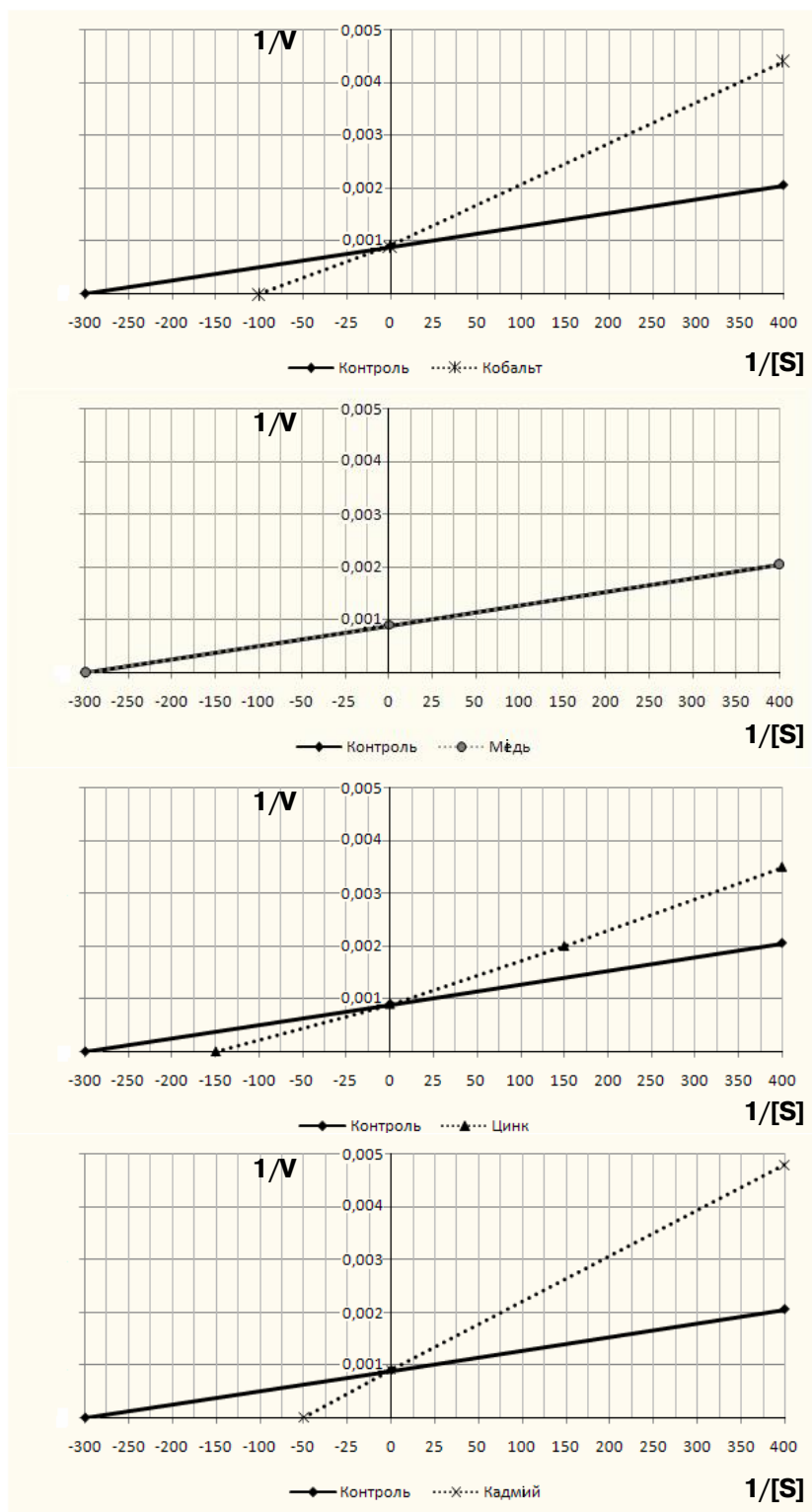


Рис. 1. Графік Лайнуівера–Берка для визначення інгібуючої дії хлоридів важких металів на трипсиноподібну пептидгідролазу тканин дрозофіли.

швидкості реакції даного ферменту становила 20,8 мМ/мг·хв. Для розуміння ефекту інгібування важливим є визначення константи Міхаеліса (K_m) ферменту та уявної константи K_m . Константа Міхаеліса в нашому експерименті становила 3,0 мкМ, а уявні K_m для кобальту, цинку та кадмію склали, відповідно, 12,0, 10,0 і 8,0 мкМ.

При підрахунку константи інгібування (K_i), яка характеризує силу інгібіторного ефекту, отримано такі значення: для хлориду кадмію ця величина становила 70,0 мкМ, для хлориду кобальту – 90,0 мкМ, а для хлориду цинку – 120,0 мкМ. Отже, найбільш потужним інгібітором для трипсиноподібної пептидгідролази є хлорид кадмію, а найслабшим – хлорид цинку.

Як відомо, трипсиноподібні ферменти відносять до класу серинових протеїназ, що свідчить про значну роль гідроксильних радикалів серину в активному центрі ферменту в зв'язуванні субстрату та реалізації ферментативного акту. Очевидно, присутність солей дос-

ліджених металів призводить до блокування гідроксильних груп активного центру ферменту, що ускладнює приєднання до нього субстрату. Не виключена також можливість взаємодії солей важких металів із субстратом (N α -бензоїл-L-аргінін-n-нітроанлідом) за рахунок наявності в його складі гуанідинових угруповань. Така взаємодія може призводити до хімічної модифікації субстрату та ускладнення його приєднання до активного центру ферменту.

ВИСНОВКИ. 1. Хлориди кадмію, кобальту, цинку й міді у високих концентраціях здатні пригнічувати трипсиноподібний фермент тканин дрозофіли.

2. Інгібування ферменту зазначеними токсикантами відбувається за конкурентного типу.

3. Значення K_i свідчать про те, що найбільшим інгібіторним ефектом характеризується хлорид кадмію, а найменшим – хлорид цинку.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андриевский А.М. Метод получения частичнок очищенной щелочной пептидгидролазы из личинок *Drosophila melanogaster* // Укр. биохим. журн. – 1985. – **57**, № 4. – С. 54-59.
2. Андриевский А.М., Катаненко С.В., Тоцкий В.Н. Онтогенетические особенности пептидгидролазной активности экстрактов тканей *Drosophila melanogaster* // Укр. биохим. журн. – 1982. – **54**, № 5. – С. 519-524.
3. Андрієвський О.М., Рижко І.Л., Радіонов О.О. Вплив іонів металів на рівень протеолітичної активності травної системи дрозофіли в онтогенезі // Вісник ОНУ – Біологія. – 2002. – **7**, вип. 1. – С. 15-21.
4. Бигалиев А.Б. Генетический эффект солей тяжёлых металлов как загрязнителей окружающей среды // Успехи соврем. генет. – 1982. – Вип. 10. – С. 104-114.
5. Вержбинская Н.А., Савина Н.В. Эволюция гликолитической системы в типе моллюсков // Журн. эволюц. биохим. и физиол. – 1971. – **7**, № 4. – С. 337-347.
6. Колодзейская М.В., Пилявская А.С. Пептидазы. – К.: Наукова думка, 1982. – 176 с.
7. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2 т.: Пер. с англ. – М.: Мир, 2004. – Т. 1. – 381 с.

8. Медведев Н.Н. Практическая генетика. – М.: Наука, 1968. – 294 с.

9. Мельникова Н.М., Деркач Є.А. Вікові особливості кумуляції кадмію в органах токсикованих щурів і зміни показників кислотно-лужного стану крові за різних умов антиоксидантного захисту організму // Укр. біохім. журн. – 2004. – **76**, № 6. – С. 95-99.

10. Мосолов В.В. Протеолитические ферменты. – М.: Наука, 1971. – 414 с.

11. Петров С.А. Особенности взаимодействия функционально связанных витаминов в организме мидий, кефали и крыс: Автореф. дисс. ... д-ра биол. наук. – Минск, 1979. – 20 с.

12. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Вышэйшая школа, 1973. – 320 с.

13. Erlanger B., Kokovsky N., Cohen W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin // Arch. Biochem. and Biophys. – 1961. – **95**, № 2. – P. 271-278.

14. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, № 1. – P. 265-275.

МЕХАНИЗМЫ ИНГИБИРОВАНИЯ ТРИПСИНОПОДОБНЫХ ФЕРМЕНТОВ ТКАНЕЙ ДРОЗОФИЛЫ СОЛЯМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Резюме

Исследовали влияние солей тяжелых металлов на частично очищенную методами высаливания и гелевой хроматографии трипсиноподобную пептидгидролазу личинок дрозофилы. Показано механизм действия и константы ингибирования для всех исследуемых солей тяжелых металлов. Установлено, что наибольшим ингибирующим эффектом выделяется хлорид кадмия, а наименьшим – хлорид цинка.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **тяжелые металлы, пептидгидролаза, дрозофила.**

I.L. Ryzhko, N.V. Motruk, S.A. Petrov
I.I. MECHNYKOV ODESSA NATIONAL UNIVERSITY

MECHANISM OF INHIBITION OF TRYPSIN ENZYME TISSUE DROSOPHILA HEAVY METAL SALTS

Summary

We have reseaeched influence of the heavy metals salts on partly refined by methods of salting-out and gel chromatography trypsinlike peptide hydrolyse of drosophila larvae. It has been shown the mechanism of action and inhibition constants for all the heavy metal salts. It has been established that the greatest inhibitory effect of cadmium chloride is released, and the smallest – zinc chloride.

KEY WORDS: **heavy metals, peptide hydrolyse, drosophila.**

Отримано 09.04.10

Адреса для листування: І.Л. Рыжко, Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна.

ЛІПОСОМАЛЬНИЙ ЦИПРОФЛОКСАЦИН В ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЛІКУВАННІ ХЛАМІДІОЗУ

Ліпосоми, отримані із суміші полярних ліпідів з ципрофлоксацином, проявляють антихламідійну активність відносно Chlamydia trachomatis. Використання ліпосомальних форм ципрофлоксацину для лікування хламідіозу дозволяє зменшити його терапевтичну дозу у 20 разів при застосуванні негативно заряджених ліпосом.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **ципрофлоксацин, ліпосоми, Chlamydia trachomatis.**

ВСТУП. Одним зі шляхів підвищення якості терапії різних захворювань людини є пошук нових лікарських форм і нових нетоксичних препаратів. До таких лікарських форм і препаратів відносять препарати на основі ліпідів (ліпосоми). Створення лікарських препаратів на основі природних ліпідів є перспективним через їх нетоксичність, біодеградованість. Ліпосоми можна використовувати й для боротьби з інфекційними захворюваннями.

У роботі [6] автори досліджували *in vitro* інгібуючу активність ліпосомальної форми тетрацикліну в аніонних, катіонних і нейтральних маленьких одношарових ліпосомах, порівняно зі звичайним тетрацикліном, на інфікованих *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) фібробластах миші. Вони показали, що нейтральні ліпосоми, що містять тетрациклін, були ефективними для інгібування *C. trachomatis*. Вищу інгібуючу активність ліпосомального тетрацикліну, порівняно зі звичайним тетрацикліном, підтверджено *in vitro* ще в одній більш пізній роботі [8]. Автори показали, що доксициклін краще інкапсулювався в ліпосоми, ніж тетрациклін. Збільшення антихламідійної активності ліпосомальних форм антибіотиків, порівняно з відповідними неліпосомальними антибіотиками, складало від 2- до 6-кратного для доксицикліну і від 4- до 10-кратного для тетрацикліну.

Однак, з огляду на токсичність зазначених вище антибіотиків, а також тривалість лікування хламідійної інфекції, зниження їх терапевтичних доз у 2-10 разів не ліквідує цілком їх токсичності. Крім того, зважаючи на резистентність мікроорганізмів до антибіотиків, роз-

робка нових ліпосомальних форм антибіотиків є актуальною.

Раніше нами були отримані ліпосомальні форми антибіотиків гентаміцину і тобраміцину [5]. Відсоток включення антибіотиків у ліпосоми залежав від їх складу і заряду. Було показано, що негативний заряд ліпосом істотно збільшує відсоток включення антибіотиків у ліпосоми.

Оскільки ліпосоми допомагають довше зберігати високий рівень концентрації лікарських препаратів у крові й клітинах, а також проникнути їм в ті ділянки, куди без ліпосом вони потрапити не можуть, ми припустили, що зазначена властивість може бути використана в лікуванні такої внутрішньоклітинної інфекції, як розповсюджений на даний час хламідіоз [2]. Виявлено, що його мікроорганізми – хламідії уникають впливу лікарських препаратів, ховаючись у крапельках жиру (нейтральні ліпіди), які утримуються всередині клітин [9]. Хламідіоз передається переважно статевим шляхом, хламідії проникають усередину клітин і використовують їх ресурси для життєдіяльності й розмноження. Присутність цих паразитів в організмі може призводити до цілого ряду захворювань: запальних процесів у сечостатевої системі, легенях, оці, артритів. Ученим Університету Дьюка (Північна Кароліна, США) вдалося розібратися в системі захисту, використовуваній хламідіями. Виявлено, що вони не тільки ховаються всередину крапельок жиру, але і синтезують білок, що стимулює синтез жиру клітиною. Згодом жирові включення розростаються, заповнюють усю клітину, що лопається, поширюючи навколо себе тисячі бактерій, які заражають сусідні клітини [9].

© Н.М. Іванова, 2010.

З огляду на спорідненість хламідій до ліпідів, застосування ліпосомальних антибіотиків при лікуванні хламідіозу буде перспективним, тому що ліпосоми, які містять антибіотик, "відволікатимуть" на себе хламідії, імітуючи внутрішньоклітинні краплі жиру, використовувани хламідіями для захисту. Це дасть можливість зменшити дози антибіотиків, а отже, і зменшити їх негативний вплив на організм людини. Тим більше, що для лікування хламідіозу тривалий час застосовують антибіотики, насамперед тетрациклінового ряду, макроліди, фторхінолони (так, наприклад, при хворобі Рейтера лікування антибіотиками триває не менше місяця) [2].

Метою даної роботи було проведення дослідження відсотка включення антибіотиків у ліпосоми залежно від їх складу і заряду, а також вивчення антихламідійної активності ліпосомальних форм антибіотиків *in vivo* на курячих ембріонах відносно *S. trachomatis*.

Для вивчення можливості створення ліпосомальних форм антибіотиків для лікування хламідіозу було обрано похідну фторхінолонів – ципрофлоксацин (1-циклопропіл-6-фтор-1,4-дигідро-4-оксо-7(1-пі-перазиніл)-3-хінолін-карбоксильна кислота), яку широко застосовують при лікуванні хламідіозу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі було використано: 10 % спиртовий розчин яєчного лецитину (ЗАТ "Біолік", Україна); холестерин ("Sigma", США); суміш полярних ліпідів з негативним зарядом [7]. У роботі також застосовували антибіотик фторхінолонового ряду – ципрофлоксацин (Україна) і сефарозу-4В ("Sigma", США).

Як інфекційний агент використано штам *Vu L2* венеричної лімфогранульоми, а як модель хламідіозу – 6-7-денні курячі ембріони.

Одержання ліпосом. Ліпосоми отримували методом упарювання ліпідів на вакуумному ротаційному упарювачі (Швейцарія). Далі суміш упарювали і суспендували у 0,2 % розчині ципрофлоксацину у фізіологічному розчині в співвідношенні антибіотик:ліпіди 1:10. Ліпосоми одержували на екструдері EmulsiFlex-C5 (Canada "Avestin") шляхом продавлювання стисненим повітрям (10 циклів) до досягнення постійної оптичної щільності на спектрофотометрі (DU-7 Spectrophotometer Beckman, USA) при температурі, вищій від температури фазового переходу кожного з присутніх ліпідних компонентів. Середній розмір ліпосом складав 160-180 нм, концентрація ліпідів у ліпосомах становила 1 %. Для одер-

жання стерильних ліпосом застосовували фільтрацію, що стерилізує, через фільтри "Millipore" з величиною пор 0,22 мкм.

Визначення розміру ліпосом. Розмір ліпосом визначали методом турбодиметрії за виміром оптичної щільності досліджуваної ліпідної суспензії в діапазоні хвиль 450-700 нм [3].

Очищення антибіотика, що був включений у ліпосоми, від того, що не був включений, здійснювали шляхом хроматографії на колонці із сефарозою-4В і за допомогою ультрацентрифугування (центрифуга MSE-Superspeed 65, Англія) протягом години при 105 000 g. Вихід ліпосом визначали спектрофотометрично при довжині хвилі 450 нм. Концентрацію ципрофлоксацину визначали після його екстракції сумішшю хлороформ:спирт (3:2) спектрофотометрично при довжині хвилі 278 нм.

Приготування суспензії хламідій і вивчення антихламідійної активності. Культивування збудників виду *S. trachomatis* здійснювали методами серійних пасажів в епітеліальних клітинах оболонки жовткових мішків курячих ембріонів, що розвиваються, і в культурах клітин, які перевиваються, бо курячі ембріони, що розвиваються, є чутливою моделлю для виділення і лабораторного культивування всіх хламідій [1].

Зараження *S. trachomatis* проводили всередину жовткового мішка за стандартною методикою [1]. Специфічна загибель ембріонів та їх розкриття мали місце на 4-ту добу після інфікування. Загибель ембріонів протягом перших 3-х діб була неспецифічною для хламідійної інфекції. Розкриття ембріонів, що вижили, проводили на 19-20 день після інфікування.

Специфічну загибель ембріонів вивчали при перегляді мазків-відбитків оболонки їх жовткових мішків, пофарбованих за Маккіавелло, і специфічних люмінуючих сироваток на люмінесцентному мікроскопі (ЛЮМАМ МУЛ-2).

В експерименті використовували чистий ципрофлоксацин у дозах від 0,012 до 0,24 мг на 1 курячий ембріон, а також ліпосомальний ципрофлоксацин у дозах від 0,012 до 0,24 мг антибіотика на 1 курячий ембріон. Співвідношення ципрофлоксацин:ліпіди складало 1:2; 1:5; 1:10; 1:20.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Спочатку було отримано ліпосоми (Лс) на основі яєчного лецитину (ФХя), тому що лецитин є м'яким ліпідом і традиційно використовується в ліпосомології. Співвідношення ципрофлоксацин (ЦФ): лецитин складало 1:10. Встановлено, що відсоток включення ципрофлоксацину

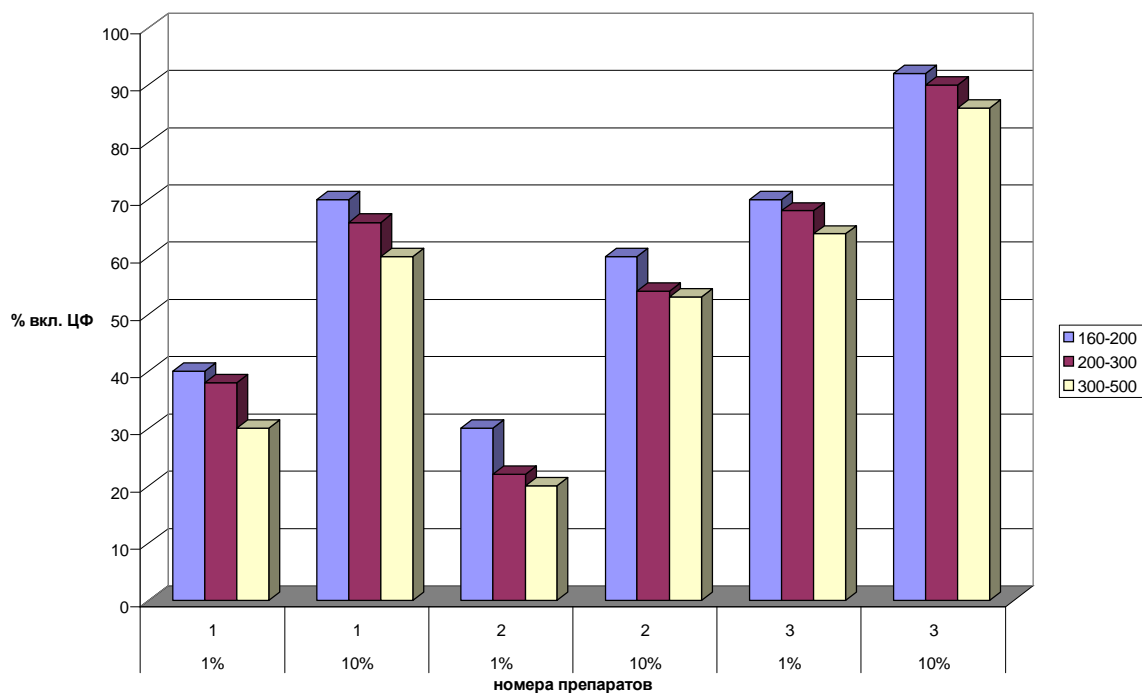
в лецитинові ліпосоми залежить від розміру ліпосом і концентрації лецитину (рис. 1). На рисунку 1 видно, що при зменшенні розміру ліпосом від 300-500 до 180-200 нм, а також при збільшенні концентрації ліпідів від 1 до 10 збільшувався вміст включеного ципрофлоксацину від 40 до 70 %.

Для надання ригідності ліпосомам нами до лецитину був доданий холестерин (Хол) (рис. 1, № 2) у співвідношенні холестерин:лецитин 1:5 і співвідношенні ЦФ:ФХя 1:10 з концентрацією ліпосом від 1 до 10 %. Як видно на рисунку, додавання холестерину до лецитинових ліпосом знижувало відсоток включення ципрофлоксацину до 28 і 60 % (залежно від концентрації лецитину). Крім того, присутність холестерину в ліпосомах збільшувала їх розмір і час диспергування.

У наступному експерименті для одержання ліпосом ми використовували суміш полярних ліпідів з великим негативним зарядом, тому що

в наших попередніх роботах було показано, що негативний заряд ліпосом істотно збільшує відсоток включення антибіотиків у ліпосоми [4]. Крім того, відомо, що негативно заряджені ліпосоми швидше потрапляють у клітини. Співвідношення ЦФ:ліпіди складало 1:10. Як видно на рисунку 1 (№ 3), при збільшенні кількості ліпідів у ліпосомах відсоток включення ЦФ зростає із 70 до 92 %. Оскільки максимальне включення ЦФ отримано при його включенні в негативно заряджені ліпосоми, вони були використані далі для визначення їх антихламідійної активності. Високий відсоток включення ЦФ у негативно заряджені Лс приблизно можна пояснити електростатичною взаємодією негативно заряджених ліпосом і позитивно зарядженого ципрофлоксацину.

При вивченні антихламідійної активності ліпосомального ЦФ *in vivo* на курячих ембріонах (кожна група складалася з 12 ембріонів) було отримано такі результати (табл. 1):



№ 1 – Лс: ФХя + ЦФ, № 2 – Лс: ФХя + Хол + ЦФ, № 3 – Лс: ОЗЛ + ЦФ.

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

Таблиця 1 – Вживаність інфікованих *Chlamydia trachomatis* курячих ембріонів

№ з/п	Кількість антибіотика на 1 курячий ембріон, мг	Ембріони, що вижили, %	
		при введенні розчину ципрофлоксацину	при введенні ліпосомального ципрофлоксацину
1	0,24	100	100
2	0,12	67	100
3	0,08	60	100
4	0,022	56	100
5	0,012	5	100

1) у контрольній групі №1 неінфікованих курячих ембріонів усі були живі;

2) загибель курячих ембріонів, інфікованих суспензією венеричної лімфогранульоми (0,5 мл суспензії в жовтковий мішок) склала 100 % на 4-5-6 дні після інфікування;

3) у групах курячих ембріонів, яким вводили інфекційну суспензію хламідій (0,5 мл суспензії в жовтковий мішок) та інтактний ЦФ, виживаність становила від 5 до 100 % при використанні ЦФ у дозі від 0,012 до 0,24 мг на ембріон;

4) у групах курячих ембріонів, яким вводили інфекційну суспензію хламідій (0,5 мл суспензії в жовтковий мішок) і негативно заряджені ліпосоми з ципрофлоксацином, виживаність склала 100 % при використанні ліпосом з концентрацією ЦФ у дозі від 0,012 до 0,24 мг на ембріон;

5) у групах курячих ембріонів, яким вводили інфекційну суспензію хламідій (0,5 мл суспензії в жовтковий мішок) і ліпосоми без антибіотика, виживаність склала 0 %.

Отримані дані дозволяють зробити висновок про високу антихламідійну активність ліпосомального ципрофлоксацину, отриманого на основі полярних негативно заряджених ліпідів (у дозах від 0,012 до 0,24 мг антибіотика на 1 курячий ембріон), порівняно з чистим ципрофлоксацином, узятим у тих же дозах.

З огляду на спорідненість хламідій до жирів (ліпідів) [9], можна говорити про спрямований транспорт ліпосомального ципрофлоксацину до клітин.

Крім того, слід зазначити, що дані дослідження вимагають продовження, оскільки не досліджено дози ципрофлоксацину менше 0,012 мг на 1 курячий ембріон і не отримано остаточну летальну дозу для курячих ембріонів.

ВИСНОВКИ. 1. Включення ципрофлоксацину в ліпосоми залежить від їх складу, заряду і розміру та перебуває в межах від 28 до 92 %.

2. Максимальне включення 92 % забезпечують негативно заряджені ліпосоми, отримані на основі полярних ліпідів і ципрофлоксацину.

3. Холестерин, надаючи твердість мембрані ліпосом, знижує відсоток включення ципрофлоксацину в ліпосоми.

4. Ліпосоми, отримані із суміші полярних ліпідів з ципрофлоксацином, проявляють антихламідійну активність відносно *Chlamydia trachomatis*.

5. Використання ліпосомальних форм ципрофлоксацину для лікування хламідіозу дозволяє зменшити його терапевтичну дозу в 20 разів при застосуванні негативно заряджених ліпосом.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Маврів І.І., Кутова В.В., Гончаренко В.В., Джораєва С.К. Виділення, ідентифікація та умови довгострокового зберігання *Chlamydia trachomatis* та *Chlamydia pneumoniae*: Методичні рекомендації. – К., 2007. – 23 с.

2. Мавров Г.И. Хламидийные инфекции: биология возбудителей, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика. – К.: Медицина, 2006. – 524 с.

3. 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.

4. Цыганенко 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.

5. Цыганенко А.Я., Минухин В.В., Васильченко В.Н., и др. // Тез. докл. Всесоюз. конф. "Наука и производство в решении комплексной проблемы "Антибиотики". – М., 1989. – С. 124.

6. Husain Al-Awadhi, Gerald V. Stokes and Melvin Reich/Inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth in mouse fibroblasts by liposome-encapsulated tetracycline // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 1992. – 30. – P. 303-311.

7. Ivanova N.N., Kaplun A.P., Shvets V.I. et al. Abstracts of 24th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, Proceeding. – Stokgolm, 1997. – P. 757-758.

8. Sangare L., Morisset R., Ravaoarinaro M. In-vitro anti-chlamydial activities of free and liposomal tetracycline and doxycycline // *The Journal of Medical Microbiology*. – 1999. – 48. – P. 689-693.

9. Yadunanda Kumar, Jordan Cocchiario, Raphael H. Valdivia. The Obligate Intracellular Pathogen *Chlamydia trachomatis* Targets Host Lipid Droplets // *Current Biology*. – 2006. – 16. – P. 1646-1651.

ЛИПОСОМАЛЬНЫЙ ЦИПРОФЛОКСАЦИН В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЛЕЧЕНИИ ХЛАМИДИОЗА

Резюме

Липосомы, полученные из смеси полярных липидов с ципрофлоксацином, проявляют антихламидийную активность в отношении *Chlamydia trachomatis*. Использование липосомальных форм ципрофлоксацина для лечения хламидиоза позволяет уменьшить его терапевтическую дозу в 20 раз при применении отрицательно заряженных липосом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **ципрофлоксацин, липосомы, Chlamydia trachomatis.**

N.M. Ivanova

INSTITUTE OF DERMATOLOGY AND VENEREOLOGY OF ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES OF UKRAINE,
KHARKIV

LIPOSOMAL CIPROFLOXACIN FOR EXPERIMENTAL TREATMENT OF CHLAMYDIOSIS

Summary

The liposomes received from the mix polar lipids with the antibiotic ciprofloxacin show antichlamydia activity concerning *Chlamydia trachomatis*. The using of the liposomal ciprofloxacin for treating of chlamydiosis allows to reduce its therapeutic doze in 20 times at application of negatively charged liposomes.

KEY WORDS: **ciprofloxacin, liposomes, Chlamydia trachomatis.**

Отримано 22.06.10

Адреса для листування: Н.М. Иванова, вул. Танкопия, 7/1, кв. 12, Харків, 61060, Україна.

ВПЛИВ ГЛЮКОКОРТИКОЇДІВ НА ВМІСТ ГОМОЦИСТЕЇНУ В КРОВІ

Гіперглюкокортикоїдемію у щурів моделювали за допомогою дексаметазону і підтверджували за вмістом 17-кетостероїдів у сечі. У тварин, яким вводили дексаметазон, вміст гомоцистеїну в плазмі крові був в 1,7 раза вищим, ніж у контролі. Екзогенне введення фолієвої кислоти, ціанокобаламіну, бетаїну і піридоксину щурам паралельно з дексаметазоном частково запобігало гіпергомоцистеїнемії. Найкращий ефект спостерігався при застосуванні фолієвої кислоти і ціанокобаламіну. Зроблено висновок, що гіпергомоцистеїнемія, зумовлена збільшенням концентрації глюкокортикоїдів у крові, може бути важливим фактором ризику розвитку серцево-судинних ускладнень у пацієнтів із синдромом гіперкортицизму.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: глюкокортикоїди, гомоцистеїн, вітаміни В₉, В₁₂, В₆, бетаїн.

ВСТУП. Високий рівень гомоцистеїну і кортизолу є фактором ризику розвитку ряду патологічних станів. Зокрема, надлишок ендогенних глюкокортикоїдів асоціюється з протромботичним станом, що зумовлює у пацієнтів із синдромом Кушинга ризик виникнення артеріального чи венозного тромбозу [5]. Синдром Кушинга характеризується рядом біохімічних показників і клінічних проявів, як-от ожирінням, гіпертензією, розладами метаболізму глюкози, що є факторами ризику розвитку атеросклерозу і можуть призводити до гіперкоагуляції. З іншого боку, добре відомо, що підвищення в крові концентрації гомоцистеїну – серйозний фактор ризику виникнення захворювань серцево-судинної системи і венозного тромбозу. Баланс між гомоцистеїном і таурином є критичним для розвитку дисфункції ендотелію та атеросклерозу. Крім васкулярних розладів, дисбаланс тіолів асоціюється також із хворобою Альцгеймера, раком і рядом інших захворювань.

На сьогодні існують суперечливі дані про вплив глюкокортикоїдів на метаболізм сірковмісних амінокислот. Зокрема в роботі [5] було показано, що гіперкортизолемія є незалежним фактором, що призводить до гіпергомоцистеїнемії при синдромі Кушинга. Суперечливі також дані про вплив збільшеного вмісту кортизолу на рівень інших сірковмісних амінокислот – цистеїну і таурину – в пацієнтів із синдромом Кушинга. Фактично, як підвищення, так і зниження рівня гомоцистеїну було зафік-

совано при довготривалому лікуванні кортико-стероїдами пацієнтів з аутоімунними захворюваннями [2]. З іншого боку, показано, що у щурів, яким вводили кортизол, рівень гомоцистеїну в плазмі був меншим, ніж у контролі [3]. Глюкокортикоїди підвищують активність бетаїн-гомоцистеїнметилтрансферази, яка трансформує гомоцистеїн у метіонін з використанням бетаїну як донора метильної групи [4]. Більше того, стероїди можуть викликати геномне інгібування деяких цитокінів, призводячи до підвищеної доступності вітаміну В₆.

Отже, надзвичайно важливими й актуальними є розуміння механізмів регуляції біохімічних реакцій обміну сірковмісних амінокислот, дослідження взаємозв'язку між обміном сірковмісних амінокислот і глюкокортикоїдним статусом організму. Важливим є також питання вивчення можливості корекції порушень обміну сірковмісних амінокислот при станах гіпер- або гіпокортицизму. Оскільки на сьогодні співвідношення між концентрацією в сироватці сірковмісних амінокислот гомоцистеїну і цистеїну та рівнем глюкокортикоїдів усе ще залишається недослідженим, це стало метою нашої роботи.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди виконано на 56 безпородних щурах-самцях масою 150-180 г, яких утримували на стандартній дієті. Усіх тварин поділили на 6 груп: 1-ша – контроль (інтактні щури); 2-га – тварини, в яких викликали гіперглюкокортикоїдемію (щоденно протягом 7 днів вводили по 4 мг/кг дексаметазону внутрішньочеревно); 3-тя – щури, яким вводили дексаметазон і вітаміни В₉ (2 мг/кг щоден-

но протягом тижня) та V_{12} (0,2 мг/кг щоденно протягом тижня); 4-та – дексаметазон + бетаїн (20 мг/кг щоденно протягом тижня); 5-та – дексаметазон + V_6 (10 мг/кг щоденно протягом тижня); 6-та – дексаметазон + V_9 + V_{12} + бетаїн + V_6 . На 7-му добу щурів декапітували під легким ефірним наркозом і в сироватці крові визначали загальний вміст гомоцистеїну імуноферментним методом з використанням набору фірми “Axis-Shield” (Великобританія). Для підтвердження синдрому гіперкортицизму й оцінки ступеня гіперглюкокортикоїдемії в сечі визначали вміст 17-кетостероїдів за їх реакцією з метадинітробензолом [1].

Результати виражали як середнє+SEM з 8 експериментів. Зміни $p < 0,05$ розглядали як статистично достовірні. Статистичний аналіз виконували, використовуючи стандартні статистичні програми і t-критерій Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Стан гіперкортицизму ми моделювали шляхом семиразового введення щурам дексаметазону. Як видно з рисунка 1, таке введення призвело до збільшення концентрації в сечі 17-кетостероїдів у 3,5 раза (з $(4,66 \pm 0,24)$ до $(16,52 \pm 0,86)$ мкг/мл).

У щурів, яким вводили гормон, мав місце значно вищий, ніж у контролі, рівень гомоцистеїну в плазмі крові ($(6,88 \pm 0,08)$ проти $(3,98 \pm 0,05)$ мкмоль/л). Подібні результати спостерігалися і в роботі [5]. У пацієнтів з активним синдромом Кушинга, який характеризується збільшенням вмісту глюкокортикоїдів у плазмі, вміст гомоцистеїну зростає в 1,5 раза порівняно з контролем. Автори пов'язують це з тим фактом, що у пацієнтів з гіперглюкокорти-

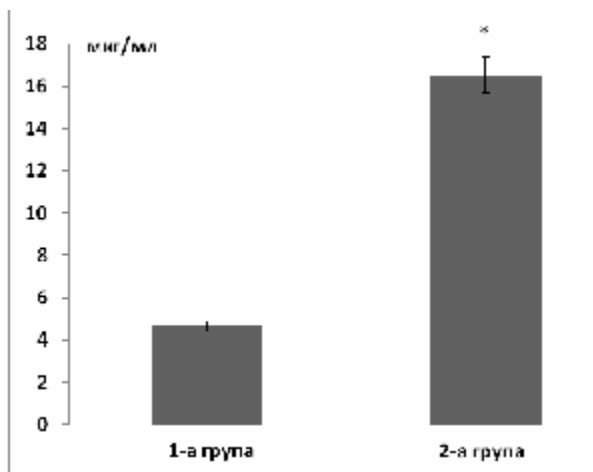


Рис. 1. Вміст 17-кетостероїдів у сечі щурів, яким вводили дексаметазон.

Примітка. * – зміни достовірні порівняно з контрольною групою (1-ша група) тварин.

коїдемією статистично достовірно знижувався вміст фолієвої кислоти в крові. Як відомо, фолієва кислота необхідна для процесу реметилування, при якому гомоцистеїн перетворюється на метіонін гомоцистеїнметилтрансферазою, що як кофермент використовує вітамін V_{12} і переносить метильну групу 5-метилтетрагідрофолату на гомоцистеїн. Доказом того, що саме зниження фолату при синдромі Кушинга є причиною гіпергомоцистеїнемії, можуть бути і результати наших досліджень, які свідчать про те, що при застосуванні фолієвої кислоти і ціанокобаламіну вміст гомоцистеїну в щурів, яким вводили дексаметазон, суттєво зменшувався (з $(6,88 \pm 0,08)$ до $(4,39 \pm 0,66)$ мкмоль/л) (рис. 2).

Ще одним шляхом реметилування гомоцистеїну в метіонін є незалежне від вітаміну V_{12} перенесення метильної групи бетаїну на гомоцистеїн з участю бетаїн-гомоцистеїнметилтрансферази, яке відбувається в печінці та нирках. На нашій моделі гіперкортицизму семиразове щоденне введення бетаїну в дозі 20 мг/кг призвело до зниження рівня гомоцистеїну в плазмі крові в 1,4 раза (рис. 2). Це, можливо, зумовлено тим фактом, що, як і у випадку з фолієвою кислотою, збільшення концентрації глюкокортикоїдів у крові викликає зменшення вмісту бетаїну в організмі. Відомо, що глюкокортикоїди потужно активують процеси трансамінування і декарбоксилювання амінокислот, а також процеси глюконеогенезу, в тому числі й перетворення амінокислот на вуглеводи. Оскільки бетаїн є похідним амінокислоти, то теоретично можливим є виснаження його пулу в організмі за умови гіперглюкокортикоїдемії.

Іншим біохімічним шляхом, що призводить до зниження в організмі рівня гомоцистеїну, є шлях транссульфування, в якому гомоцистеїн конденсується із серином з утворенням цистатіоніну в реакції, що каталізується піридоксиназовим ферментом цистатіонін-бета-синтетазою, а цистатіонін далі руйнується ще одним вітаміном V_6 -залежним ферментом гамма-цистатіоназою до цистеїну. Тому цікаво було дослідити, чи екзогенне введення піридоксину приведе до зниження гіпергомоцистеїнемії, викликаній глюкокортикоїдами. Як видно з рисунка 2, при семиразовому введенні тваринам з гіперглюкокортикоїдемією вітаміну V_6 спостерігалася тенденція до зменшення рівня гомоцистеїну, проте при статистичному аналізі ці зміни виявилися недостовірними. Очевидно, шлях транссульфування гомоцистеїну при введенні дексаметазону не страждає так виражено, як шлях реметилування.

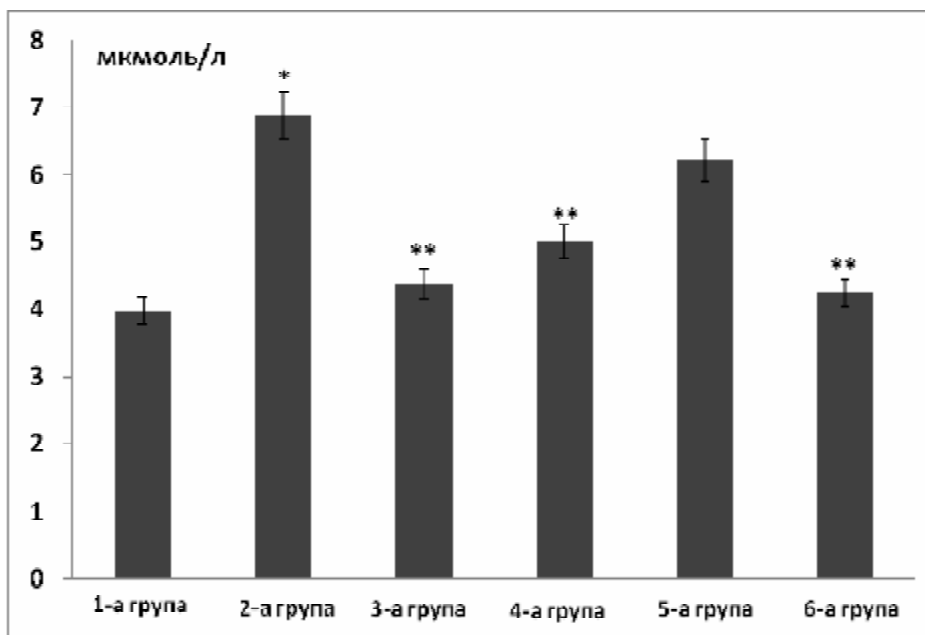


Рис. 2. Вміст гомоцистеїну в плазмі крові щурів, яким вводили дексаметазон і комбінації вітамінів.

Примітка. * – зміни достовірні порівняно з контрольною групою (1-ша група) тварин; ** – зміни достовірні порівняно з некоригованою групою тварин, яким вводили дексаметазон (2-га група).

Найбільшою мірою (в 1,7 раза) вдалося нормалізувати вміст гомоцистеїну в плазмі крові щурів із синдромом гіперкортицизму при поєднаному застосуванні фолієвої кислоти, ціанкобаламіну, бетаїну і піридоксину, хоча ефективність такої комбінації засобів була не набагато вищою від використання тільки фолієвої кислоти і ціанкобаламіну.

ВИСНОВКИ. 1. Збільшення концентрації глюкокортикоїдів у крові призводить до гіпергомо-

цистеїнемії, що може бути важливим фактором ризику розвитку серцево-судинних ускладнень у пацієнтів із синдромом гіперкортицизму.

2. Гіпергомоцистеїнемія при підвищенні рівня глюкокортикоїдів, найімовірніше, зумовлена зниженням вмісту в організмі фолієвої кислоти і бетаїну, що призводить до порушень процесів реметилування гомоцистеїну.

3. Екзогенне введення вітамінів B₉, B₁₂, B₆ і бетаїну позитивно впливає на рівень гомоцистеїну при гіперглюкокортикоїдемії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – С. 251-253.
2. Lazzerini P.E., Capecchi P.L., Bisogno S., Galeazzi M. Reduction in plasma homocysteine level in patients with rheumatoid arthritis given pulsed glucocorticoid treatment // *Ann. Rheum. Dis.* – 2003. – **62**. – P. 694-695.
3. Kim M.H., Kim E., Passen E.L., Meyer J. Cortisol and estradiol: nongenetic factors for

hyperhomocyst(e)inemia // *Metabolism.* – 1997. – **46**. – P. 247-249.

4. Mudd S.H., Levy H.L., Skovby F. Disorders of transsulfuration. In: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., et al. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* – New York: McGraw-Hill, 1995. – P. 1279-1327.

5. Terzolo M., Allasino B., Bosio S. et al. Hyperhomocysteinemia in Patients with Cushing's Syndrome // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* – 2004. – **89**, № 8. – P. 3745-3751.

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ НА СОДЕРЖАНИЕ ГОМОЦИСТЕИНА В КРОВИ

Резюме

Гиперглюкокортикоидемию у крыс моделировали при помощи дексаметазона и подтверждали по содержанию 17-кетостероидов в моче. У животных, которым вводили дексаметазон, содержание гомоцистеина в плазме крови повышалось в 1,7 раза по сравнению с контролем. Экзогенное введение фолиевой кислоты, цианокобаламина, бетаина и пиридоксина крысам параллельно с дексаметазоном частично предупреждало гипергомоцистеинемию. Наилучший эффект наблюдался при применении фолиевой кислоты и цианокобаламина. Сделан вывод, что гипергомоцистеинемия, вызванная увеличением концентрации глюкокортикоидов в крови, может быть важным фактором риска развития сердечно-сосудистых осложнений у пациентов с синдромом гиперкортицизма.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глюкокортикоиды, гомоцистеин, витамины B₉, B₁₂, B₆, бетаин.

V.M. Nechyporuk¹, M.M. Korda²
M.I. PYROHOV VINNYTSA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY¹
I.YA. HORBACHEVSKY TERNOPII STATE MEDICAL UNIVERSITY²

THE EFFECT OF GLUCOCORTICOIDS ON THE HOMOCYSTEINE LEVEL IN BLOOD

Summary

Hyperglucocorticoidemia was modulated in rats by dexamethasone and confirmed by the level of 17-ketosteroids in urine. Dexamethasone caused 1,7 times increase of homocysteine level in blood plasma in comparison with control. Exogenic administration of folic acid, cyanocobalamine, betaine and pyridoxine together with dexamethasone partially prevented hyperhomocysteinemia development. The best effect was observed after using of folic acid and cyanocobalamine. It has been concluded that hyperhomocysteinemia caused by the increase of glucocorticoids concentration in blood can be an important risk factor of the development of cardiovascular disorders in patients with Cushing's syndrome.

KEY WORDS: glucocorticoids, homocysteine, vitamins B₉, B₁₂, B₆, betaine.

Отримано 24.09.10

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

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗИ ТА АМІНОГУАНІДИНУ НА ПЕРЕБІГ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ У ПЕЧІНЦІ ПРИ ГОСТРОМУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ПАНКРЕАТИТІ

В експериментах на нелінійних білих щурах-самцях вивчено вплив комбінованого застосування препарату рекомбінантної супероксиддисмутази рексоду та інгібітора індукцибельної NO-синтази аміногуанідину на деякі показники функціонального стану печінки за умов гострого експериментального панкреатиту. При введенні рексоду в поєднанні з аміногуанідином встановлено більш суттєве відновлення активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи, ферментів дихального ланцюга мітохондрій, зниження інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів у печінці, нормалізацію концентрації інтерлейкіну-6, зниження активності α -амілази, лужної фосфатази, маркерних ферментів цитолізу в сироватці крові, ніж при окремому застосуванні аміногуанідину і рексоду.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гострий експериментальний панкреатит, печінка, оксид азоту, рекомбінантна супероксиддисмутаза, аміногуанідин.

ВСТУП. Гострий панкреатит (ГП) – одна з актуальних проблем сучасної медицини. До факторів, які сприяють розвитку ГП, відносять: порушення харчування, гіподинамію, ускладнення після отруєння хімічними речовинами та лікарськими засобами, недостатні заходи профілактики захворювань підшлункової залози (ПЗ) [18]. Незважаючи на застосування сучасних технологій у діагностиці та лікуванні ГП, смертність залишається незмінно високою і становить 13-15 %, а при панкреонекрозі досягає 85 % [16, 18, 20].

За даними літератури, клітинні механізми виникнення і перебігу ГП активуються за допомогою медіаторів (цитокінів) поліморфноядерних лейкоцитів і мононуклеарних макрофагів [16, 17]. Встановлено, що мембрана ацинозних клітин ПЗ має спеціальні рецептори до фактора некрозу пухлин-альфа (ФНП- α), який стимулює апоптоз клітин ПЗ, активує макрофаги, індукує утворення білків гострої фази запалення, синтез оксиду азоту (NO), активних форм кисню в нейтрофільних гранулоцитах, які зумовлюють пошкодження навколишніх тканин [17]. Експресія цитокінів не обмежується тільки ПЗ, а поширюється на інші органи і системи [16]. Активація лейкоцитів при ГП найшвидше відбувається у печінці, що, ймовірно, пов'язано з розповсюдженою ендотеліальною дисфункцією [20, 23].

У літературі останніх років досить широко обговорюється роль NO, який бере участь у багатьох фізіологічних і патологічних процесах, є одним із найбільш важливих біологічних медіаторів [3, 11, 14, 25, 27]. Проте рівень синтезу NO при експериментальному ГП може знижуватись або підвищуватись [11, 14, 28]. Особлива увага панкреатологів спрямована на вивчення порушень панкреатичної мікроциркуляції, однією з важливих ланок якої є система NO. Зростання продукції NO під впливом високого вмісту ендотоксинів і цитокінів підсилює пошкоджувальну дію останніх, сприяє розвитку системної реакції організму на запалення [3, 14, 17]. На експериментальних моделях показано, що гепатоцити людини можуть синтезувати індукцибельну NO-синтазу (iNOS) у відповідь на дію прозапальних цитокінів [3, 23]. Надмірний синтез прозапальних цитокінів при ГП спричиняє виникнення органної дисфункції [13], яка при набряковому ГП виникає у 10 % випадків, при панкреонекрозі – у 54 % [5].

У результаті наших попередніх досліджень [15] встановлено, що при ГП рівень синтезу NO зростає у тканинах печінки, нирок та сироватці крові. Роль NO в патогенезі ГП зумовлена як прямою, так і опосередкованою дією [27]. У механізмах пошкоджувальної дії NO при цій патології може відігравати роль утворення високоагресивного пероксинітриду (ONOO⁻) в результаті взаємодії NO з активним радикалом

кисню супероксиданіоном (O_2^-). Оскільки знешкодження O_2^- відбувається з участю супероксиддисмутази, підґрунтям для прискорення утворення токсичного $ONOO^-$ може бути недостатня активність даного ферменту [1, 26].

Незважаючи на велику кількість публікацій [11, 14, 25, 27, 28], немає єдиної точки зору щодо впливу NO на перебіг метаболічних процесів у печінці за умов ГП.

Таким чином, мета дослідження – з'ясувати роль системи оксиду азоту, вивчивши вплив інгібітора індукцибельної NO-синтази аміногуанідину та перехоплювача супероксиданіон-радикала препарату рекомбінантної супероксиддисмутази рексоду при їх окремому і комбінованому застосуванні на перебіг деяких метаболічних процесів у печінці та рівень прозапальних цитокінів у сироватці крові при гострому експериментальному панкреатиті.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на нелінійних білих щурах-самцях масою 170-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Піддослідних тварин поділили на 5 груп: 1-ша (контроль) – несправжньооперовані тварини, яким проводили серединну лапаротомію; 2-га (контрольна патологія) – тварини з ГП, який моделювали за методом С.О. Шалімова [21]; 3-5 групи – тварини з ГП, яким вводили, відповідно, препарат рекомбінантної супероксиддисмутази – рексод (ВАТ “РЭСБИО”, Росія, 0,05 мг/кг), аміногуанідин (“Химлабораторреактив”, Україна, 10 мг/кг) та рексод у поєднанні з аміногуанідином. У 3-5 групах препарати вводили внутрішньоочеревинно один раз на день упродовж 7 днів перед моделюванням ГП та однократно через 12 год після моделювання ГП. Тварини контрольних груп отримували внутрішньоочеревинно ідентичні об'єми розчинника. По 6 щурів з кожної групи, за умов тіопентал-натрієвого наркозу, виводили з експерименту через 1, 2 та 7 днів після моделювання ГП. Для дослідження використовували гомогенати печінки та сироватку крові.

Визначали: у сироватці крові – концентрацію інтерлейкіну-6 (ІЛ-6) та ФНП- α (методом імуноферментного аналізу, використовуючи стандартний набір реактивів), активність α -амілази, лужної фосфатази (ЛФ), аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ) (із застосуванням стандартних наборів ТОВ НВП “Філісіт-Діагностика”, Україна); у гомогенатах тканини печінки – активність супероксиддисмутази (СОД) [19], каталази (КАТ) [12], сукцинатдегідрогенази (СДГ) [7],

цитохромоксидази (ЦХО) [9], вміст гідроперексидів ліпідів (ГПЛ) [4], ТБК-активних продуктів (ТБК-АП) [2], відновленого глутатіону (G-SH) [24], нітрит-аніона (NO_2^-) [22].

Роботу виконували відповідно до Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2000) та узгоджених з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986). Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою комп'ютерної програми Excel з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Цитокіни, які є продуктами активованих мононуклеарних фагоцитів і ендотеліальних клітин, беруть участь у розвитку ендогенної інтоксикації, синдрому системної запальної відповіді, оксидативного стресу, а також активації цілого каскаду імунологічних реакцій [16]. Встановлено зростання концентрації ФНП- α у сироватці тварин з ГП вже на 1-шу добу експерименту в 27 разів, вона продовжувала підвищуватись на 2-гу та 7-му доби експерименту в 34 і 37 разів відповідно порівняно з несправжньооперованими щурами (табл. 1). Особливе значення при вивченні розвитку ГП має ІЛ-6, який може посилювати цитотоксичну дію Т-лімфоцитів відносно ацинарних клітин ПЗ, сприяє зростанню нейтрофілів у крові, стимулює синтез у печінці всіх основних білків гострої фази [5]. У групі тварин з ГП спостерігалось максимальне підвищення концентрації ІЛ-6 через 24 год з моменту моделювання ГП у 102 рази (табл. 1) порівняно з контрольною групою. На 2-гу і 7-му доби експерименту встановлено зростання концентрації ІЛ-6 у 6 та 5 разів порівняно з контролем.

Аналіз одержаних даних свідчить про те, що в сироватці крові тварин з ГП спостерігалось підвищення активності α -амілази через 1, 2 та 7 днів після охолодження ПЗ у 5,9, 7,3 і 9,5 рази відповідно (табл. 2) порівняно з показниками щурів контрольної групи, що підтверджує адекватність обраної моделі ГП, оскільки даний фермент є маркером ГП [8]. На розвиток процесів цитолізу в печінці вказувало зростання активності АлАТ (на 27, 20 та 40 %), АсАТ (на 66, 91 та 88 %) відповідно до термінів експерименту. Встановлено підвищення активності ЛФ (у 2,0, 2,8 та 2,4 рази) порівняно з контролем. Одночасно в печінці тварин відмічено активацію вільнорадикальних

Таблиця 1 – Показники концентрації ФНП- α та ІЛ-6 у сироватці крові щурів при гострому експериментальному панкреатиті та призначенні аміногуанідину і рексоду ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Термін	Група тварин				
		Контроль	ГП	ГП+ рексод	ГП+ аміногуанідин	ГП+аміногуанідин+ рексод
ІЛ-6, нг/л	1 д.	12,37 \pm 1,17	1265,33 \pm 49,17*	681,25 \pm 61,27**	1090,00 \pm 40,70**	38,15 \pm 3,23**
	2 д.	–//–	69,22 \pm 6,56*	–	–	35,82 \pm 2,37**
	7 д.	–//–	66,1 \pm 4,54*	–	–	78,87 \pm 7,56
ФНП- α , нг/л	1 д.	4,75 \pm 0,33	129,67 \pm 4,46*	–	–	153,93 \pm 7,36**
	2 д.	–//–	161,7 \pm 13,17*	–	–	152,95 \pm 0,61
	7 д.	–//–	174,85 \pm 13,27*	221,03 \pm 13,97**	212,8 \pm 11,86	183,42 \pm 7,53

Примітки. У цій і наступних таблицях достовірна різниця ($p \leq 0,05$):

- * – відносно контролю.
- ** – відносно ГП.

Таблиця 2 – Показники активності α -амілази, амінотрансфераз та лужної фосфатази у сироватці крові при гострому експериментальному панкреатиті та його корекції ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Термін	Дослідна група				
		Контроль	ГП	ГП+рексод	ГП+ аміногуанідин	ГП+ аміногуанідин+ рексод
α -амілаза, мг/(с·л)	1 д.	19,9 \pm 0,86	118,17 \pm 1,04*	97,00 \pm 2,66**	97,15 \pm 3,17**	88,02 \pm 3,16**
	2 д.	18,57 \pm 0,56	136,33 \pm 3,99*	94,67 \pm 4,41**	96,63 \pm 7,92**	71,35 \pm 1,67**
	7 д.	19,07 \pm 0,41	180,3 \pm 11,66*	131,7 \pm 3,77**	89,68 \pm 2,90**	120,8 \pm 2,67**
АлАТ, ммоль/(год·л)	1 д.	4,40 \pm 0,04	5,57 \pm 0,11*	4,98 \pm 0,07**	4,79 \pm 0,10**	4,19 \pm 0,12**
	2 д.	4,19 \pm 0,09	5,02 \pm 0,11*	3,48 \pm 0,08**	4,21 \pm 0,12**	4,48 \pm 0,13**
	7 д.	4,28 \pm 0,11	5,99 \pm 0,13*	5,12 \pm 0,07**	4,73 \pm 0,12**	4,33 \pm 0,05**
АсАТ, ммоль/(год·л)	1 д.	13,05 \pm 0,38	21,8 \pm 0,44*	19,7 \pm 0,29**	19,53 \pm 0,48**	16,83 \pm 0,41**
	2 д.	10,66 \pm 0,41	20,33 \pm 0,61*	18,54 \pm 0,20**	12,08 \pm 0,61**	13,56 \pm 0,99**
	7 д.	11,92 \pm 0,32	22,39 \pm 0,34*	17,75 \pm 0,57**	15,96 \pm 0,46**	14,27 \pm 0,35**
Лужна фосфатаза, ммоль/(год·л)	1 д.	21,85 \pm 0,52	43,73 \pm 0,39*	43,67 \pm 1,15	40,67 \pm 1,14**	34,07 \pm 0,64**
	2 д.	16,81 \pm 1,29	47,08 \pm 2,62*	30,12 \pm 0,73**	17,88 \pm 0,08**	29,17 \pm 2,05**
	7 д.	18,24 \pm 0,90	43,36 \pm 0,42*	36,38 \pm 1,87**	25,45 \pm 1,25**	32,74 \pm 0,55**

процесів: збільшувався вміст ГПЛ (на 71, 107 та 143 %) (табл. 3), ТБК-АП (на 103, 68, 141 %) відповідно на 1-шу, 2-гу і 7-му доби розвитку ГП відносно контролю. Встановлено достовірне зниження активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи (АОС): СОД (на 35, 59 і 68 %), КАТ (на 22, 40 і 51 %) та G-SH (на 24, 39 і 61 %) порівняно з контрольною групою. Під час вивчення порушення функціонування дихального ланцюга мітохондрій при ГП встановлено, що активність СДГ у печінці зменшувалась на 42, 15 і 50 % (табл. 4), ЦХО – на 21, 20 і 37 % відповідно на 1-шу, 2-гу та 7-му доби досліді. Вказані зміни супроводжувались зростанням рівня NO₂⁻ у печінці (на 21, 12 і 62 %) відповідно до термінів дослідження.

На фоні застосування рексоду встановлено зниження концентрації ІЛ-6 на 46 % (1-ша доба). Концентрація ФНП- α зростала на 26 % (7-ма доба) порівняно з показниками тварин

із ГП у відповідні терміни. Перехоплювач супероксиданіон-радикала препарат рексод сприяв зниженню активності α -амілази (на 18, 31 та 27 %) відповідно на 1-шу, 2-гу і 7-му доби експерименту порівняно з показниками групи тварин із ГП, що свідчить про зменшення ступеня ураження ПЗ. Спостерігалось зниження активності цитолітичних АлАТ (на 11, 31 та 15 %), АсАТ (на 9, 9 та 21 %) відповідно в 1-й, 2-й і 3-й терміни досліді порівняно з контрольною патологією. Активність ЛФ достовірно знижувалась на 36 та 16 % відповідно через 2 і 7 діб після моделювання ГП. Ці процеси супроводжувались послабленням активності процесів переокиснення мембранних ліпідів у печінці: зменшувався вміст ГПЛ (на 23, 38 та 35 %) і ТБК-АП (на 16, 33 та 23 %) відповідно до термінів досліді. Про активацію системи антиоксидантного захисту на фоні застосування рексоду свідчило підвищення активності

Таблиця 3 – Показники системи прооксиданти-антиоксиданти у печінці при гострому експериментальному панкреатиті та його корекції ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Термін	Дослідна група				
		Контроль	ГП	ГП+рексо	ГП+аміногуанідин	ГП+аміногуанідин+рексо
СОД, ум. од./кг	1 д.	3,15±0,08	2,05±0,02*	3,06±0,14**	2,88±0,04**	3,65±0,13**
	2 д.	3,57±0,07	1,46±0,08*	3,00±0,05**	2,31±0,03**	2,75±0,07**
	7 д.	3,69±0,08	1,16±0,08*	2,19±0,13**	2,22±0,11**	2,95±0,18**
КАТ, мкат/кг	1 д.	9,89±0,12	7,73±0,03*	8,96±0,16**	8,29±0,02**	9,65±0,09**
	2 д.	10,65±0,66	6,44±0,28*	9,60±0,23**	9,22±0,41**	10,20±0,05**
	7 д.	10,25±0,07	4,97±0,08*	7,78±0,13**	8,47±0,20**	9,89±0,10**
G-SH, ммоль/кг	1 д.	4,41±0,08	3,34±0,05*	3,76±0,09**	3,92±0,04**	4,28±0,11**
	2 д.	4,02±0,03	2,45±0,07*	3,62±0,06**	3,40±0,02**	3,96±0,17**
	7 д.	4,13±0,05	1,61±0,04*	2,40±0,04**	3,01±0,04**	3,51±0,09**
ГПЛ, 10 ³ ум. од./кг	1 д.	5,2±0,08	8,90±0,12*	6,88±0,06**	6,53±0,01**	5,40±0,08**
	2 д.	4,1±0,12	8,50±0,49*	5,27±0,11**	6,67±0,08**	5,04±0,11**
	7 д.	4,48±0,01	10,9±0,09*	7,07±0,17**	7,5±0,24**	6,07±0,32**
ТБК-АП, мкмоль/кг	1 д.	4,63±0,11	9,37±0,07*	7,84±0,06**	8,31±0,08**	5,77±0,23**
	2 д.	5,27±0,14	8,84±0,17*	5,96±0,13**	6,13±0,27**	5,47±0,06**
	7 д.	5,10±0,09	12,29±0,05*	9,41±0,27**	7,85±0,06**	5,88±0,17**

Таблиця 4 – Показники активності ферментів дихального ланцюга мітохондрій та вмісту NO_2^- у печінці при гострому експериментальному панкреатиті та його корекції ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Термін	Дослідна група				
		Контроль	ГП	ГП+рексо	ГП+аміногуанідин	ГП+аміногуанідин+рексо
NO_2^- , мкмоль/кг	1 д.	1,62±0,07	1,95±0,08*	1,77±0,01**	1,66±0,04**	1,73±0,04**
	2 д.	1,43±0,05	1,60±0,04*	1,31±0,06**	1,49±0,01**	1,41±0,04**
	7 д.	1,49±0,02	2,41±0,05*	1,86±0,07**	1,71±0,06**	1,80±0,11**
СДГ, ммоль/(кг·хв)	1 д.	6,94±0,05	4,03±0,06*	4,37±0,02**	5,55±0,04**	4,89±0,08**
	2 д.	6,57±0,08	5,55±0,04*	6,13±0,13**	5,99±0,13**	6,23±0,09**
	7 д.	7,25±0,11	3,65±0,02*	5,08±0,06**	6,41±0,08**	4,98±0,26**
ЦХО, ммоль/(кг·хв)	1 д.	7,15±0,17	5,67±0,13*	6,58±0,08**	6,63±0,25**	6,84±0,17**
	2 д.	7,73±0,26	6,15±0,18*	7,08±0,14**	7,43±0,04**	8,01±0,24**
	7 д.	7,53±0,15	4,74±0,14*	5,33±0,15**	7,08±0,13**	5,60±0,11**

СОД (на 49, 106 та 89 %) і КАТ (на 16, 49 та 56 %) відповідно через 1, 2 і 7 діб після моделювання ГП. Одночасно зростав вміст G-SH (на 12, 48 та 49 %) порівняно з контрольною патологією. Отримані результати можна пояснити тим, що антиоксиданти, перш за все СОД, гальмують процеси вільнорадикального окиснення на різних етапах генерації активних форм кисню, попереджуючи їх деструктивну дію [1, 6]. Встановлено підвищення активності мембранозв'язаних ферментів мітохондрій СДГ (на 8, 10 та 39 %) і ЦХО (на 16, 15 та 12 %) відповідно до термінів експерименту. Одночасно в гомогенатах печінки відбувалось зниження рівня NO_2^- (на 9, 18 та 23 %) відповідно на 1-шу, 2-гу і 7-му доби дослідження порівняно з показниками групи тварин із ГП.

Можна припустити, що позитивний вплив рексоду на стан печінки при ГП реалізується через постачання антиоксидантної системи активною формою СОД та нейтралізацію нею супероксидного аніон-радикала з наступним зменшенням утворення високоагресивного $ONOO^-$.

При введенні аміногуанідину відмічено зниження концентрації ІЛ-6 на 14 % (1-ша доба), а концентрація ФНП- α (7-ма доба) достовірно не змінювалась порівняно з показниками тварин із ГП. Відомо, що цитокини, зокрема ФНП- α , активуючи макрофаги, прискорюють синтез NO [16, 17]. Саме вторинністю патобіохімічних та патофізіологічних ефектів NO відносно системи прозапальних цитокінів можна пояснити відсутність впливу пригнічен-

ня синтезу оксиду азоту на рівень концентрації ФНП- α , що узгоджується з даними А.О. Лобенко та співавт. [11]. Результати дослідження показали, що на фоні введення селективного інгібітора iNOS аміногуанідину спостерігалось достовірне зниження активності α -амілази (на 18, 29 та 50 %) у сироватці крові на 1-шу, 2-гу і 7-му доби експерименту порівняно з показниками групи щурів із ГП. Це свідчить про те, що блокада утворення NO у наших дослідках під впливом аміногуанідину супроводжувалась зменшенням ступеня ураження підшлункової залози. Даний факт підтверджує тезу про роль активації iNOS та збільшення утворення NO в патогенезі ураження печінки при гострому панкреатиті [15]. Одночасно відбувалось зниження активності АлАТ (на 14, 16 та 21 %), АсАТ (на 10, 41 та 29 %) і ЛФ (на 7, 62 та 41 %) відповідно через 1, 2 та 7 діб після моделювання ГП. При застосуванні аміногуанідину відмічено пригнічення активності процесів переокиснення мембранних ліпідів у печінці: зниження вмісту ГПЛ (на 27, 22 та 31 %) і ТБК-АП (на 11, 31 та 36 %) на тлі зменшення рівня NO₂⁻ (на 15, 7 і 29 %) в усі терміни дослідження порівняно з контрольною патологією. Про активацію системи антиоксидантного захисту свідчило підвищення активності СОД (на 40, 58 та 91 %), КАТ (на 7, 43 та 70 %) і вмісту G-SH (на 17, 39 та 86 %) відповідно через 1, 2 і 7 діб після моделювання патологічного процесу в ПЗ. Встановлено зростання активності мітохондріальних СДГ (на 38, 8 та 75 %) і ЦХО (на 17, 21 та 49 %) відповідно на 1-шу, 2-гу і 7-му доби експерименту порівняно з показниками групи тварин із ГП.

При комбінованому застосуванні інгібітора iNOS аміногуанідину та рексоду спостерігалось зниження концентрації ІЛ-6 (на 97 та 48 %) на 1-шу і 2-гу доби розвитку ГП, на 7-му добу експерименту достовірних змін рівня ІЛ-6 не встановлено відносно контрольної патології. Концентрація ФНП- α під впливом поєданого застосування аміногуанідину та рексоду зростала на 19 % на 1-шу добу дослідження, проте на 2-гу та 7-му доби дослідження достовірно не змінювалась порівняно з показниками тварин 2-ї групи. Одночасно відбувалось зниження активності α -амілази (на 26, 48 та 33 %), АлАТ (на 25, 11 та 18 %), АсАТ (на 19, 33 та 31 %) і ЛФ (на 22, 38 та 24 %) відповідно на 1-шу, 2-гу і 7-му доби експерименту порівняно з показниками групи тварин із ГП. Встановлено зниження вмісту ГПЛ (на 39, 41 та 44 %) і ТБК-АП (на 38, 38 та 52 %) на тлі зменшення рівня NO₂⁻ у печінці (на 11, 12 та 25 %) в усі терміни дослідження порівняно з контрольною патологією.

Про активацію АОС свідчило підвищення активності СОД (на 78, 88 та 154 %), КАТ (на 25, 58 та 99 %) і вмісту G-SH (на 28, 62 та 117 %) відповідно через 1, 2 та 7 діб після охолодження ПЗ. Спостерігалось зростання активності мітохондріальних СДГ (на 21, 12 та 36 %) і ЦХО (на 21, 30 та 18 %) відповідно на 1-шу, 2-гу і 7-му доби експерименту порівняно з показниками групи тварин із ГП. Це свідчить про відновлення процесів окисного фосфорування та рівня синтезу макроергічних сполук [10].

Таким чином, у наших експериментах доведено можливість підвищення гепатопротекторної дії препарату СОД та інгібітора iNOS шляхом їх поєданого застосування при експериментальному гострому панкреатиті.

ВИСНОВКИ. 1. Гострий панкреатит у білих щурів супроводжується підвищенням концентрації прозапальних цитокінів (ІЛ-6, ФНП- α), активності α -амілази, маркерних ферментів цитолізу та холестази в сироватці крові, дисбалансом у системі прооксиданти-антиоксиданти, зменшенням активності мітохондріальних ферментів сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази, зростанням концентрації NO₂⁻ у печінці.

2. При застосуванні рексоду встановлено відновлення біохімічних показників систем прооксиданти-антиоксиданти та дихального ланцюга мітохондрій у печінці, зниження активності α -амілази, амінотрансфераз, лужної фосфатази у сироватці крові та різноспрямований вплив препарату на рівень ІЛ-6, ФНП- α та NO₂⁻ у досліджувані терміни.

3. Інгібітор індукцйбельної NO-синтази аміногуанідин проявляє гепатопротекторний ефект при гострому панкреатиті, зменшує прояви оксидативного стресу, відновлює активність антиоксидантної системи у печінці, рівень маркерних ферментів цитолізу і холестази в сироватці крові, що відбувається на тлі нормалізації процесів синтезу оксиду азоту та достовірного зниження активності α -амілази.

4. На фоні комбінованого застосування аміногуанідину та рексоду спостерігаються достовірне зниження концентрації ІЛ-6 на 1-шу і 2-гу доби розвитку ГП, зростання концентрації ФНП- α на 1-шу добу дослідження. Встановлено більш суттєве відновлення активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи, електроннотранспортного ланцюга мітохондрій, зниження інтенсивності процесів пероксидного окиснення ліпідів у печінці та синтезу оксиду азоту, зниження активності α -амілази, маркерних ферментів цитолізу та холестази в сироватці крові, ніж при окремому застосуванні аміногуанідину і рексоду.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Активні форми кисню та їх роль у метаболізмі клітин / М.І. Колісник, Г.В. Колісник, Є. Нідзюлка, В.В. Влізло // Біологія тварин. – 2009. – **11**, № 1-2. – С. 59-70.
2. Андреева Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41-43.
3. Бабак О.Я. Механизмы гепатопротекторного и токсического влияния азота оксида / О.Я. Бабак, Н.В. Ярмыш, Г.Ю. Панченко // Сучасна гастроентерологія. – 2006. – № 5 (31). – С. 76-84.
4. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В.Б. Гаврилов, М.И. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33-35.
5. Ганжий В.В. Современные методы оценки тяжести острого панкреатита / В.В. Ганжий, И.П. Колесник // Клін. хірургія. – 2008. – № 8. – С. 47-51.
6. Деримедвідь Л.В. Эффективность препаратов СОД различного происхождения при экспериментальном миокардите / Л.В. Деримедвідь // Ліки. – 2004. – № 5-6. – С. 64-68.
7. Ещенко Н.Д. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы / Н.Д. Ещенко, Г.Г. Вольский // Методы биохимических исследований. – Л. : Изд-во Ленинградского университета, 1982. – С. 207-210.
8. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике / В.С. Камышников – М. : МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.
9. Кривченкова Р.С. Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий / Р.С. Кривченкова; под ред. В.Н. Ореховича // Современные методы в биохимии. – М. : Медицина, 1977. – С. 47-49.
10. Кургалюк Н. Вплив L-аргініну і блокатора синтезу оксиду азоту L-NNA на показники енергозабезпечення мітохондрій міокарда мурчаків за умов гострої гіпоксії / Н. Кургалюк // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2002. – Вип. 29. – С. 177-186.
11. Лобенко А.О. NO-опосередковані механізми розвитку експериментального панкреатиту / А.О. Лобенко, В.М. Демидов, С.М. Демидов // Журнал АМН України. – 2002. – **8**, № 2. – С. 385-393.
12. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
13. Переяслов А.А. Патогенез острого панкреатиту: роль цитокинів і молекул адгезії / А.А. Переяслов, С.М. Чуклін // Клін. хірургія. – 2003. – № 1. – С. 32.
14. Попик М.П. Патогенетическое значение системы оксида азота при остром панкреатите / М.П. Попик, А.А. Федорович, Ю.П. Гниденко // Врач. практика. – 2005. – № 6. – С. 57-61.
15. Посохова К.А. Стан печінки та нирок при гострому експериментальному панкреатиті та застоюванні препарату супероксиддисмутази / К.А. Посохова, О.З. Яремчук // Мед. хімія. – 2009. – **11**, № 1. – С. 30-33.
16. Роль иммунологических нарушений при остром деструктивном панкреатите / Ю.С. Винник, Д.В. Черданцев, Н.М. Маркелова [и др.] // Сибир. мед. журн. – 2005. – № 1. – С. 5-8.
17. Роль цитокинов в патогенезе острого панкреатита / В.В. Крыжевский, М.Е. Ничитайло, Е.Б. Медвецкий [и др.] // Клін. хірургія. – 2000. – № 1. – С. 54-57.
18. Хомяк І.В. Хірургічне лікування гострого некротичного панкреатиту. Сучасний стан проблеми / І.В. Хомяк // Клін. хірургія. – 2009. – № 3. – С. 57-59.
19. Чевари С. Роль супероксиддисмутази в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678-681.
20. Чуклін С.М. Патогенез мікроциркуляційної і ендотеліної дисфункції при гострому панкреатиті / С.М. Чуклін, М.В. Либа, О.Б. Гранат // Шпит. хірургія. – 2007. – № 2. – С. 107-115.
21. Шалимов С.А. Руководство по экспериментальной хирургии / С.А. Шалимов, Ф.П. Радзиховский, Л.В. Кейсевич. – М. : Медицина, 1989. – 272 с.
22. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids / I.C. Green, A.W. Davie, J. Golawski [et al.] // Anal. biochem. – 1982. – **126**, № 1. – P. 131-138.
23. Chen T. Role of nitric oxide in liver injury / T. Chen, R. Zamora, B. Zuckerbraun // Curr. Mol. Med. – 2003. – № 3. – P. 519-526.
24. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – № 82. – P. 70-77.
25. Organ Microcirculatory Disturbances in Experimental Acute Pancreatitis. A Role of Nitric Oxide / M. Dobosz, S. Hac, L. Mionskowska [et al.] // Physiol. Res. – 2005. – **54**. – P. 363-368.
26. Pacher P. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease / P. Pacher, J.S. Beckman, L. Liaudet // Physiological Reviews. – 2007. – **87**. – P. 315-424.
27. The role of nitric oxide in edema formation in L-arginine-induced acute pancreatitis / T. Takacs, L. Czako, E. Morschl [et al.] // Pancreas. – 2002. – **25**, № 3. – P. 277-282.
28. The Role of Nitric Oxide in Experimental Cerulein Induced Pancreatitis / S.H. Um, Y.D. Kwon, C.D. Kim [et al.] // J Korean Med. Sci. – 2003. – **18**. – P. 520-526.

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗЫ И АМИНОГУАНИДИНА НА ТЕЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В ПЕЧЕНИ ПРИ ОСТРОМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАНКРЕАТИТЕ

Резюме

В экспериментах на нелинейных белых крысах-самцах изучено влияние комбинированного применения препарата рекомбинантной супероксиддисмутазы рексода и ингибитора индуцибельной NO-синтазы аминугуанидина на некоторые показатели функционального состояния печени при остром экспериментальном панкреатите. При введении рексода вместе с аминугуанидином установлено более существенное возобновление активности и содержания компонентов антиоксидантной системы, ферментов дыхательной цепи митохондрий, снижение интенсивности процессов перекисного окисления липидов в печени, нормализацию концентрации интерлейкина-6, снижение активности α -амилазы, щелочной фосфатазы, маркерных ферментов цитолиза в сыворотке крови, чем при отдельном применении аминугуанидина и рексода.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: острый экспериментальный панкреатит, печень, оксид азота, рекомбинантная супероксиддисмутаза, аминугуанидин.

O.Z. Yaremchuk

I.YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

THE INFLUENCE OF RECOMBINANT SUPEROXIDE DISMUTASE AND AMINO GUANIDINE ON THE METABOLIC PROCESSES IN THE LIVER AT ACUTE EXPERIMENTAL PANCREATITIS

Summary

On the rat model of acute pancreatitis the influence of combining usage of recombinant superoxide dismutase (recSOD) and blocker of inducible NO-synthase aminoguanidine on some indices of liver function was studied. Combining applying of recSOD and aminoguanidine improves more potently the antioxidant system biochemical indices, electrons' mitochondrial pathways enzymes and decreases the lipid peroxidation in the liver. We watched the decreasing of IL-6, serum α -amylase, alkaline phosphatase, cytolysis' enzymes more strongly in case of combining usage than single applying of recSOD and aminoguanidine.

Отримано 13.05.10

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

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

МІНЕРАЛЬНИЙ ПРОФІЛЬ ВОЛОСА ЛЮДИНИ В НОРМІ ТА ПРИ ПАТОЛОГІЇ

За допомогою скануючого електронного мікроскопа та рентгенівського мікроаналізу досліджували мінеральний склад різних структурних компонентів волоса людини в нормі та при дифузному телогеновому випаданні. Кількісно на поперечному зрізі волоса визначили вміст таких хімічних елементів, як O, Na, Mg, Al, Si, S, Cl, K, Ca. З досліджуваних елементів найбільша частка припадає на сірку, що в основному і визначає міжгрупові відмінності в хімічному стані волосся.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: волос людини, макро- і мікроелементи, кутикула, кортекс, серцевина.

ВСТУП. Волос є продуктом функціональної активності волосяного фолікула шкіри. Його ріст і розвиток, як і кератинізовані клітини загалом, були і надалі залишаються предметом інтенсивних досліджень. Останнім часом спостерігається особливо підвищений інтерес до вивчення біології волоса, що зумовлено значним прогресом у галузі косметичної індустрії, а також можливістю використання результатів досліджень у медицині, зокрема дерматології та судовій експертизі.

Загальновідомо, що волос практично на 90 % складається з білка кератину, характерною особливістю якого є високий вміст цистину [5]. Розмір волоса людини у діаметрі становить від 50 до 100 мкм, і морфологічно його можна розділити на такі структурні компоненти, як кутикула, кортекс і серцевина. Остання, діаметр якої коливається в межах 5-10 мкм, локалізується переважно у центральній частині волоса, складається з упакованих вільно, кератинізованих клітин і за характером буває суцільною або фрагментованою чи відсутня взагалі [1, 2]. Кортекс становить основну масу волоса (45-90 мкм) і утворюється видовженими веретеноподібними клітинами, оточеними клітинно-мембранним комплексом (КМК). Кортикальні клітини мають внутрішньофібрилярну структуру у вигляді протофібрил діаметром приблизно 10 нм, які, у свою чергу, формують макро- і мікрофібрили, занурені у матрикс, який багатий на сірку [6].

Зовнішній шар волоса – кутикула, менш ніж 5 мкм у товщину, у свою чергу, складається із 4 структурних компонентів, відмінних між собою перш за все за хімічним складом. Зокрема, А-шару і екзокутикулі властиві високий

вміст цистину та гідрофобний характер [7]. Ендокутикула складається з некератинового матеріалу, який у більшості випадків розчинний у воді. Епікутикула – тонкий гідрофобний шар (2,5 нм), який вкриває кутикулу і складається в основному з 18-метилейкозенової кислоти, зв'язаної з протеоліпідною мембраною, яка також багата на цистин. КМК, що міститься в кутикулі, має гідрофільну природу і багатий на полярні амінокислоти та лізин. КМК і ендокутикула – це головні шляхи дифузії різних речовин всередину волоса [4, 6].

Хімічний склад волоса людини, як і ссавців взагалі, вивчали різними методами, включаючи дифракцію рентгенівських променів, гістохімію, різноманітні спектрофотометричні методи. Однак слід зауважити, що жоден з цих методів не може вповні відобразити хімічний склад поперечного зрізу волоса. Саме тому метою даної роботи було частково заповнити цю прогалину, порівнявши мінеральний склад волосся у нормі та при патології.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для аналізу було відібрано зразки нефарбованого волосся жінок 35-40-річного віку, які, за даними трихограм, розділили як норму (співвідношення волосся у фазу анаген/телоген становило 8:2, n=5) та патологію – дифузне телогенове випадання (співвідношення анаген/телоген складало 5,5:4,5, n=5). Для отримання поперечних зрізів волоса його попередньо промивали і знежирені спиртом волосини поміщали в отвори спеціально виготовленої мідної касети діаметром 25 мм і висотою 8 мм. У кожен отвір діаметром 1,5 мм вносили по 10 волосин і заповнювали епоксидною смолою. Після затвердіння смоли поверхню касети шліфували і полірували. Кінцева обробка по-

© В.В. Гавриляк, 2010.

лягала у промиванні касети та напиленні вуглецевої плівки товщиною 250 Å, яка забезпечувала проходження електричного заряду, що виникав під дією електронного пучка. Дослідження, виконані за допомогою електронного растрового мікроскопа REMMA-102, дозволяють не тільки провести локальний хімічний аналіз зразка, але й також оцінити розподіл макро- і мікроелементів у різних структурних компонентах, тобто кутикулі, кортексі й серцевині волоса.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На рисунку 1 зображено поперечний зріз волоса людини. На ньому чітко видно кутикулу, кортекс, який становить основну масу волоса, а також елементи серцевини.

У нашому випадку якісним аналізом у волосі виявлено такі елементи: O, Na, Mg, Al, Si, S, Cl, K, Ca. Як видно з наведених у таблиці 1 даних, серед досліджуваних елементів найбільша частка припадає на сірку, кисень, хлор і найменша – на калій, кальцій та магній. Слід зауважити, що така закономірність щодо їх кількісного складу характерна як для здорового, так і для патологічного волоса.

Що стосується насичення структури волоса елементами, то тут простежуються певні особливості, які вказують на його неоднорідність. Зокрема, такі елементи, як Na, Mg, Al, K, Cl, розподілені рівномірно по всьому поперечному зрізі, до того ж однаково як у нормі, так і при патології. Решта досліджуваних елементів мають дещо інший характер розподілу.

Таблиця 1 – Вміст мінеральних елементів у волосі, %

Назва елемента	Норма	Патологія
Кисень	5,70±0,36	6,28±0,48
Натрій	0,96±0,005	0,99±0,1
Магній	0,59±0,001	0,59±0,002
Алюміній	0,67±0,001	0,74±0,005*
Кремній	0,80±0,005	0,69±0,003*
Сірка	6,48±0,2	5,82±0,23*
Хлор	1,75±0,009	1,88±0,2
Калій	0,26±0,005	0,31±0,003*
Кальцій	0,18±0,004	0,19±0,008

Примітка. * – статистично вірогідна різниця ($p \leq 0,05-0,001$).

Під час досліджень виявлено міжгрупові відмінності щодо кількісного складу мінеральних елементів. Зокрема, аналіз даних засвідчив, що патологія волоса супроводжується насамперед помітним зменшенням вмісту загальної сірки, деяким збільшенням у ньому кисню, алюмінію і кремнію.

Отже, в наших дослідженнях особливий інтерес становила сірка, елемент, що входить до складу білків, багатих на сірку, тобто KAPs (keratin-associated proteins), які мають безпосереднє відношення до формування та стабілізації структури волоса, а отже, і волосяного покриву в цілому. Важливо нагадати, що майже вся сірка волоса входить до складу цистину – саме тієї амінокислоти, яка відіграє вирішальну роль у синтезі кератину і формуванні його механічних показників. Як з'ясувалось, вміст сірки у волосі коливався в межах 5,01-6,83 % і в середньому становив у нормі 6,48 %, а при дифузному телогеновому випаданні був значно нижчим – 5,82 %. Що ж до розподілу сірки по поверхні поперечного зрізу, то найменша кількість її фіксувалася у кутикулі, тоді як у кортексі її концентрація була значно ви-

щою, хоча кортекс у своїй масі також виявився неоднорідним за концентрацією цього елемента (рис. 2).

Варто відзначити, що розподіл сірки у волосі, незалежно від його стану, має однако-

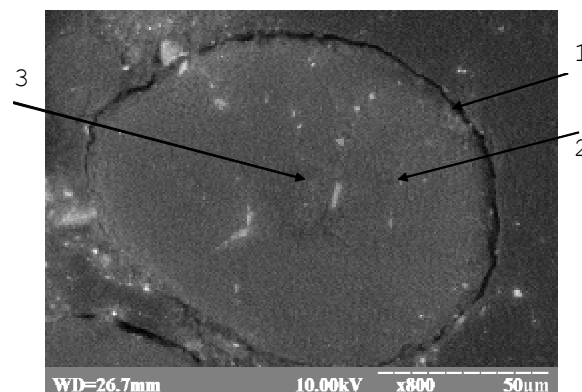


Рис. 1 Поперечний зріз людського волоса; 1– кутикула, 2 – кортекс, 3 – серцевина.

вий характер із чітко вираженими 3 піками, що властиві в основному кортексу. До речі, у цьому відношенні наші дані узгоджуються з даними літератури [3].

Щодо кремнію у волоссі, то тут варто нагадати, що цьому елементу притаманна важлива роль у формуванні й стабілізації структури кератину і забезпеченні його хімічної стійкості, а отже, і волоса в цілому. Вміст кремнію у во-

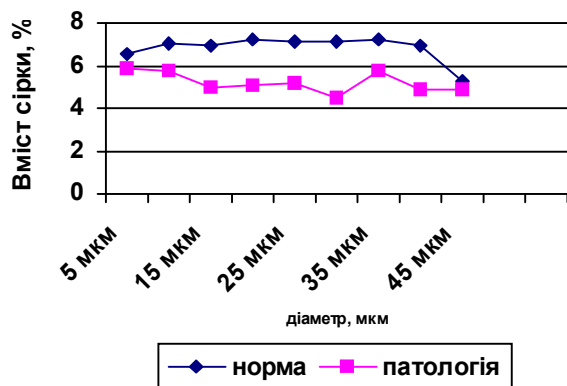


Рис. 2. Розподіл сірки через поперечний зріз волоса.

лосі коливався в межах 0,69-0,8 % і переважно локалізувався у його поверхневому шарі, тобто кутикулі. Існують чітко виражені міжгрупові відмінності щодо розподілу кремнію у волоссі (рис. 3).

З усього викладеного вище впливає один із головних, на наш погляд, висновків, який полягає в тому, що телогенове випадан-

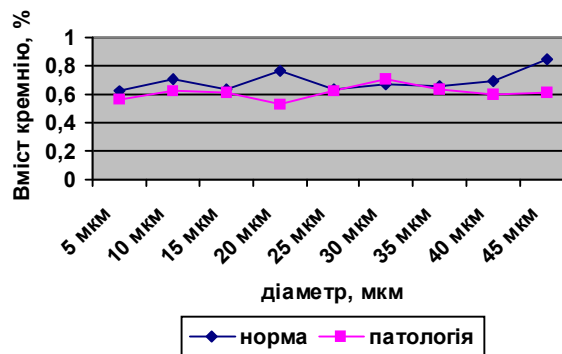


Рис. 3. Розподіл кремнію через поперечний зріз волоса.

ня волосся у людини супроводжується насамперед порушенням обміну сірки у волосяних фолікулах шкіри, внаслідок чого порушується синтез білків, які відзначаються високим вмістом цистину, тобто S-карбоксиметилкератинів (SCMKВ).

Звідси впливає і можливість корекції цих процесів, а отже, і прикладне значення одержаних даних, що, до речі, й буде предметом наших подальших досліджень.

ВИСНОВОК. Отримані дані можуть бути використані для розробки прийомів діагностики патологічних станів волоса та моніторингу їх лікування.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Clement J.L., La Pareux, Ceccaldi P.F. The specificity of the ultrastructure of human hair medulla // J. of Forensic Sci. Soc. – 1982. – **22**. – P. 396-398.
2. Deedrick D.W. Microscopy of hair part 1: a practical guide and manual for human hair // Forensic Sci. Commun. – 2004. – **1**. – P. 1-7.
3. Hallegot Ph., Peteranderl R., Lechene C. *In situ* imaging mass spectrometry analysis of melanin granules in human hair shaft // J. Invest. Derm. – 2004. – **122**. – P. 381-386.
4. Jones L.N., Rivetti D.E. The role of 18-methylsanoic acid in the structure and formation of

mammalian hair fibers // Micron. – 1997. – **28**. – P. 469-485.

5. Jones L.N., Simon M., Watts N.R. et al. Intermediate filament structure: hard α -keratin // Biophys. Chem. – 1997. – **68**. – P. 83-93.

6. Kelch A., Wessel S., Will T. et al. Penetration of pathways of fluorescent dyes in human hair fibres investigated by scanning near-field optical microscopy // J. of Microsc. – 2000. – **200**. – P. 179-186.

7. Smith J.R., Swift J.A. Lamellar subcomponents of the cuticular cell membrane complex of mammalian keratin fibres show friction and hardness contrast by AFM // J. of Microsc. – 2002. – **206**. – P. 182-193.

В.В. Гавриляк

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ НААН УКРАИНЫ, ЛЬВОВ

МИНЕРАЛЬНЫЙ ПРОФИЛЬ ВОЛОСА ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Резюме

С помощью сканирующего электронного микроскопа и рентгеновского микроанализа исследовали минеральный состав различных структурных компонентов человеческого волоса в норме и при диффузном

телогеновом випаданні. Количесвенно вдоль поперечного сечення волоса определили содержание таких химических элементов, как O, Na, Mg, Al, Si, S, Cl, K, Ca. Из исследуемых элементов наибольший процент приходится на серу, что в основном и определяет межгрупповые различия в химическом состоянии волос.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **волос человека, макро- и микроэлементы, кутикула, кортекс, сердцевина.**

V.V. Havrylyak

INSTITUTE OF ANIMAL BIOLOGY NAAS OF UKRAINE, LVIV

MINERAL PROFILE OF HUMAN HAIR IN NORM AND IN PATHOLOGY

Summary

Elemental composition of various structural components of human hair was investigated using scanning electronic microscopy and X-ray microanalysis. Quantitatively the content of chemical elements such as O, Na, Mg, Al, Si, S, Cl, K, Ca on the surface of cross-section of hair was studied. Among investigated elements the highest percent was sulfur which determined intergroup differences between sick and healthy hair.

KEY WORDS: **human hair, macro- and microelements, cuticle, cortex, medulla**

Отримано 23.07.10

Адреса для листування: В.В. Гавриляк, Інститут біології тварин НААН України, вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна.

ДИНАМІКА ВМІСТУ НЕЙРОСПЕЦИФІЧНИХ БІЛКІВ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ОДОНТОГЕННИЙ ОСТЕОМІЄЛІТ

У роботі наведено динаміку змін концентрацій нейроспецифічних білків (NCAM, ГФКБ, S 100 β) у сироватці крові хворих на хронічний одонтогенний остеомієліт нижньої щелепи до операції та в післяопераційний період (7, 14 днів) при проведенні лімфотропної терапії. Кількісну оцінку вмісту досліджуваних нейрон- та гліяспецифічних білків здійснювали методом твердофазного імуноферментного аналізу (Elisa). Встановлені зміни концентрацій білків у сироватці крові хворих після оперативного втручання свідчать про залучення цих нейроспецифічних білків нейронів і астроглії в процеси післяопераційної гіпералгезії. Визначення даних нейроантигенів у сироватці крові можуть надати об'єктивну інформацію про перебіг хронічного одонтогенного остеомієліту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нейроспецифічні білки, хронічний одонтогенний остеомієліт, оперативне лікування, гіпералгезія.

ВСТУП. Дослідження нервових механізмів репаративних процесів у ділянці хірургічного втручання – одна з актуальних проблем сучасної медицини. Визначення змін концентрацій нейроспецифічних білків у сироватці крові хворих після оперативного лікування є перспективним в плані розробки методів об'єктивної лабораторно-діагностичної оцінки загоєння післяопераційної травми і перебігу репаративних процесів, наразі при терапії хронічного одонтогенного остеомієліту нижньої щелепи (ХООНЩ) людини.

Одночасне дослідження 3-х нейроспецифічних білків (НСБ) – нейронної молекули клітинної адгезії (NCAM), гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) та кислого Ca⁺⁺-залежного білка (S 100 β) дозволяє охарактеризувати участь нейронів і глії в перебігу загоєння травми при ХООНЩ. У реалізації болювого відчуття істотну роль відіграють біохімічні фактори [1, 8]. Відомо, що операційна травма викликає підвищення вмісту нейроспецифічного білка S 100 β в задньому відділі півкуль мозку, а використання за цих умов наркотичних анальгетиків, антагоністів NMDA-рецепторів усуває зростання кількості даного білка [3]. Згідно з даними Yamanaki та ін. [15], у процесах болю, який виник внаслідок пошкодження периферичних нервів, важлива роль відводиться сериновій протеїназі – тканинному активатору плазміногену (ТАП).

Зокрема, встановлено зростання рівня ТАП в дорсальному розі в результаті підвищеної експресії мРНК, що спостерігається разом із збільшенням збудливості цього мозкового утвору. Відомо, що NCAM є маркером нейронів. Встановлено її роль в молекулярних механізмах формування нейрональних сіток у процесі розвитку організму. Зміни експресії NCAM та її посттрансляційної модифікації мають негативне значення для ЦНС і призводять до порушень функціонування нейронних паттернів [10].

Найбільш широко застосовуваним маркером для клітин астроцитарного походження за нормальних і патологічних умов є компонент їх проміжних філаментів – ГФКБ, який залучений у процеси цитоскелетної реорганізації, клітинної адгезії і підтримки процесів мієлінізації [11]. В імунохімії цей маркер застосовують при діагностиці астроцитарних пухлин, дослідженні астроцитарного розвитку та гліозу [13]. Його збільшена кількість визначається у спинномозковій рідині та сироватці крові за різних гострих пошкоджень [2].

S 100 β – Ca⁺⁺-зв'язувальний гліальний білок, який до 85-90 % синтезується в астроцитах. Основна маса білка (до 85 %) зосереджена в цитозолі, а 15 % – в мембранних структурах олігодендроцитів. Позаклітинний білок S 100 β проявляє регуляторний вплив на нейрони, астроцити, мікроглію, ендотеліальні й епітеліальні клітини, рецептори клітинної поверхні [12]. Підвищену секрецію білка S 100 β спостерігали при старінні, хворобі Альцгейме-

© М.П. Комський, 2010.

ра, синдрому Дауна, мозковій травмі, ішемії, нейродегенеративних, запальних і деяких психіатричних захворюваннях [9].

За допомогою сучасних методів аналізу нейроспецифічні білки виявляють у біологічних рідинах. Встановлено підвищення концентрації їх у сироватці крові та спинномозковій рідині при ряді патологій, таких, як ішемічне пошкодження мозку, хвороба Крейтцфельдта–Якоба, Хорея Гентінгтона та ін. [2].

У зв'язку з цим, актуальним є визначення закономірних змін вмісту нейроспецифічних білків – нейронної молекули клітинної адгезії (NCAM), гліального фібрилярного кислого білка (ГФКБ) і Ca^{++} -зв'язувального гліального білка (S 100 β) у сироватці крові хворих на хронічний одонтогенний остеомиєліт нижньої щелепи в різні терміни після операції під час проведення лімфотропної терапії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження з визначення вмісту нейроспецифічних білків виконано у сироватці крові хворих на хронічний одонтогенний остеомиєліт нижньої щелепи (n=12-14) до операції та на 7 і 14 доби після операції при проведенні лімфотропної терапії [6].

Кров для досліджень отримували з підключичної вени на стороні розташування зони – ХООНЦ. В подальшому кров відстоювали 1 год за кімнатної температури та центрифугували при 3000 об. х 20 хв на центрифугі К 70D. Сироватку крові використовували для визначення концентрацій нейроспецифічних білків. Кількісне визначення NCAM, ГФКБ та S 100 β

проводили методом твердофазного імуноферментного аналізу із застосуванням моноспецифічних поліклональних антисироваток, які отримували за [1], використовуючи NCAM, очищений за допомогою афінної хроматографії на конканавалін-А сефарозі ("Pharacia" LKB, Sweden) та імуносорбенті з іммобілізованими антитілами, ГФКБ та S 100 β ("Sigma", США). Визначення вмісту нейроспецифічних білків проводили у два етапи. Перший – інгібування антитіл у рідкому середовищі. Другий – взаємодія суміші, яка прореагувала на першому етапі із сорбованим на твердій фазі антигеном.

Концентрації білків розраховували в нанограмах на мілілітр сироватки крові.

Імунологічні дослідження проведено на базі групи імуноферментного аналізу (кер. – гол. наук. співроб., д-р біол. наук, проф. В.І. Чорна) центральної науково-дослідної лабораторії Дніпропетровської державної медичної академії. За практичну допомогу і консультації щодо отриманих результатів спостережень автор висловлює щирі вдячність В.І. Чорній та гол. наук. співроб., д-ру біол. наук Г.О. Ушаковій.

Отримані результати статистично обчислювали за t-критерієм Стьюдента [7].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналізуючи дані кількісного визначення нейроспецифічних білків у сироватці крові хворих на хронічний одонтогенний остеомиєліт нижньої щелепи, у перебігу післяопераційного періоду слід відзначити різну динаміку змін їх концентрацій (рис. 1). Вміст NCAM (рис. 1, А) знижу-

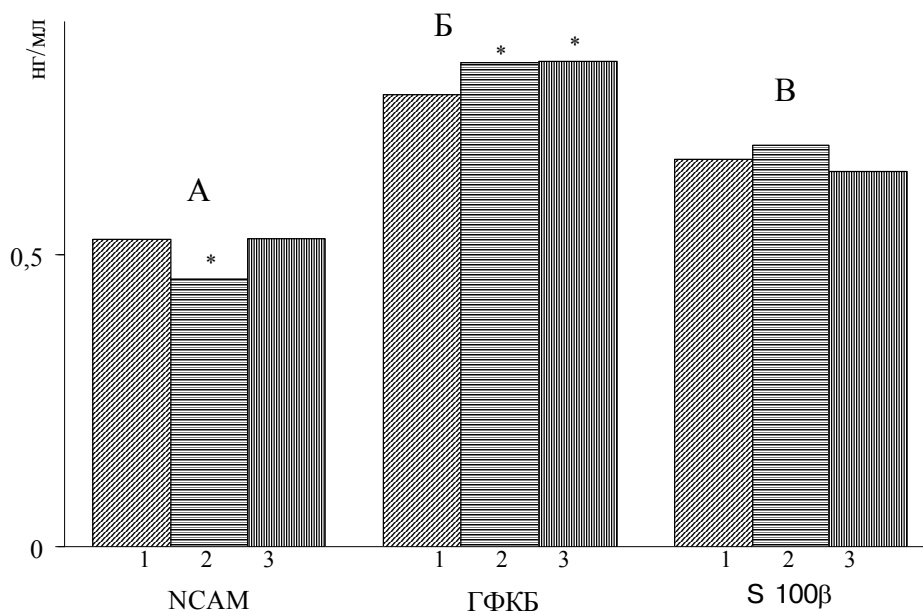


Рис. 1. Зміни концентрацій нейроспецифічних білків у сироватці крові хворих на хронічний одонтогенний остеомиєліт нижньої щелепи: А – NCAM; Б – ГФКБ; В – S 100 β ; 1 – до операції; 2 – 7 днів після операції; 3 – 14 днів після операції (n=12-14).

вався на 12,7 % ($p < 0,05$) на 7 добу після оперативного лікування і початку проведення лімфотропної терапії з наступним підвищенням до вихідних показників концентрації на 14 добу. Динаміка вмісту ГФКБ у сироватці крові хворих (рис. 1, Б) відрізнялась від виявленої закономірності для NCAM. Рівень даного астрогліального білка збільшувався через 7 та 14 діб на 8 % порівняно з вихідним значенням. Аналізуючи зміни білка S 100 β (рис. 1, В), слід відзначити незначне зростання на 7 добу після операції, а через 14 діб – тенденцію до зниження вмісту S 100 β порівняно з попереднім терміном спостережень.

Відомо, що в сироватці крові нейроспецифічні білки за звичайних умов практично не виявляються або визначаються у слідовій кількості. Підвищення концентрацій NCAM, ГФКБ та S 100 β може бути результатом процесів у тканинах мозку при змінах стану активності центральних нейротрансмітерних систем та розладах функціонування гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ). Авторами [4, 5] встановлено збільшення вмісту білків ГФКБ і S 100 β у сироватці крові щурів при післяопераційній гіпералгезії і запропоновано оцінювати інтенсивність болю за фактом підвищення концентрацій згаданих НСБ. Зазначений феномен пояснюється зростанням проникності ГЕБ за умов соматогенного післяопераційного болю. Гематоенцефалічний бар'єр являє собою утвір, який існує завдяки тісним контактам між ендотеліальними та нейрогліальними клітинами, що межують одні з одними, а основна його функція – підтримувати гомеостаз ЦНС. Показано, що пошкодження тканин, зокрема периферичних нервів, призводять до розвитку патологічних больових процесів, які можуть тривати місяцями після операції, а явище гіпералгезії, що розвивається внаслідок оперативного втручання, вказує на підвищену чутливість до больових стимулів [15].

Ряд патологічних станів, зокрема черепно-мозкові травми, ішемія мозку та ін., супроводжується порушенням проникності ГЕБ. При даних захворюваннях в сироватці крові було

виявлено в істотній кількості нейроспецифічні білки, а саме: NCAM, нейроспецифічну енолазу, мозкоспецифічну креатинкіназу, ГФКБ та S 100 β [9, 11, 12].

Виявлене нами збільшення концентрації ГФКБ у сироватці крові в постопераційний період можна пояснити або підвищенням експресії даного білка у мозку, або зростанням рівня низькомолекулярних, але імунологічно активних дериватів ГФКБ, які утворюються за рахунок протеолітичної деградації ферментами – кальпаїнами [2]. Аналізуючи динаміку білка S 100 β , слід зазначити, що даний гліальний білок може спричиняти як трофічний, так і токсичний ефекти залежно від його концентрації. Rothermundt та ін. [14] показали, що наномольні концентрації S 100 β стимулюють нейритний ріст і підвищують виживання нейронів у процесі розвитку. А мікромолекулярні рівні зовнішньоклітинного S 100 β *in vitro* стимулюють експресію протизапальних цитокінів та індукують процеси апоптозу. Встановлено нами підвищення вмісту S 100 β у сироватці крові хворих на ХООНЦ, можливо, зумовлене пошкодженням астроцитів, подібних до тих, що спостерігаються при нейродегенеративних, деяких психіатричних та запальних захворюваннях мозку [12].

ВИСНОВКИ. 1. Наведені результати свідчать про наявність підвищеного вмісту досліджуваних нейроантигенів (NCAM, ГФКБ та S 100 β) у сироватці крові хворих на хронічний одонтогенний остеомієліт нижньої щелепи в різні терміни після операції і початку проведення лімфотропної терапії.

2. Надходження нейроспецифічних білків NCAM, ГФКБ та S 100 β до кров'яного русла можливе за рахунок зміни проникності ГЕБ при даній патології у напрямку мозок – кров, а визначення рівня даних нейроантигенів у сироватці крові хворих на хронічний одонтогенний остеомієліт після оперативного втручання може надати об'єктивну інформацію про перебіг цього патологічного процесу та/або загоєння операційної травми.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антитела. Методы / Под ред. Кетти Д. – М.: Мир, 1991. – 384 с.
2. Дука Т.І., Лещинська І.О., Чорна В.І. Характеристика гліального фібрилярного кислого білка – компонента астрогліальних проміжних філаментів центральної нервової системи // Біополімери і клітина. – 2002. – **18**, № 3. – С. 179-185.

3. Кассиль Г.Н. Боль и обезболивание. – М.: Наука, 1965. – 317 с.

4. Козубенко Н.В., Кобелецкий Ю.Ю., Ушакова Г.А. Изменение экспрессии белков астроглии в условиях послеоперационной гипералгезии // Нейрофизиология. – 2001. – **33**, № 6. – С. 393-398.

5. Козубенко Н.В., Кобелецкий Ю.Ю., Ушакова Г.А. Содержание S 100 β в мозге в условиях послеоперационной гипералгезии // Арх. клин. и exper. мед. – 2001. – № 3. – С. 301-304.

6. Комский М.П. Внутриаартериальная регионарная лимфотропная терапия травматических повреждений нижней челюсти. – Днепропетровск, 1998. – 132 с.

7. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

8. Aschner M., West A.K. The role of MT in neurological disorders // J. Alzheimers Dis. – 2005. – 8, № 2. – P. 139-145.

9. Fano G., Biosa S., Fulle S. The S 100: a protein family in search of a function // Prog. Neurobiol. – 1995. – 46. – P. 71-82.

10. Fields D., Iton K. Neural cell adhesion molecules in activity – dependent development and synaptic

plasticity // Trends. Neurosci. – 2000. – 19, № 11. – P. 473-480.

11. Hatten M.E., Fishell G., Stitt T.N. Astroglia as a scaffold for development of the CNS // J. Neurosci. – 1990. – № 2. – P. 455-465.

12. Marshak P.S. S 100 β as a neurotrophic factor // Brain. Res. – 1996. – 86. – P. 169-181.

13. Rolland B., Le Prince G., Fages C. GFAP turnover during astroglial proliferation and differentiation // Dev. Brain Res. – 1990. – 56. – P. 144-149.

14. Rothermundt M., Peters M. S-100 in brain damage and neurodegeneration // Microscopy Res. Technique. – 2003. – 60. – P. 614-632.

15. Yamanaki H., Obata K., Fukuoka T. Tissue plasminogen activator in primary afferents induces dorsal horn excitability and pain response after peripheral nerve injury // Eur. j. Neuroscience. – 2006. – 19. – P. 93-102.

М.П. Комский

ДНЕПРОПЕТРОВСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

ДИНАМИКА СОДЕРЖАНИЯ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ОДОНТОГЕННЫМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

Резюме

В работе представлена динамика изменений концентраций нейроспецифических белков (NCAM, GFAP, S 100 β) в сыворотке крови больных хроническим одонтогенным остеомиелитом нижней челюсти до операции и в послеоперационный период (7, 14 суток) при проведении лимфотропной терапии. Количественную оценку содержания исследуемых нейрон- и глиоспецифических белков осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа (Elisa). Установленные изменения концентраций белков в сыворотке крови больных после оперативного вмешательства свидетельствуют о вовлечении этих нейроспецифических белков нейронов и астроглии в процессы послеоперационной гипералгезии. Определение данных нейроантигенов в сыворотке крови могут дать объективную информацию о течении хронического одонтогенного остеомиелита.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейроспецифические белки, хронический одонтогенный остеомиелит, оперативное вмешательство, гипералгезия.

M.P. Komskyi

DNIPROPETROVSK STATE MEDICAL ACADEMY

DYNAMICS OF CONTENT OF NEUROSPECIFIC PROTEINS IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH CHRONIC ODONTOGENIC OSTEOMYELITIS

Summary

In the work the dynamics of neurospecific protein (NCAM, GFAP, S 100 β) concentration changes was given reinvestigated in blood serum of patients with chronic odontogenic osteomyelitis of lower chest before surgery and during postoperative period (7, 14 days) while providing limfotropic therapy. Quantitative evaluation of researched neuron- and gliya- specific proteins content was held by ELISA method. The changes of proteins concentrations, determined in blood serum of the patients after surgery, testify to involvment of these neurospecific proteins of neurons and astroglia during postoperative hyperalgesia. Determination of these neuroantigens in blood serum could give the objective information about dynamics of chronic odontogenic osteomyelitis.

KEY WORDS: neurospecific proteins, chronic, odontogenic osteomyelitis, surgery treatment, hyperalgesia.

Отримано 05.07.10

Адреса для листування: М.П. Комський, Дніпропетровська державна медична академія, вул. Дзержинського, 9.

Медична хімія – т. 12, № 3, 2010

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

NO-СИНТАЗНА АКТИВНІСТЬ І ВМІСТ НІТРИТІВ У ПЕЧІНЦІ ТА МОЗКУ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

У досліджах на щурах-самцях лінії Вістар 3-, 4-, 5-, 6-, 20-, 23- і 31-місячного віку вивчили стан NO-синтазної активності та вміст нітритів у мозку, гепатоцитах, мітохондріальній і постмітохондріальній фракціях печінки щурів. Встановили, що з віком NO-синтазна активність і вміст нітритів у досліджуваних фракціях вивчених тканин тварин суттєво знижувались. Припускається, що виявлене нами раніше збільшення вмісту продуктів вільнорадикального ушкодження біомолекул у тканинах щурів на пізніх етапах онтогенезу зумовлене, головним чином, зниженням NO-синтазної активності з віком.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: NO-синтазна активність, нітрити, мозок, гепатоцити, мітохондріальна та постмітохондріальна фракції печінки, щури різного віку.

ВСТУП. На цей момент накопичено багато експериментальних даних щодо суттєвої ролі вільнорадикальних процесів у механізмах старіння [9]. Підтвердженням вільнорадикальної теорії, висунутої Харманом [7] та Емануелем [6], можуть бути дані, що свідчать про збільшення з віком генерації активних форм кисню в редокс-ланцюгах мітохондрій, посилення інтенсивності перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та зниження надійності антиоксидантної системи [10].

Відомо, що NO-радикали, які синтезуються в організмі NO-синтазами, здатні інгібувати ПОЛ, активність NADPH-оксидази і ксантиноксидази, модулювати продукцію O_2^- в мітохондріях і OH^- -радикалів у реакції Фентона [3]. При цьому існують дані, які свідчать про те, що активність NO-синтази знижується з віком. У зв'язку з вищесказаним, метою даної роботи було дослідження NO-синтазної активності та вмісту нітритів у мозку, гепатоцитах, мітохондріальній та постмітохондріальній фракціях печінки щурів різного віку.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В роботі використовували щурів-самців лінії Вістар 3-, 4-, 5-, 6-, 20-, 23- і 31-місячного віку, яких вирощували та утримували у віварії НДІ біології ХНУ імені В.Н. Каразіна. Маніпуляції зі щурами проводили відповідно до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей

(Страсбург, 1986). Щурів декапітували під ефірним наркозом. Гепатоцити одержували неферментативним методом, як описано [4]. Життєздатність клітин після виділення складала не менше 80-85 % (тест із забарвленням трипановим синім). Мітохондрії (МХ) та постмітохондріальну фракцію гомогенату печінки (ПМХ) виділяли методом диференційного центрифугування, як описано [2]. Охолоджену наважку тканини мозку (0 °С, 3 хв) продавлювали крізь прес і гомогенізували у 100 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4) протягом 1 хв при 800 об./хв. Співвідношення наважки тканини та об'єму середовища виділення – 1:3.

Активність NO-синтази (КФ 1.14.13.39) визначали в мозку, ізольованих клітинах печінки, МХ і ПМХ печінки спектрофотометрично при 340 нм за зменшенням рівня NADPH у середовищі, яке містило 0,1 М трис-НСІ буфер, рН 7,4, 1 мМ CaCl₂, 0,08 мМ NADPH та 0,011 мМ L-аргініну, як описано [12]. Реєстрацію активності проводили при температурі 37 °С проти контролю, який додатково містив 0,05 мМ інгібітора NO-синтази L-NNA. Вміст нітритів визначали з використанням реактиву Грісса [5]. Кількість забарвленого продукту реєстрували спектрофотометрично при 540 нм. Вміст нітритів розраховували з використанням калібрувальної кривої (з NaNO₂). Вміст білка в зразках визначали за методом Lowry та співавт. у модифікації Miller [8]. Результати статистично обробляли за допомогою програми "Statistika V.6" з використанням t-критерію Стюдента. Достовірно різними вважали результати при p<0,05.

© А.С. Попович, А.О. Шеремет, Ю.В. Нікітченко, 2010.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При вивченні NO-синтазної активності в гепатоцитах 5- та 20-місячних щурів виявлено вірогідне її зниження з віком (табл. 1). Так, зокрема, активність NO-синтази в гепатоцитах 20-місячних щурів була на 46,9 % нижчою, ніж активність у 5-місячних тварин. Вміст стабільних метаболітів NO-радикалів – нітритів у гепатоцитах 20-місячних щурів зменшився на 18,4 %. Отримані результати певною мірою узгоджуються з даними інших авторів [1].

Виражене зниження NO-синтазної активності з віком спостерігалось також у МХ та ПМХ печінки щурів (табл. 2). В даному випадку NO-синтазна активність у МХ та ПМХ щурів віком 31 місяць була на 20,8 і 33,7 % відповідно меншою, ніж у 3-місячних.

Зменшення NO-синтазної активності з віком виявлено нами і в гомогенатах мозку (табл. 3). При цьому в гомогенатах мозку 23-місячних щурів концентрація нітритів мала тенденцію до зниження ($0,05 < p < 0,1$).

Таблиця 1 – NO-синтазна активність та вміст NO_2^- в гепатоцитах молодих і старих щурів (n=6-7)

Показники, які визначають	Вік, міс.	
	5	20
NO-синтаза, нмоль NADPH/год·10 ⁶ клітин	145±11,9	77,4±24,3 *
NO_2^- , нмоль/10 ⁶ клітин	4,57±0,13	3,73±0,29 *

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно зі значеннями для молодих тварин.

Таблиця 2 – Вікові зміни NO-синтазної активності в мітохондріальній та постмітохондріальній фракціях печінки щурів (нмоль NADPH/год·мг білка; n=5-8)

Вік, міс.	Мітохондріальна фракція	Постмітохондріальна фракція
3	15,02±1,21	25,62±2,75
4	19,30±2,48	–
6	–	21,50±1,52
23	12,08±2,04 **	17,28±0,65 * ^{***}
31	11,90±0,73 * ^{**}	16,99±1,56 *

Примітки:

1. * – $p < 0,05$ порівняно зі значеннями для 3-місячних тварин.
2. ** – $p < 0,05$ порівняно зі значеннями для 4-місячних тварин.
3. *** – $p < 0,05$ порівняно зі значеннями для 6-місячних тварин.
4. “–” – даний показник не визначали.

Таблиця 3 – NO-синтазна активність та вміст NO_2^- в гомогенаті мозку молодих і старих щурів (n=6-7)

Показники, які визначають	Вік, міс.	
	4	23
NO-синтаза, нмоль NADPH/год·мг білка	78,6±15,0	39,1±9,8 *
NO_2^- , нмоль/мг білка	1,24±0,07	1,19±0,10

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно зі значеннями для молодих тварин.

У зв'язку з тим, що, за даними авторів [11], вміст мРНК у тканинах старих щурів збільшується, то можна припустити, що виявлене нами зниження NO-синтазної активності при старінні пов'язане, головним чином, з порушенням

посттрансляційної модифікації білка, зокрема зі зниженням фосфорилування NO-синтази.

ВИСНОВКИ. Результати роботи свідчать про зменшення NO-синтазної активності в

печінці та мозку щурів з віком, а також про зменшення рівня нітритів у гепатоцитах і тенденцію до зниження цих продуктів NO-радикалів у мозку старих тварин. У зв'язку з висказаним, отримані нами раніше результа-

ти щодо збільшення вмісту продуктів вільно-радикального ушкодження біомолекул у тканинах щурів на пізніх етапах онтогенезу можна пояснити зниженням NO-синтазної активності в печінці та мозку щурів з віком.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кульчицький О.К. Система оксиду азоту та вік // Буковинський мед. вісник. – 2005. - № 2. – С. 143-144.
2. Лемешко В.В. Возрастные перестройки структурно-функционального состояния мембранных редокс-систем: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.02 / Минск. – Минск, 1983. – 36 с.
3. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. – М.: Фирма "Слово", 2006. – 556 с.
4. Петренко А.Ю., Сукач А.Н., Росляков А.Д., Мазур С.П. Выделение гепатоцитов крыс неферментативным методом: детоксикационная и дыхательная активности // Биохимия. – 1991. – **56**, № 9. – С. 1647-1651.
5. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids // *Anal. Biochem.* – 1982. – **126**. – P. 131-138.
6. Emanuel N.M. Kinetics and free-radical mechanisms of ageing and carcinogenesis // *Age-related factors in carcinogenesis* / Likhachev A., Anisimov V., Montesano R., Eds. (IARC Sci. Publ. N 58). IARC: Lyon. – 1985. – P. 127-149.
7. Harman D. Free-radical theory of aging: increasing the functional life span // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1994. – **717**. – P. 1-15.
8. Miller S.I. Protein determination for large numbers of samples // *Anal. Chem.* – 1959. – **31**, № 5. – P. 964-966.
9. Navarro A., Boveris A. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging // *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* – 2004. – **287**. – P. 1244-1249.
10. Skulachev V.P. Mitochondria, reactive oxygen species and longevity: some lessons from the Barja group // *Aging Cell.* – 2004. – **3**, № 1. – P. 17-19.
11. Strosznajdera J.B., Jeskoa H., Zambrzycka A. et al. Age-related alteration of activity and gene expression of endothelial nitric oxide synthase in different parts of the brain in rats // *Neuroscience Letters.* – 2004. – **370**. – P. 175-179.
12. Wang W., Inoue N., Nakayama T. et al. An assay method for nitric oxide synthase in crude samples by determining product NADP⁺ // *Anal. Biochem.* – 1995. – **227**. – P. 274-280.

А.С. Попович, А.А. Шеремет, Ю.В. Никитченко
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.Н. КАРАЗИНА

NO-СИНТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ И СОДЕРЖАНИЕ НИТРИТОВ В ПЕЧЕНИ И МОЗГЕ КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Резюме

В исследованиях на крысах-самцах линии Вистар 3-, 4-, 5-, 6-, 20-, 23- и 31-месячного возраста изучено состояние NO-синтазной активности и содержание нитритов в мозге, гепатоцитах, митохондриальной и постмитохондриальной фракциях печени крыс. Было установлено, что с возрастом NO-синтазная активность и содержание нитритов в исследуемых фракциях изученных тканей животных существенно снижались. Предполагается, что обнаруженное нами ранее увеличение содержания продуктов свободно-радикального повреждения биомолекул в тканях крыс на поздних этапах онтогенеза обусловлено, главным образом, снижением NO-синтазной активности с возрастом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: NO-синтазная активность, нитриты, мозг, гепатоциты, митохондриальная и постмитохондриальная фракции печени, крысы разного возраста.

NO-SYNTHASE ACTIVITY AND THE CONTENTS OF NITRITES IN LIVER AND BRAIN OF RATS OF DIFFERENT AGE

Summary

In experiments on 3-, 4-, 5-, 6-, 20-, 23- and 31-months old male Wistar rats the state of NO-synthase activity and the content of nitrites in brain, hepatocytes, mitochondrial and postmitochondrial fractions of rat liver were studied. It was found that the state of NO-synthase activity and the content of nitrites in the investigated fractions of rats tissues significantly decreased with age. It is assumed that the observed earlier increase in products of free radical damage to biomolecules in rats tissues in the later stages of ontogeny is mainly, due to reduced NO-synthase activity with age.

KEY WORDS: **NO-synthase activity, nitrites, brain, hepatocytes, mitochondrial and postmitochondrial fractions of the liver, the rats of different age.**

Отримано 31.05.10

Адреса для листування: Ю.В. Нікітченко, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61077, Україна.

ВПЛИВ АНТИОКСИДАНТІВ ДЕСФЕРІОКСАМІНУ ТА ДИМЕТИЛТІОСЕЧОВИНИ НА ПОКАЗНИКИ ОБМІНУ ЗАЛІЗА В ЩУРІВ З ЦИСПЛАТИНОВИМ ТА МІОГЛОБІНУРИЧНИМ УРАЖЕННЯМИ НИРОК

Досліджено вплив препаратів з антиоксидантними властивостями десферіоксаміну і диметилтіосечовини на показники обміну заліза в щурів з цисплатиновим та міоглобінурічним (гліцероловим) ураженнями нирок. Диметилтіосечовина й, особливо, десферіоксамін значно зменшували ступінь зростання сироваткового та негемового заліза, активність гемоксигенази, латентну залізов'язувальну здатність і вміст гемму в нирках за умов нефротоксичного ураження цисплатином та гліцеролом.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нефротоксичність, обмін заліза, цисплатин, гліцерол, десферіоксамін, диметилтіосечовина.

ВСТУП. На сьогодні проблема медикаментозної нефротоксичності є досить актуальною. До патогенетичних механізмів токсичних нефропатій відносять порушення гемодинаміки в клубочках нирок, токсичний вплив на епітелій канальців, рабдомиоліз, запалення та тромботичну мікроангіопатію [5, 7]. Серед молекулярних механізмів дії нефротоксинів значне місце належить оксидативному стресу – універсальному механізму пошкодження біологічних структур [1, 2, 8]. Підтвердженням наявності цього механізму є нефропротекторна дія багатьох природних та синтетичних антиоксидантів [4, 7, 10]. Однак молекулярні механізми антиоксидантного захисту цих сполук залишаються до кінця не з'ясованими, зокрема не досліджено їх вплив на процеси обміну заліза. Тому метою даної роботи було визначити спроможність сполук з різними механізмами антиоксидантної дії – перехоплювача гідроксильних радикалів диметилтіосечовини та хелатора іонів заліза десферіоксаміну впливати на показники обміну заліза на моделях міоглобінурічного і цисплатинового уражень нирок у щурів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 64 щурах-самцях популяції Вістар, які перебували в стандартних умовах віварію з вільним доступом до води та їжі. Гостре ураження нирок цисплатином викликали одноразовим інтраперитонеальним його введенням

в дозі 7 мг/кг [4]. Міоглобінурічне ураження відтворювали шляхом одноразового внутрішньом'язового введення 10 мл/кг 50 % розчину гліцеролу [6]. Десферіоксамін вводили внутрішньоочеревинно в дозі 100 мг/кг за 1 год до введення цисплатину (на гліцероловій моделі – через 6 та 24 год). Диметилтіосечовину вводили щурам внутрішньоочеревинно тричі: вперше – в дозі 500 мг/кг за 1 год до введення нефротоксикантів, а потім у дозі 125 мг/кг через 12 та 24 год [11]. Тварин виводили з досліду на 4 добу. Вміст негемового заліза в сироватці крові та нирках, латентну залізов'язувальну здатність трансферину сироватки крові визначали батофенатроліновим методом [9], вміст гемму – піридингемохромогеновим методом [4], активність гемоксигенази в пост'ядерній фракції нирок – за утворенням білірубину, що утворився при окисненні геміну [3]. Статистичну обробку проведено загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження, проведені нами, показали, що цисплатинова та міоглобінурічна моделі ураження нирок супроводжувались масштабними змінами показників обміну заліза (табл. 1). При цьому гостре ураження нирок, незалежно від типу нефротоксиканта, супроводжувалось вірогідним зростанням вмісту негемового заліза в сироватці крові та нирках, зниженням залізов'язувальної здатності сироватки крові, а в пост'ядерній фракції нирок – зменшенням

© О.В. Машевська, 2010.

вмісту гемату та збільшенням активності гемоксигенази. Введення шурам на фоні обох видів ураження нирок антиоксидантів диметилтіосечовини й, особливо, десферіоксаміну достовірно обмежувало зміни всіх досліджуваних показників.

Виявлено, що в шурів з обома видами ураження нирок різко підвищувався вміст сироваткового негемового заліза і це супроводжувалось зниженням латентної залізов'язувальної здатності сироватки крові, а у тварин

Таблиця 1 – Вплив диметилтіосечовини та десферіоксаміну на показники обміну заліза в нирках тварин з цисплатиновим та міоглобінуричним ураженнями ($M \pm m$, у всіх групах $n=8$)

Групи тварин та їх характеристика	Сироватка крові		Нирки	Пост'ядерна фракція нирок	
	Негемове залізо, мкмоль/л	Латентна залізов'язувальна здатність	Негемове залізо, мкмоль/г	Гем, нмоль/мг білка	Гемоксигеназа, нмоль/хв на 1 мг білка
Цисплатинове ураження нирок					
Контроль	26,9±1,80	87,2±7,76	0,79±0,05	1,69±0,090	0,73±0,031
Цисплатин	64,2±2,66*	18,3±3,69*	1,76±0,10*	0,90±0,063*	2,09±0,12*
Цисплатин + диметилтіосечовина	49,9±2,28*#	43,5±5,79*#	1,21±0,05*#	1,41±0,062*#	1,04±0,10*#
Цисплатин + десферіоксамін	38,1±2,38*#	63,0±6,10*#	1,02±0,05*#	1,41±0,059*#	1,15±0,09*#
Міоглобінуричне ураження нирок					
Контроль	24,7±2,46	86,6±5,54	0,81±0,06	1,65±0,11	0,69±0,042
Гліцерол	88,5±4,81*	4,47±1,25*	3,50±0,12*	0,66±0,08*	2,52±0,13*
Гліцерол + диметилтіосечовина	53,9±2,99*#	27,8±5,78*#	2,36±0,10*#	0,98±0,059*#	1,44±0,10*#
Гліцерол + десферіоксамін	34,4±2,87*#	46,1±5,70*#	1,50±0,08*#	1,25±0,076*#	1,14±0,09*#

Примітка. * – вірогідні відмінності щодо контролю; # – щодо групи 2.

з міоглобінуричним ураженням – майже повним вичерпанням латентної залізов'язувальної здатності. Це свідчить про те, що за умов міоглобінуричного ураження нирок фактично весь наявний в організмі трансферин витрачається на хелатування іонів заліза, які вивільнюються в результаті руйнування міоглобіну. Мабуть, саме це стало причиною підвищення вмісту нехелатованого заліза в нирках. Ще однією причиною гіперферемії за описаних умов є деструкція гемопротейнів, що супроводжується зростанням активності гемоксигенази та зниженням вмісту гемату. Дійсно, отримані нами результати продемонстрували, що обидві моделі патології нирок супроводжувались вірогідним зменшенням вмісту гемату в нирках і збільшенням активності гемоксигенази. Високі концентрації вільного заліза в крові та нирках проявляли високу цитоток-

сичність шляхом активації реакцій одноелектронного перенесення з утворенням гідроксильного радикала (в реакції Фентона) та розвитку оксидативного стресу, а останній, цілком імовірно, слугував додатковою причиною пошкодження нирок.

ВИСНОВОК. Застосування диметилтіосечовини та десферіоксаміну ефективно попереджувало зниження вмісту гемату, активності аконітази та зростання активності гемоксигенази в шурів з цисплатиновим та гліцероловим ураженнями нирок, тобто зменшувало процеси деградації гемопротейнів і вивільнення нехелатованих токсичних іонів заліза. Дещо вища профілактична дія десферіоксаміну, можливо, пов'язана з більшою здатністю до нормалізації обміну заліза, іони якого є потужними стимуляторами оксидативного стресу

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Основні шляхи утворення активних форм кисню в нормі та при ішемічних патологіях / Ю.І. Губський, І.Ф. Беленічев, С.І. Коваленко [та ін.] // Сучасні проблеми токсикології. – 2004. – № 2. – С. 18-23.

2. Пентюк Н.О. Фармакологічна корекція нефротоксичної дії індометацину за допомогою триметазидину / Н.О. Пентюк // Ліки. – 2000. – № 6. – С. 21-24.

3. Agarwal A. Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: a protective role in cisplatin nephrotoxicity

in the rat / A. Agarwal, J. Balla // *Kidney Int.* – 1995. – **4**, № 48. – P. 1298-1307.

4. Ali B.H. Amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity in rats by tetramethylpyrazine, a major constituent of the Chinese herb *Ligusticum wallichii* / B.H. Ali, M. Al-Moundhri // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. – 2008. – **7**, № 233. – P. 891-896.

5. Choudhury D. Drug-associated renal dysfunction and injury / D. Choudhury, Z. Ahmed // *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* – 2006. – **2**, № 2. – P. 80-91.

6. Kertai E. Effect of glycerol-induced acute renal failure and di-2-ethylhexyl phthalate on the enzymes involved in biotransformation of xenobiotics / E. Kertai, G. Hollosi // *Acta. Physiol. Hung.* – 2000. – **3**, № 87. – P. 253-265.

7. Konder C.M. Diagnosis and management of acute interstitial nephritis / C.M. Konder, A. Kudrimoti // *Am. Fam. Physician.* – 2003. – **15**, 67 (12). – P. 2527-2534.

8. Koop D.R. Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450 isozyme / D.R. Koop // *Mol. Pharmacol.* – 1986. – **29**, № 4. – P. 399-404.

9. Rebouche C.J. Microanalysis of non-heme iron in animal tissues / C.J. Rebouche, C.L. Wilcox // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2004. – **31**, № 58. – P. 239-251.

10. Role of ellagic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats // A. Atessahin, A.O. Ceribasi, A. Yuce [et al.] // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2007. – **100**, № 2. – P. 121-126.

11. Sprong R.C. Dimethylthiourea protects rats against gram-negative sepsis and decreases tumor necrosis factor and nuclear factor kappaB activity / R.C. Sprong, C.J. Aarsman // *J. Lab. Clin. Med.* – 1997. – **4**, № 129. – P. 470-481.

О.В. Машевская

ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ ДЕСФЕРРИОКСАМИНА И ДИМЕТИЛТИОМОЧЕВИНЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ ОБМЕНА ЖЕЛЕЗА У КРЫС С ЦИСПЛАТИНОВЫМ И МИОГЛОБИНУРИЧЕСКИМ ПОРАЖЕНИЯМИ ПОЧЕК

Резюме

Исследовано влияние препаратов с антиоксидантными свойствами десферриоксамина и диметилтиомочевина на показатели обмена железа у крыс с цисплатиновым и миоглобинурическим (глицероловым) поражением почек. Диметилмочевина и, особенно, десферриоксамин значительно уменьшали степень возрастания сывороточного и негемового железа, активность гемоксигеназы, латентную железосвязывающую способность и содержание гема в почках в условиях нефротоксического поражения цисплатином и глицеролом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нефротоксичность, обмен железа, цисплатин, глицерол, десферриоксамин, диметилтиомочевина.

O.V. Mashevskaya

M.I. PYROHOV WINNYTSA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

EFFECT OF ANTIOXIDANTS OF DESPHERRIOXAMINE AND DIMETHYLTHIOUREA ON INDECES OF IRON EXCHANGE IN CASE OF CISPLATIN AND MYOGLOBIN-INDUCED NEPHROTOXICITY IN RATS

Summary

In the experiments have been shown that antioxidants despherrioxamine and dimethylthioureas correct iron metabolism in case of cisplatin and glycerol-induced kidney damages in rats. Dimethylthiourea and especially despherrioxamine considerably reduced a degree of serum and nongemic iron increase level, activity of hemoxigenase, decrease of latent sideropexy abilities and level of heme in kidneys in case of both types of nephrotoxicity.

KEY WORDS: nephrotoxicity, iron metabolism, cisplatin, glycerol, despherrioxamine, dimethylthiourea.

Отримано 29.06.10

Адреса для листування: О.В. Машевська, вул. Келецька, 136, кв. 191, Вінниця, 21029, Україна.

К.А. Посохова, О.О. Шевчук, А.М. Пришляк, І.Л. Мосейчук
 ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

ЕФЕКТИВНІСТЬ ГЛУТАРГІНУ ТА ЕНТЕРОСГЕЛЮ ПРИ УРАЖЕННІ ПЕЧІНКИ, ВИКЛИКАНОМУ ПРОТИТУБЕРКУЛЬОЗНИМИ ЗАСОБАМИ

На моделі токсичного ураження печінки протитуберкульозними препаратами (ізоніазидом, рифампіцином, піразинамідом) доведено гепатопротекторний ефект глютаргін та ентеросгель. При цьому їх поєднане застосування виявилось більш ефективним за здатністю зменшувати рівень показників цитолізу та холестазу в сироватці крові (активність амінотрансфераз, лужної фосфатази, вміст загального білірубину), пригнічувати процеси ліпопероксидації та відновлювати активність антиоксидантної системи в печінці.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: печінка, ізоніазид, рифампіцин, піразинамід, ентеросгель, глютаргін.

ВСТУП. Туберкульоз, на який у світі хворіють 50-60 млн людей, займає перше місце в структурі смертності від інфекційних та паразитарних хвороб [21]. В Україні захворюваність населення на туберкульоз складає 79,8, а смертність – 19,8 на 100 тис. населення [14]. Незважаючи на деяке зменшення рівня захворюваності на туберкульоз, яке спостерігається в Україні в останні роки, ряд проблем викликає серйозне занепокоєння, зокрема поширення мультирезистентних форм захворювання, розвиток побічних реакцій під час поліхіміотерапії, що призводить до її переривання і навіть припинення [16, 17]. Сучасні схеми лікування таких пацієнтів нерідко включають 4-6 протитуберкульозних засобів на початковій стадії і, щонайменше, 2 препарати у період підтримуючої терапії. Причому найефективніші з них, а саме ізоніазид, рифампіцин, піразинамід, мають значну гепатотоксичність (табл. 1). Ураження печінки при призначенні протитуберкульозних препаратів, за різними даними [19, 22, 24, 26], коливається від 2,5 до 17 %, в тому числі описано випадки розвитку гострої печінкової недостатності [23]. Отже, ефективне попередження та лікування гепатотоксичних реакцій є важливими не лише для успішного проведення хіміотерапії туберкульозу в конкретного пацієнта, але й для покращання ситуації в цілому.

Метою роботи було з'ясувати ефективність глютаргін та ентеросгель за їх окремого і поєданого введення при ураженні печінки, спричиненому ізоніазидом, рифампіцином та піразинамідом.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на нелійних білих щурах-самцях масою 180-220 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин було поділено на такі групи (n=6): 1-ша – інтактні (контроль), 2-га – тварини, які отримували 3 протитуберкульозні препарати (контрольна патологія, КП), 3-тя – КП+глютаргін, 4-та – КП+ентеросгель, 5-та – КП+глютаргін+ентеросгель. Щурам 2-ї групи щоденно протягом 28 днів вводили внутрішньошлунково ізоніазид (50 мг/кг), рифампіцин (50 мг/кг), піразинамід (1500 мг/кг). Тварини 3-5 груп, крім того, отримували (з 15 дня від початку введення протитуберкульозних засобів, щоденно, протягом двох тижнів), відповідно, глютаргін (інтраперитонеально, 45 мг/кг), ентеросгель (всередину, 650 мг/кг) та їх комбінацію. На 29 добу щурів декапітували під тіопенталовим наркозом, дотримуючись принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Досліджували сироватку крові та тканину печінки. Визначали активність АлАТ, АсАТ, лужної фосфатази (ЛФ), рівень загального білірубину, використовуючи стандартні набори ООО НПП "Філісит-діагностика", Україна; показники перекисного окиснення ліпідів: гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) [4], ТБК-активних продуктів (ТБП) [1]; антиоксидантного статусу: активність супероксиддисмутази (СОД) [15], каталази [9], вміст відновленого глутатіону (ВГ) [20], церулоплазміну [7]. Отримані результати піддавали статистичній обробці у програмі Excel з використанням t-критерію Стьюдента при $p \leq 0,05$.

Таблиця 1 – Протитуберкульозні засоби та порівняльний потенціал їх гепатотоксичності [27]

ВИСОКИЙ ПОТЕНЦІАЛ	НИЗЬКИЙ ПОТЕНЦІАЛ
Ізоніазид Рифампіцин, рифабутин Піразинамід Етіонамід, протіонамід ПАСК	Стрептоміцин, канаміцин, амікацин Капреоміцин Етамбутол Офлоксацин, левофлоксацин Ципрофлоксацин Циклосерин

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як свідчать показники, наведені в таблиці 2, при тривалому призначенні протитуберкульозних засобів у 2-й групі тварин спостерігалась активація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), що проявлялась збільшенням рівнів ГПЛ та ТБП в ураженому органі на 86 і 144 % відповідно порівняно з контролем. Рівень ТБП у сироватці крові зріс на 99 %. У гомогенатах печінки активність СОД, каталази і рівень ВГ знизились на 39, 55 та 29 %. У сироватці крові активність СОД і каталази зменшилась на 27 та 32,5 % відповідно, рівень церулоплазміну підвищився на 19 %. Загальновідомо, що активація процесів ПОЛ та зниження активності антиоксидантної системи відіграють важливу роль у механізмах пошкодження клітин, супроводжуючись змінами фізико-хімічних властивостей мембран, перерозподілом ліпідів у них, окисненням тіолових сполук, пригніченням активності мембранозв'язаних ферментів,

роз'єднанням тканинного дихання та окисного фосфорилування [3, 6, 25]. Про розвиток процесів цитолізу та холестазу на тлі поєднаного застосування ізоніазиду, рифампіцину та піразинаміду (рис. 1 та рис. 2) свідчило підвищення рівня трансаміназ (АлАТ – у 2,6, АсАТ – у 2,2 раза відповідно) та ЛФ (в 1,8 раза). Одночасно порушувалась здатність печінки до кон'югації та виділення білірубину, що супроводжувалось зростанням рівня цього пігменту в сироватці крові у 2 рази (див. рис. 2).

Глутаргін зменшував прояви ураження печінки, зокрема пригнічувались процеси ПОЛ: показники ГПЛ і ТБП у гомогенатах печінки тварин 3-ї групи знизились на 28 та 33 % відповідно, рівень ТБП у сироватці крові – на 28 % порівняно з КП. Одночасно покращились показники антиоксидантної системи: активність СОД і каталази у печінці зросла на 33 та 30 %, у сироватці крові – на 41 та 32 % відповідно. Рівень ВГ у печінці збільшився на 10 %.

Таблиця 2 – Показники стану печінки при її ураженні протитуберкульозними засобами та його корекції ентеросгелем і глутаргіном (M±m, n=6)

Показник	Групи				
	Контроль (1)	Контрольна патологія (КП) (2)	КП+глутаргін (3)	КП+ентеросгель (4)	КП+глутаргін+ентеросгель (5)
ГПЛ (печінка), ум. од.10 ³ /кг	5,1±0,29	9,47±0,24 *	6,83±0,28 *#	7,2±0,23*#	6,23±0,31*#§
ТБП (печінка), мкмоль/кг	6,73±0,27	16,45±0,40 *	11,0±0,42 *#	11,22±0,67*#	9,08±0,53 *#°§
ТБП (кров), мкмоль/кг	0,81±0,04	1,62±0,02 *	1,17±0,02 *#	1,14±0,01*#	0,95±0,05 *#°§
Церулоплазмін, мг/л	329,6±10,98	390,8±14,78 *	306,3±10,20#	287,3±10,33* #	284,4±15,21 #
СОД (печінка), ум. од./кг	5,07±0,1	3,09±0,1*	4,1±0,18 *#	4,06±0,23*#	4,62±0,11*#°
СОД (кров) ум. од./л	4,43±0,08	3,23±0,16 *	4,56±0,06 #	4,26±0,03*#	5,52±0,01 #°§
Каталаза (печінка) кат/кг	7,99±0,08	3,59±0,25 *	4,66±0,23 *#	4,41±0,21*#	5,23±0,3*#
Каталаза (кров), кат/л	8,61±0,27	5,8±0,4*	7,69±0,29 #	7,8±0,2 #	8,3±0,3 #
Відновлений глутатіон, ммоль/кг	2,37±0,05	1,67±0,04 *	1,84±0,03 #	1,81±0,02 #	1,90±0,06 #

Примітка. Різниця достовірна (p<0,05): * – відносно контролю, # – відносно КП, ° – відносно 3-ї групи, § – відносно 4-ї групи.

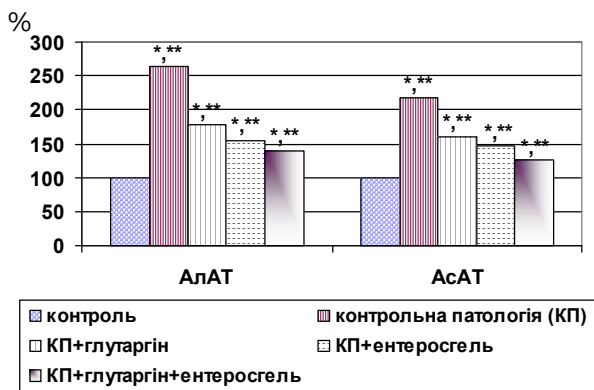


Рис. 1. Вплив глютаргіну та ентеросгелю на активність печінкових трансаміназ.

Примітка. У цьому та наступному рисунку: * – достовірність відносно контролю; ** – відносно контрольної патології.

Знизилась активність печінкових трансаміназ (АлАТ – на 32 %, АсАТ – на 27 %) та ЛФ (на 20 %). Рівень загального білірубіну зменшився на 23 % порівняно з КП.

Застосування ентеросгелю (табл. 2) супроводжувалось зменшенням рівнів ГПЛ і ТБП у печінці на 24 та 32 % відповідно, вмісту ТБП у сироватці крові на 29 % порівняно з КП. Активність СОД і каталази зросла на 31 та 23 % у печінці й на 32 і 33 % у сироватці крові відповідно. Рівень відновленого глутатіону збільшився на 8 %. У 4-й групі, порівняно з КП,

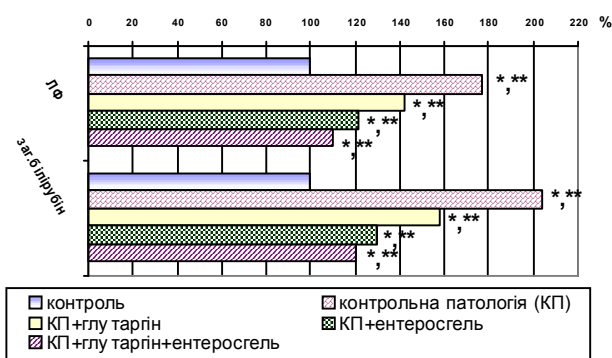


Рис. 2. Вплив глютаргіну й ентеросгелю на активність лужної фосфатази та рівень загального білірубіну.

вміст АлАТ, АсАТ і ЛФ знизився на 41, 33 та 32 % відповідно, загального білірубіну в сироватці крові – на 36 % (див. рис. 1 та рис. 2).

При поєднаному застосуванні глютаргіну та ентеросгелю показники стану печінки покращувались більшою мірою, ніж при окремому введенні препаратів, що підтверджено математично (див. табл. 2). Зокрема, рівні ГПЛ і ТБП у гомогенатах печінки зменшились на 34 та 45 % відповідно, у сироватці крові вміст ТБП знизився на 42 % у 5-й групі порівняно з 2-ю групою. Активність СОД і каталази зросла на 50 та 46 % у печінці й на 71 і 43 % у сироватці

крові відповідно, рівень ВГ у печінці – на 14 % (див. табл. 2). Активність АлАТ, АсАТ і ЛФ знизилась на 47, 42 та 38 % відповідно, рівень загального білірубіну – на 42 % (див. рис. 1 та рис. 2). При цьому більшість зазначених показників стану печінки у цій серії дослідів нормалізувалась.

У 5-й групі рівень ТБП у гомогенатах печінки був нижчим на 17 та 19 %, у сироватці крові – на 19 та 17 % відносно 3-ї та 4-ї дослідних груп відповідно. Активність СОД у сироватці крові зросла на 21 і 30 % відповідно відносно 3-ї та 4-ї груп. У групі, де застосовували комбінацію глютаргіну та ентеросгелю, активність СОД у печінці підвищилась на 12 % відносно 3-ї групи, а рівень ГПЛ зменшився на 13 % відносно 4-ї групи.

Серед відомих методів очищення внутрішнього середовища організму – гемо-, лімфо-, плазмо- та ентеросорбції – останній користується особливою популярністю, що пов'язано з його високою ефективністю, незначною кількістю побічних ефектів, відсутністю потреби у спеціально навченому персоналі та високоартісному обладнанні [10, 12, 18]. Гастроінтестинальна сорбція дає можливість знизити рівень ендогенної інтоксикації за рахунок зменшення продуктів ПОЛ, інших токсичних сполук (які утворюються в результаті порушення процесів обміну, руйнування клітинних та субклітинних мембран), що, у свою чергу, дозволяє зменшити рівень метаболічного навантаження на печінку. Саме цими механізмами можна пояснити позитивний ефект ентеросгелю при ураженні печінки протитуберкульозними препаратами, що встановлений у наших дослідженнях і узгоджується з літературними даними [8, 11]. Гепатопротекторна активність амінокислотного препарату глютаргіну (L-аргініну-L-глутамату) переконливо доведена при вірусних гепатитах, алкогольному ураженні та цирозі печінки, лептоспірози тощо і пояснюється його антиоксидантними властивостями та дезінтоксикаційною дією [2, 5]. При цьому глютамінова кислота сприяє нейтралізації аміаку, що попереджує та зменшує прояви печінкової енцефалопатії [2, 5]. Позитивні ефекти L-аргініну зумовлені й тим, що він є попередником синтезу оксиду азоту – універсального регулятора фізіологічних функцій [13]. Таким чином, зростання гепатопротекторної активності ентеросгелю та глютаргіну, відмічене у наших дослідях на тлі їх поєднаного застосування, пояснюється позитивним впливом цих препаратів на різні моменти патогенезу ураження печінки протитуберкульозними засобами.

ВИСНОВКИ. 1. Протитуберкульозні засоби (ізоніазид, рифампіцин та піразинамід) при їх щоденному поєднаному введенні експериментальним тваринам протягом 28 днів викликають ураження печінки, що проявляється розвитком цитолізу та холестазу, активацією перекисного окиснення ліпідів, зниженням показників антиоксидантного захисту в печінці.

2. Глутаргін зменшує ознаки ураження печінки, спричиненого антимікобактеріальними засобами, що проявляється зниженням активності печінкових трансаміназ, лужної фосфатази, рівня білірубину, покращанням стану прооксидантно-антиоксидантної системи у печінці.

3. Гастроінтестинальна сорбція за допомогою ентеросгелю покращує стан печінки при її ураженні ізоніазидом, рифампіцином та піразинамідом, що супроводжується зменшенням

ознак цитолітичного та холестатичного синдромів, проявів оксидативного стресу, відновленням активності та вмісту компонентів антиоксидантної системи у печінці.

4. Ступінь позитивного впливу глутаргіну та ентеросгелю на стан печінки при її ураженні протитуберкульозними засобами зростає при їх поєднаному застосуванні, що проявляється нормалізацією більшості показників, які вивчали.

5. Встановлення позитивного впливу глутаргіну та ентеросгелю, особливо за їх поєднаного застосування, на стан печінки при комбінованому призначенні ізоніазиду, рифампіцину та піразинамиду робить доцільним і перспективним подальше поглиблене вивчення гепатопротекторної активності цих препаратів при ураженні печінки, спровокованому різними антимікобактеріальними засобами та іншими гепатотоксичними агентами.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л.И., Кожемякин Л.А., Кишкун А.А. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41-43.
2. Бабак О.Я. Применение нового отечественного препарата Глутаргин в гастроэнтерологии // Сучасна гастроентерологія. – 2003. – № 2 (12). – С. 85-88.
3. Бондарев Л.С., Клыса Н.М. О проблеме лекарственных гепатитов // Журнал практичного лікаря. – 2004. – № 5-6. – С. 16-19.
4. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33-35.
5. Глутаргін у патогенетичному лікуванні порушень, викликаних уживанням алкоголю: огляд літератури // Мистецтво лікування. – 2008. – № 7 (53). – С. 77-79.
6. Гнедько Н.И. Медикаментозные повреждения печени у больных туберкулезом легких // Военно-медицинский журнал. – 2002. – № 5. – С. 56-58.
7. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – М.: МЕДпресс-информ, 2004. – 920 с.
8. Колпакова Т.А., Колпаков М.А., Башкирова Ю.В. и др. Влияние энтеросорбента СУМС-1 на фармакокинетику изониазида и перекисное окисление липидов у больных туберкулезом легких с лекарственным поражением печени // Проблемы туберкулеза. – 2001. – № 3. – С. 34-36.
9. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
10. Николаев В.Г., Михаловский С.В., Николаева В.В. и др. Энтеросорбция: состояние вопроса и перспективы на будущее // Вісник проблем біології і медицини. – 2007. – Вип. 4. – С. 7-17.
11. Олещук А.М., Николаева В.В., Клищ И.Н. и др. Изучение эффективности использования энтеросорбента Энтеросгель в лекарственной форме – паста для перорального применения при ятрогенной интоксикации противотуберкулезными средствами // Укр. журн. клін. та лаб. медицини. – 2009. – 4, № 4. – С. 95-99.
12. Палий И.Г. Роль энтеросорбции в лечении заболеваний печени // Ліки України. – 2008. – № 4 (120). – С. 95-97.
13. Степанов Ю.М., Кононов И.Н., Журбина А.И., Филиппова А.Ю. Аргинин в медицинской практике (обзор литературы) // Сучасна гастроентерологія. – 2005. – № 4 (24). – С. 121-127.
14. Фещенко Ю.И., Черенько С.А., Мальцев В.И. и др. Оценка значимости побочных реакций противотуберкулезных препаратов при лечении туберкулеза // Укр. мед. часопис. – 2008. – № 3 (65). – С. 117-125.
15. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678-681.
16. Чуканов В.И. Проблема излечения больных туберкулезом органов дыхания // РМЖ. – 2001. – № 9 (21). – С. 954-959.
17. Шаповал О.Н. Туберкулез в Украине: проблемы и перспективы лечения // Провізор. – 2006. – № 2. – С. 20-24.
18. Шейман Б.С., Багдасарова І.В., Осадча О.І. та ін. Вивчення селективної детоксикаційної дії енте-

росорбенту Ентеросгель при комплексному лікуванні нефрологічних захворювань у дітей // Мисцтво лікування. – 2004. – № 5. – С. 68-69.

19. Andrade R.J., Lucena M.I., Fernandez M.C. et al. Drug-Induced Liver Injury: An Analysis of 461 Incidences Submitted to the Spanish Registry Over a 10-Year Period // Gastroenterology. – 2005. – № 129. – P. 512-521.

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

21. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009. – P. 1.

22. Hoda A. Makhlof, Ahmed Helmy, Ehab Fawzy et al. A prospective study of antituberculous drug-induced hepatotoxicity in an area endemic for liver diseases // Hepatol Int. – 2008. – № 2. – P.353-360.

23. Idilman R., Ersoz S., Coban S. et al. Antituberculous Therapy-Induced Fulminant Hepatic Failure: Successful Treatment with Liver Transplantation and Nonstandard Antituberculous Therapy // Liver Transplantation. – 2006. – № 12. – P. 1427-1430.

24. Jussi J. Saukkonen, David L. Cohn, Robert M. Jasmer et al. An Official ATS Statement: Hepatotoxicity of Antituberculosis Therapy // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2006. – **174** (8). – P. 935-952.

25. Kedderis G.L. Biochemical basis of hepatocellular injury // Toxicol Pathol. – 1996. – **24**. – P. 77-83.

26. Tam C.M., Leung C.C. Tuberculosis Manual – SAR, Hong Kong, 2006. – P. 170.

27. Wing-wai Yew, Chi-chiu Leung. Antituberculosis drugs and hepatotoxicity // The Hong Kong Medical Diary. Medical Bulletin. – 2007. – **12**, № 1. – P. 7-9.

Е.А. Посохова, О.О. Шевчук, А.М. Пришляк, И.Л. Мосейчук
ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЛУТАРГИНА И ЭНТЕРОСГЕЛЯ ПРИ ПОРАЖЕНИИ ПЕЧЕНИ, ВЫЗВАННОМ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

Резюме

На модели токсического поражения печени противотуберкулезными препаратами (изониазидом, рифампицином, пиразинамидом) доказан гепатопротекторный эффект глутаргина и энтеросгеля. При этом их комбинированное применение оказалось более эффективным по способности уменьшать уровень показателей цитолиза и холестаза в сыворотке крови (активность аминотрансфераз, щелочной фосфатазы, содержание общего билирубина), угнетать процессы липопероксидации и восстанавливать активность антиоксидантной системы в печени.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: печень, изониазид, рифампицин, пиразинамид, энтеросгель, глутаргин.

K.A. Posokhova, O.O. Shevchuk, A.M. Pryshlyak, I.L. Moseychuk
I.YA. HORBACHEVSKY TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY

THE EFFECTIVENESS OF GLUTARGIN AND ENTEROSGEL IN LIVER INJURY CAUSED BY ANTITUBERCULOSIS DRUGS

Summary

Hepatoprotective effect of Glutargin and Enterosgel was proved on the model of drug-induced liver injury caused by antituberculosis drugs (isoniazid, rifampicin, pyrazinamide). Decreasing of the serum cytolysis and cholestasis indices (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, and total bilirubin level), inhibition of lipid peroxidation and restoring of the antioxidant system activity in the liver were more significant in case of combined usage of Glutargin and Enterosgel, than their single administration.

KEY WORDS: liver, isoniazid, rifampicin, pyrazinamide, enterosgel, glutargin.

Отримано 30.06.10

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

ВСТАНОВЛЕННЯ КІЛЬКІСНИХ СПІВВІДНОШЕНЬ “СТРУКТУРА-ДІЯ”
У РЯДУ γ -(R-БЕНЗОЛСУЛЬФОНІЛОКСАМІДО)БУТАНОВИХ КИСЛОТ

З метою планування та виконання біологічних досліджень здійснено віртуальний скринінг деяких похідних γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)бутанових кислот з використанням програми PASS. Встановлено деякі кількісні закономірності “структура-дія” у ряду вказаних сполук на основі проведення кореляції теоретично розрахованих значень $\log P$ з результатами вивчення біологічної активності. Показано, що $\log P$ добре корелює зі значеннями діуретичної та протизапальної дій і LD_{50} та не корелює зі значеннями анальгетичної, снодійної і протисудомної активностей.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: віртуальний скринінг, ліпофільність, біологічна активність, кореляція, бензолсульфонаміди, γ -аміномасляна кислота, оксамінові кислоти.

ВСТУП. Виявлення певного виду біологічної дії залежить від хімічної структури сполуки. Перелік усіх фармакологічних ефектів, біохімічних механізмів, а також специфічних видів токсичності (мутагенність, канцерогенність, тератогенність та ембріотоксичність), які речовина може проявити в біологічних системах, становить спектр активності даної сполуки.

Для попередньої логіко-структурної оцінки можливої біологічної дії синтезованих сполук ми використовували програму PASS [8, 9, 11, 14, 15, 17, 18], яка дає можливість оцінювати фармакологічні ефекти, механізми дії та специфічну токсичність сполуки. Програма PASS, на відміну від інших методів аналізу зв'язку “структура-активність”, забезпечує прогнозування спектра активності сполуки, включаючи основну дію і можливі побічні ефекти.

З певним припущенням можна стверджувати, що структура сполуки визначає її властивості. Тому в програмі PASS основою для опису сполук вибрано структурну формулу. Це відповідає завданню прогнозування спектрів активності нових, не тільки експериментально не досліджених, але й ще тільки запланованих до синтезу (віртуальних), хімічних сполук.

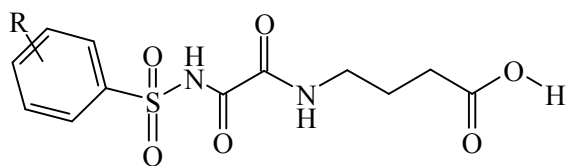
Головною метою програми PASS є прогнозування спектрів активності нових, ще не вивчених, сполук. Прогнозування виконують шляхом “порівняння” структури нової хімічної сполуки зі структурою відомих лікарських препаратів та біологічно активних сполук.

Наслідком роботи алгоритму прогнозування у системі PASS є оцінки, які відповідають оцінкам вірогідності прояву прогнозованою сполукою того чи іншого виду біологічної активності.

На основі даних віртуального скринінгу можна:

- визначити, які тести найбільш адекватні для вивчення біологічної активності конкретної хімічної сполуки;
- знайти нові ефекти і механізми дії для раніше вивчених речовин;
- відібрати найімовірніші базові структури потенційних лікарських засобів з необхідною біологічною дією серед доступних для скринінгу хімічних сполук.

Нами синтезовані γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)бутанові кислоти 1-22 [3-6] загальної формули:



R = H (1), 4-NHCO₂Me (2), 2-NO₂ (3), 3,5-Cl₂-4-NH₂ (4), 4-NO₂ (5), 3-NO₂ (6), 4-Me (7), 3,5-Br₂-4-NH₂ (8), 4-Cl (9), 4-CO₂Et (10), 4-Br (11), 2-Br (12), 4-CH₂NH₂ (13), 4-OMe (14), 4-NHCONHC₆H₁₁-цикло (15), 4-CO₂H (16), 2-CO₂H (17), 3-Me (18), 2-OMe (19), 4-CO₂Me (20), 3-CO₂H (21), 4-NH₂ (22) та проведений їх віртуальний скринінг.

Віртуальна бібліотека сполук 1-22 оброблена програмою PASS для визначення напрямку планування, проведення синтезу та подальших біологічних досліджень. Розрахунки здійснювали за допусків $P_a > 0,7$ і $P_i < 0,005$, що дало можливість провести ретельніший відбір і зменшити ризик потрапляння на відомий лікарський

препарат. Комп'ютерний скринінг синтезованих сполук 1-22 показав, що зазначені речовини повинні володіти різними видами біологічної активності, серед яких переважають протизапальна, протисудомна, анальгетична, діуретична, антидіабетична, гіпотермічна, нейролептична, гематотоксична та снодійна (рис. 1).

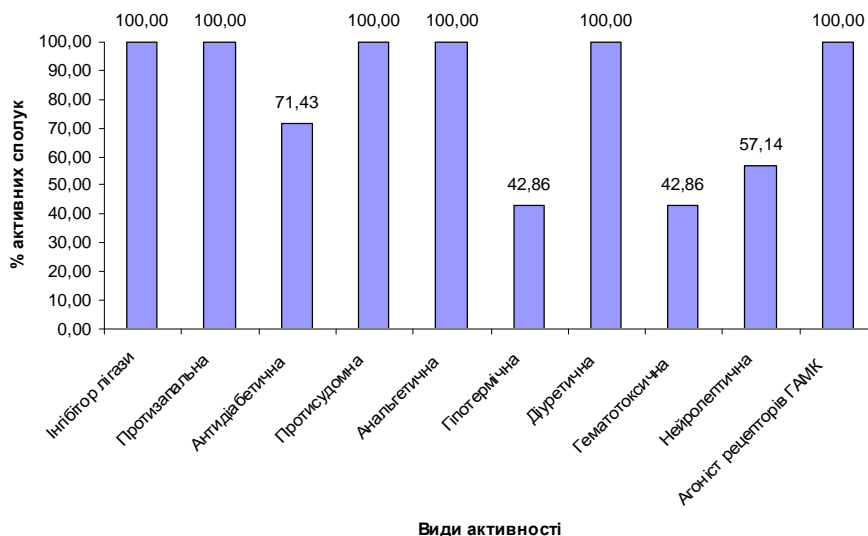


Рис. 1. Результати прогнозування видів фармакологічної активності сполук 1-22 з використанням програми PASS.

З огляду на дані комп'ютерного прогнозу, доцільною була першочергова перевірка синтезованих сполук саме на зазначені види активності (табл. 1) [3-6].

Наступним етапом нашої роботи стали виявлення можливих кореляцій та встановлення кількісних залежностей між розрахованими значеннями $\log P$ й експериментально встановленими даними діуретичної, протизапальної, анальгетичної, снодійної, протисудомної дій та гострої токсичності γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)бутанових кислот 1-22.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Віртуальний скринінг сполук 1-22 здійснювали з використанням програми PASS 1.703.

Методики синтезу та результати вивчення біологічної активності сполук 1-22 описано в [3-6].

Значення $\log P$ розраховано з використанням програми Chem3DUltra 9.0 програмного пакета ChemOffice2005 [10].

Кількісні залежності видів біологічної активності від $\log P$ (кореляційно-регресійний аналіз) проведено із застосуванням програми STATISTIKA 8 [1, 2, 12]. Чим ближче перебував коефіцієнт кореляції до ± 1 , тим тісніший зв'язок між ознаками. За прийнятими у математичній статистиці вимогами, такий зв'язок оцінювали як: $< 0,3$ – зв'язок відсутній, $0,4-0,7$ – зв'язок середній, $> 0,7$ – зв'язок тісний [16, 19, 20].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Усього в статистичну вибірку було включено 22 сполуки. Під час статистичної обробки результатів фармакологічних досліджень при аналізі вибірки довжиною у 22 випадки статистично достовірними вважають значення коефіцієнта кореляції Пірсона, більші 0,40 ($p \leq 0,05$) [7].

Аналіз даних статистичної обробки результатів свідчить про те, що показник $\log P$ корелював зі значеннями діуретичної (%) ($r = -0,4046$) активності та LD_{50} ($r = -0,40682$). Зазначимо, що в першому випадку мало місце негативне значення кореляції, а в другому – позитивне [1] (рис. 2, 3). Не спостерігалось кореляції між показником $\log P$ та протизапальною, анальгетичною, протисудомною діями і снодійною активністю (рис. 4, 5).

Такі поєднання коефіцієнтів кореляції Пірсона і показників значимості показують, що наведені на рисунках 2-5 графіки та рівняння залежності є достовірними.

Встановлено, що діуретична дія залежить від кислотності досліджуваних сполук, що визначається наявністю в їх структурі відповідних функціональних груп; вплив кислотних властивостей на діурез пов'язують з їх впливом на транспорт електролітів в організмі [13]. Це, можливо, й пояснює як високу діуретичну активність, так і наявність кількісної залежності

Таблиця 1 – Узагальнені дані щодо деяких видів біологічної активності*, ЛД₅₀ [3-6] та розраховані значення logP для сполук 1-22

Спол.	logP	Діуретична дія		Проти-запальна дія	Анальгетична дія	Снодійна дія	ЛД ₅₀	Протисудомна дія			
		2 год	4 год					1	2	3	4
1	-0,3073	126,7	132,4	4,3	12,8	126,1	1885	25,6	67,6	63,2	28,9
2	-0,8138	103,1	103,2	54,4	51,2	92,2	2495	46,2	75,7	76,3	68,4
3	-0,57	160,9	163,3	40,4	37,8	80,5	1890	10,3	16,2	18,4	7,9
4	6,3·10 ⁻³	124,6	131,7	35,0	27,6	72,9	2930	41,0	62,2	68,4	28,9
5	-0,57	285,6	374,5	20,6	31,7	105,3	1810	15,4	70,3	68,4	21,1
6	-0,57	174,6	176,6	31,9	26,5	99,2	1896	20,5	16,2	15,8	10,5
7	0,1798	128,1	133,4	–	3,4	113,0	2495	25,6	16,2	63,2	28,9
8	0,5477	127,6	133,6	8,6	12,8	89,1	3015	30,8	67,6	68,4	39,5
9	0,2509	112,5	11,6	14,5	12,8	115,5	2630	12,8	16,2	15,8	13,2
10	-0,1491	124,1	128,1	13,5	–	105,7	2570	15,4	51,4	71,1	23,7
11	0,5216	115,6	115,2	13,1	16,8	128,2	3415	15,4	21,6	26,3	15,8
12	0,5216	118,0	123,2	11,6	5,3	119,6	3365	30,8	64,9	68,5	39,5
13	-1,2624	89,1	86,4	20,3	14,3	91,2	3000	38,5	43,3	44,7	18,4
14	-0,4337	164,4	169,4	9,2	14,8	118,6	2540	5,1	8,0	21,1	21,1
15	5,58·10 ⁻²	121,1	128,4	21,7	28,8	80,8	3380	5,1	13,5	18,4	7,9
16	-0,7503	288,3	381,6	16,0	8,2	209,8	3150	20,5	24,3	18,4	5,3
17	-0,7503	265,6	320,1	18,6	14,3	134,0	2410	–	–	–	–
18	0,1798	180,0	210,4	–	8,8	88,1	2930	–	–	–	–
19	-0,4337	168,0	175,9	12,2	17,6	89,4	2635	–	–	–	–
20	-0,4872	135,2	152,6	10,7	–	114,3	3025	–	–	–	–
21	-0,7503	274,4	296,4	18,6	12,5	162,1	2775	–	–	–	–
22	-1,1101	186,4	194,4	21,4	16,6	89,0	2475	–	–	–	–

Примітка. * – значення наведено у % до контролю.

“структура-дія” у випадку γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)бутанових кислот 1-22.

Відсутність статистичної залежності між згаданими параметрами у випадку інших видів активності, ймовірно, можна пояснити іншими механізмами дії, які у теоретичних розрахунках logP не враховані.

Встановлення математичних залежностей “структура-дія” у перспективі дозволить передбачити можливість та міру виявлення певних фармакологічних властивостей похідних γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)бутанових кислот і сприятиме оптимізації пошуку біологічно активних речовин даного ряду.

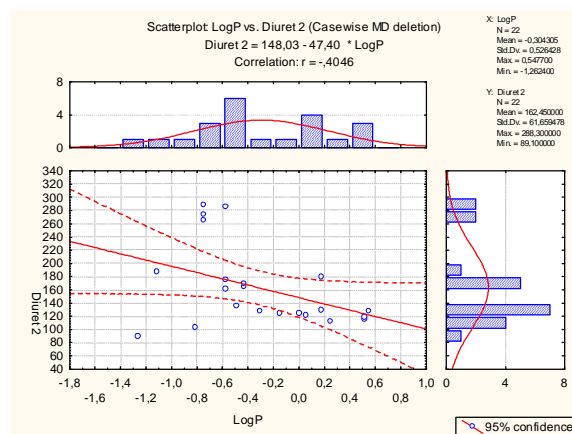


Рис. 2. Кореляція діуретичної активності та logP.

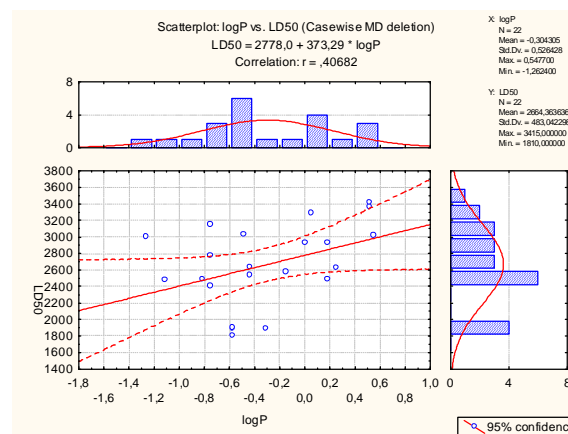


Рис. 3. Кореляція ЛД₅₀ та logP.

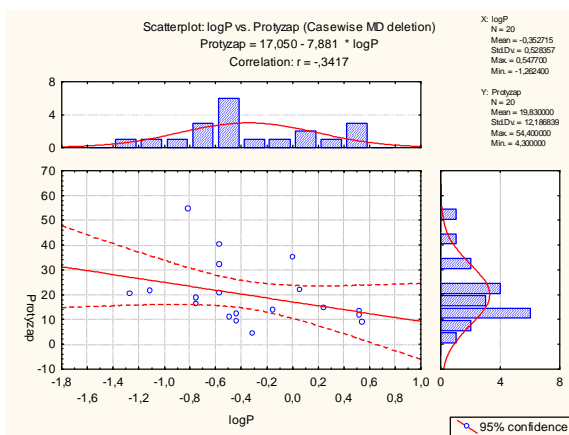


Рис. 4. Кореляція протизапальної активності та logP.

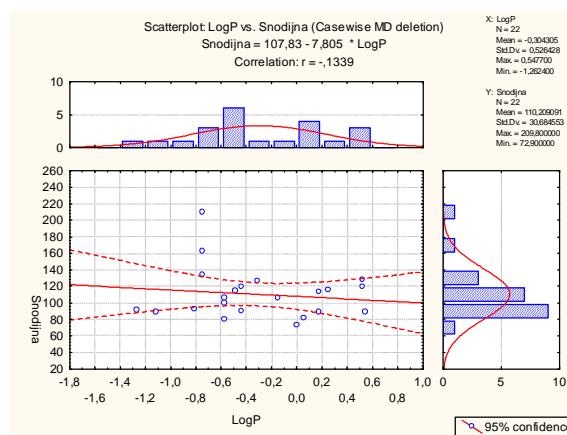


Рис. 5. Кореляція снодійної активності та logP.

ВИСНОВКИ. 1. Проведено віртуальний скринінг похідних γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)бутанових кислот з використанням програми PASS. Встановлено, що сполуки даного ряду можуть проявляти протизапальну, протисудомну, анальгетичну, діуретичну, антидіабетичну, гіпотермічну, нейролептичну, гематотоксичну та снодійну активності.

2. З метою встановлення математичних залежностей “структура-дія” проведено регре-

сію-кореляційний аналіз розрахованих показників logP з результатами вивчення біологічної активності.

3. Встановлено, що показник logP корелює зі значеннями діуретичної активності (негативне значення кореляції) та ЛД₅₀ (позитивне значення) і не корелює з рівнями протизапальної, снодійної, анальгетичної та протисудомної активностей.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Боровиков В.П. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. – 2-е изд. – СПб.: Питер, 2003. – 688 с.
2. Вуколов Э.А. Основы статистического анализа. – М.: Форум, 2008. – 464 с.
3. Георгіянц В.А., Банна Н.І., Савченко В.М., Банний І.П. Протизапальна та анальгетична активність γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)бутанових кислот // Укр. вісник психоневрології. – 2008. – **16**, вип. 3 (56), додаток. – С. 69-71.
4. Георгіянц В.А., Банна Н.І., Савченко В.М., Банний І.П. Протисудомна активність γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)бутанових і γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)бутанових кислот // Ліки-людині. Сучасні проблеми створення, вивчення та апробації лікарських засобів: Матеріали XXVI науково-практичної конференції з міжнародною участю (12 березня 2009 р.). – Харків: Вид-во НФаУ, 2009. – С. 178-181.
5. Георгіянц В.А., Банна Н.І., Савченко В.М., Банний І.П. Синтез, гостра токсичність та біологічні властивості γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)бутанових кислот та γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)бутанових кислот // Фармац. журн. – 2010. – № 2. – С. 34-40.
6. Георгіянц В.А., Банна Н.І., Савченко В.М., Банний І.П. Синтез, гостра токсичність та діуретична активність γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)бутанових кислот // Вісник фармації. – 2007. – № 4 (52). – С. 3-8.

7. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. – Л.: Медицина, 1973. – 141 с.
8. Лагуни А.А., Филимонов Д.А., Поройков В.В. Компьютерный поиск потенциальных антигипертензивных соединений комбинированного действия // Хим.-фармац. журн. – 2001. – № 35 (7). – С. 28-34.
9. Поройков В.В., Филимонов Д.А., Глорисозова Т.А. и др. Компьютерное предсказание биологической активности химических веществ: виртуальная хемогеномика // Вестник ВОГиС. – 2009. – **13**, № 1. – С. 137-143.
10. Соловьев М.Е., Соловьев М.М. Компьютерная химия. – М.: СОЛОН-Пресс, 2005. – 536 с.
11. Филимонов Д.А., Поройков В.В. Прогноз спектров биологической активности органических соединений // Рос. хим. журн. – 2006. – **50**. – С. 66-75.
12. Халафян А.А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных: Учебник. – 3-е изд. – М.: ООО “Бином-Пресс”, 2007. – 512 с.
13. Черных В.П. Синтез, реакционная способность и изучение связи “структура-биологическая активность” производных дикарбоновых кислот: Автореф. дисс. ... д-ра хим. наук. – Х., 1990. – 40 с.
14. Anzali S., Barnickel G., Cezanne B. et al. Discriminating between drugs and non-drugs by

- Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS) // J. Med. Chera. – 2001. – 4 (15). – P. 2432-2437.
15. Filimonov D., Poroikov V., Borodina Yu., Glorizova T. Chemical Similarity Assessment through Multilevel Neighborhoods of Atoms: Definition and Comparison with the Other Descriptors // J. Chem. Inf. Comput. Sci. – 1999. – 39 (4). – P. 666-670.
16. Grangust L., Kovar J.G. Editing in survey data: how much it enough? / The Survey Management and Process Quality. – New York: Wiley, 1997. – P. 415-435.
17. Lagunin A., Stepanchikova A., Filimonov D., Poroikov V. PASS: prediction of activity spectra for biologically active substances // Bioinformatics. – 2000. – 16 (8). – P. 747-748.
18. Poroikov V., Akimov D., Shabelnikova E., Filimonov D. Top 200 medicines: can new actions be discovered through computer-aided prediction? // SAR and QSAR in Environmental Research. – 2001. – 12 (4). – P. 327-344.
19. Rivere P. Quality et Statistique / Courier des statistique. – Paris: INSEE, 1999. – № 90. – P. 47-58.
20. Statistics Canada 2003. Survey methods and practices. Statistics Canada Catalogue no. 12-587-XPE, Ottawa, Ontario. – 396 p.

В.А. Георгиянц, Н.И. Банная, О.С. Крыськив, И.П. Банний
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

УСТАНОВЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ СООТНОШЕНИЙ “СТРУКТУРА-ДЕЙСТВИЕ” В РЯДУ γ -(R-БЕНЗОЛСУЛЬФОНИЛОКСАМИДО)БУТАНОВЫХ КИСЛОТ

Резюме

С целью планирования и исполнения биологических исследований осуществлен виртуальный скрининг некоторых производных γ -(R-бензолсульфонилоксиамидо)бутановых кислот с использованием программы PASS. Установлено некоторые количественные закономерности “структура-действие” в ряду указанных соединений на основании проведения корреляции теоретически рассчитанных значений $\log P$ с результатами изучения биологической активности. Показано, что $\log P$ хорошо коррелирует со значениями диуретического и противовоспалительного действий и LD_{50} и не коррелирует со значениями анальгетической, снотворной и противосудорожной активностей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: виртуальный скрининг, липофильность, биологическая активность, корреляция, бензолсульфонамиды, γ -аминоасляная кислота, оксаминовые кислоты.

V.A. Heorhiyants, N.I. Banna, O.S. Kryskiv, I.P. Bannyi
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

ESTABLISHMENT OF QUANTITATIVE RELATIONS “STRUCTURE-ACTIVITY” IN RANGE OF γ -(R-BENZENESULFONILOXAMIDO)BUTANOIC ACIDS

Summary

With the purpose of planning and conducting of biological researches virtual screening of some derivates has been carried out γ -(R-benzenesulfoniloxamido)-butanoic acids using the PASS-program. The quantitative “structure-activity” correlation in range of γ -(R-benzenesulfoniloxamido)butanoic acids on the basis of their calculated $\log P$ values with the results of study of biological activity has been made. It has been established that $\log P$ well correlates with the values of diuretic and anti-inflammatory activity and LD_{50} and does not correlate with the values of analgesic, somnolent and anticonvulsant activities.

KEY WORDS: virtual screening, lipophilicity, biological activity, correlation, benzenesulfonamides, γ -aminobutyric acid, oxamines acids.

Отримано 03.09.10

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

**ВПЛИВ ГЛЮКОЗАМІНУ ГІДРОХЛОРИДУ НА АКТИВНІСТЬ
ОКИСНЮВАЛЬНОЇ МОДИФІКАЦІЇ БІЛКІВ І СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ
СИСТЕМИ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГОСТРОЇ ЦЕРЕБРАЛЬНОЇ
ІШЕМІЇ**

Судинні ураження головного мозку є однією з головних причин інвалідизації та смертності хворих неврологічного профілю, тому пошук нових ефективних засобів, що мають церебропротекторну активність, – актуальний напрямок сучасної фармакології. У даній статті наведено результати дослідження, які дозволяють зробити висновок, що глюкозаміну гідрохлорид гальмує розвиток окиснювальної модифікації білків та підвищує активність антиоксидантної системи в експериментальних тварин за умов гострого порушення мозкового кровообігу на 4 та 18 доби достовірно щодо контролю і групи референтного препарату. Встановлені властивості забезпечують церебропротекторний ефект глюкозаміну гідрохлориду.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: глюкозаміну гідрохлорид, окиснювальна модифікація білків, антиоксидантна система, церебропротекція.

ВСТУП. Порушення мозкового кровообігу залишається важливою медико-соціальною проблемою у всьому світі та займає одне з перших місць серед причин смерті й інвалідизації [6, 11]. В Україні щорічно реєструють понад 200 тисяч інсультів, летальність через які досягає 40 %, а серед тих, хто вижив, значну частину складають недієздатні інваліди [1]. Тому пошук ефективних та безпечних засобів з церебропротекторною активністю є пріоритетним напрямком сучасної нейрофармакології [10].

За умов порушення мозкового кровообігу відбувається патологічна активізація процесів вільнорадикального окиснення (ВРО) – перекисного окиснення ліпідів, окиснювальної модифікації білків (ОМБ) [3]. Фізіологічна антиоксидантна система (АОС) включає внутрішньоклітинні антиокиснювальні ферментні системи, основними з яких є супероксиддисмутаза (СОД) і каталаза (КТ), що протидіють окисному стресу та знешкоджують АФК у нормі й при патології [12]. Розбалансування процесів ВРО та АОС за умов порушення мозкового кровообігу є головною причиною загибелі нейрональних клітин [13].

Аміноцукор глюкозаміну гідрохлорид (2-дезоксид-2-аміно-D(+)-глюкози гідрохлорид) є природною сполукою, яку застосовують у сучасній медицині як хондропротектор [9, 14] та яка має цілий спектр інших видів фармакологічної активності [7].

© О.Є. Грінцова, 2010.

Метою даного дослідження було вивчення впливу глюкозаміну гідрохлориду на процеси ОМБ та активність АОС за умов гострого порушення мозкового кровообігу (ГПМК) для встановлення можливого церебропротекторного ефекту.

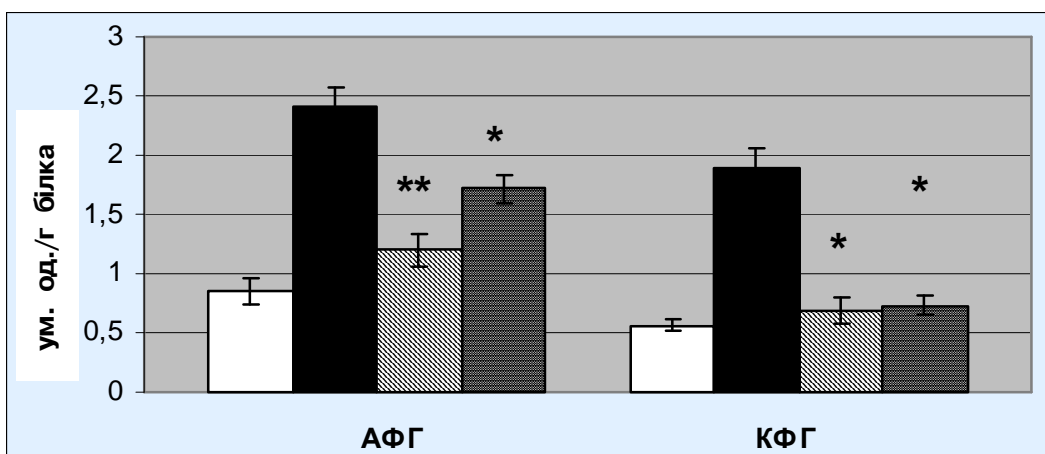
МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження було проведено на 70 білих щурах лінії Вістар обох статей масою 150-200 г згідно з Положенням про використання тварин у біомедичних дослідженнях. ГПМК моделювали двобічним перев'язуванням загальних сонних артерій під нембуталовим наркозом (40 мг/кг) із використанням хірургічного доступу шляхом виділення сонних артерій і одномоментного накладання на них шовкової лігатури [2]. Глюкозаміну гідрохлорид (у дозі 50 мг/кг) та референтний препарат "Мексидол" [5] (у дозі 100 мг/кг) вводили внутрішньошлунково відразу після двобічного перев'язування загальних сонних артерій, а потім у різних групах – протягом ще трьох днів та впродовж ще сімнадцяти днів. Для оцінки інтенсивності ОМБ визначали рівень її маркерів – альдегідфенілгідразонів (АФГ) та кетонфенілгідразонів (КФГ). Стан АОС оцінювали за активністю СОД і каталази. Показники ОМБ визначали у тканинах головного мозку за методом В. Halliwell [12], вміст СОД – за методикою, описаною Чеварі зі співавторами [8], активність каталази – за реакцією з молібдатом амонію [4].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Активізація ВРО викликала зміни у протеїновій фракції мозкової тканини, про що свідчили зміни концентрації маркерів ОМБ – АФГ та КФГ (рис. 1, 2).

За умов модельованої патології та активізації ВРО на 4 добу експерименту відбувалось достовірне ($p < 0,05$) підвищення концентрації АФГ – до $(2,41 \pm 0,17)$ ум. од./г білка порівняно з $(0,86 \pm 0,11)$ ум. од./г білка в інтактних тварин та КФГ – до $(1,89 \pm 0,16)$ ум. од./г білка ($(0,56 \pm 0,05)$ ум. од./г білка в інтактних тварин). На 18 добу експерименту відмічали зниження рівня маркерів: АФГ – до $(2,18 \pm 0,2)$ ум. од./г

білка та КФГ – до $(1,55 \pm 0,19)$ ум. од./г білка, але зміни мали лише характер тенденції, адже показники залишались достовірно більшими ($p < 0,05$), ніж в групі інтакту.

На 4 добу спостереження у групі щурів, які отримували референтний препарат “Мексидол”, рівень АФГ склав $(1,72 \pm 0,12)$ ум. од./г білка, а КФГ – $(0,73 \pm 0,09)$ ум. од./г білка. Показники були достовірно ($p < 0,05$) вищими, ніж в інтактних тварин, але їх рівень був достовірно ($p < 0,05$) нижчим, ніж у групі контрольної патології. На 18 добу експерименту рівень АФГ склав $(1,21 \pm 0,13)$ ум. од./г білка, КФГ – $(0,62 \pm 0,08)$ ум. од./г білка і



- Інтактна група
- Контрольна група
- Група тварин, які отримували глюкозаміну гідрохлорид
- Група тварин, які отримували мексидол

Примітка. * – відхилення показника достовірно стосовно контрольної групи;
** – відхилення показника достовірно стосовно групи тварин, які отримували мексидол.

Рис. 1. Вміст маркерів окиснювальної модифікації білків – альдегідфенілгідрозону (АФГ) та кетонфенілгідрозону (КФГ) у тканинах мозку дослідних тварин на 4 добу дослідження.

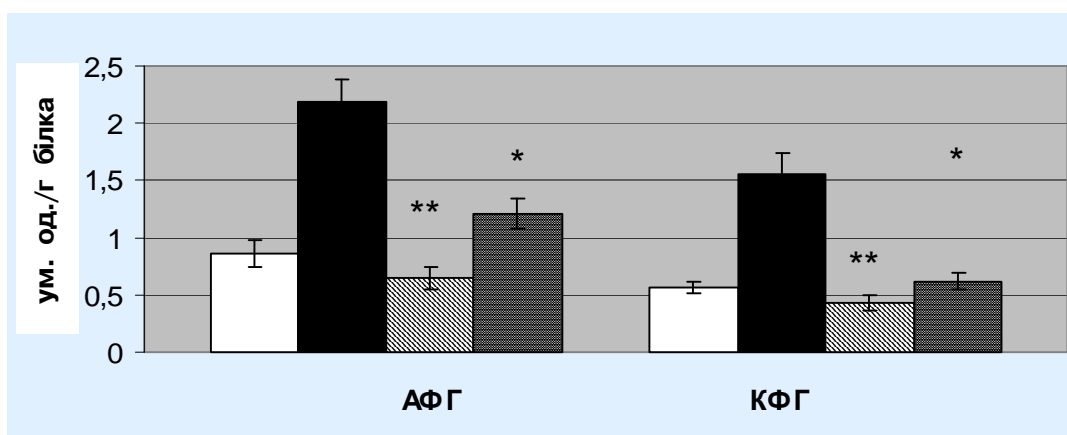


Рис. 2. Вміст маркерів окиснювальної модифікації білків – альдегідфенілгідрозону (АФГ) та кетонфенілгідрозону (КФГ) у тканинах мозку дослідних тварин на 18 добу дослідження.

статистично значно ($p > 0,05$) не відрізнявся від такого в інтактних тварин.

На тлі застосування глюкозаміну гідрохлориду також відмічали збільшення концентрації маркерів ОМБ: АФГ – до $(1,2 \pm 0,14)$ ум. од./г білка та КФГ – до $(0,68 \pm 0,11)$ ум. од./г білка, однак вираження цих зсувів було достовірно меншим ($p < 0,05$), ніж у групі контрольної патології. На 18 добу спостереження вміст АФГ знизився до $(0,65 \pm 0,1)$ ум. од./г білка, а КФГ – до $(0,43 \pm 0,06)$ ум. од./г білка, що було достовірно менше ($p < 0,05$) не тільки порівняно з контрольною групою, але й відносно групи тварин, які отримували мексидол. Таким чином, виявлено гальмівну дію глюкозаміну гідрохлориду на ОМБ, що проявлялось достовірно нижчим рівнем маркерів на 4 добу експерименту та нормалізацією показників на 18 добу.

У результаті ГПМК внаслідок вичерпання ресурсів власної АОС відбувалось різке зниження рівня її основних ферментів – КТ та СОД (рис. 3, 4).

У групі контрольної патології на 4 добу експерименту концентрація КТ складала $(2,59 \pm 0,22)$ мкат/мг білка/хв, що було у 3 рази менше порівняно з групою інтакту ($(7,7 \pm 0,23)$ мкат/мг білка/хв), а СОД – в 1,5 рази менше ($(75,51 \pm 3,85)$) проти $(208,44 \pm 9,99)$ ум. од./мг білка/хв). На 18 добу спостереження вміст антиоксидантних ферментів залишався, як і раніше, на низькому рівні: КТ – $(2,87 \pm 0,29)$ мкат/мг білка/хв та СОД – $(79,73 \pm 8,74)$ ум. од./мг білка/хв.

У групі тварин, які отримували мексидол, на 4 добу експерименту відмічали зниження концентрації як КТ (до $(3,64 \pm 0,13)$ мкат/мг білка/хв), так і СОД (до $(110,48 \pm 2,52)$ ум. од./мг

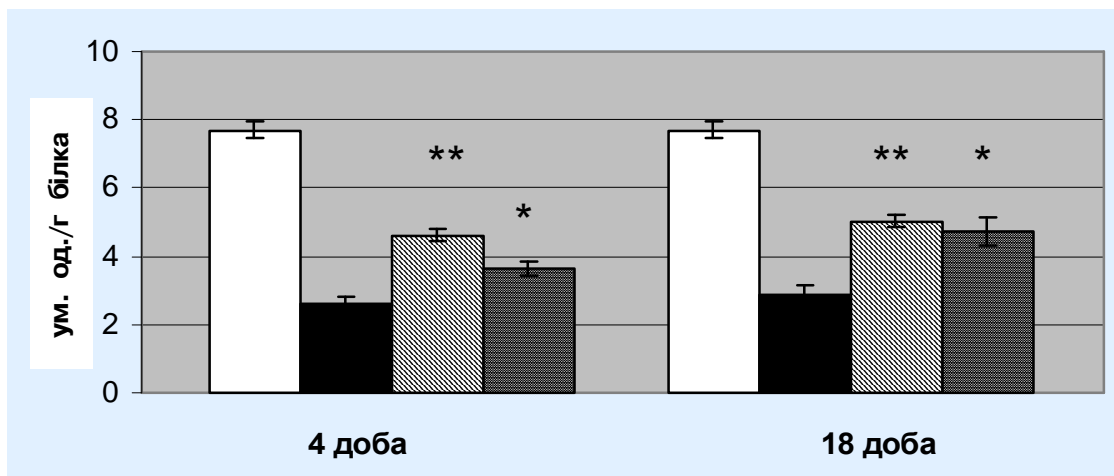


Рис. 3. Вміст каталази у мозку дослідних тварин на 4 та 18 доби після гострого порушення мозкового кровообігу.

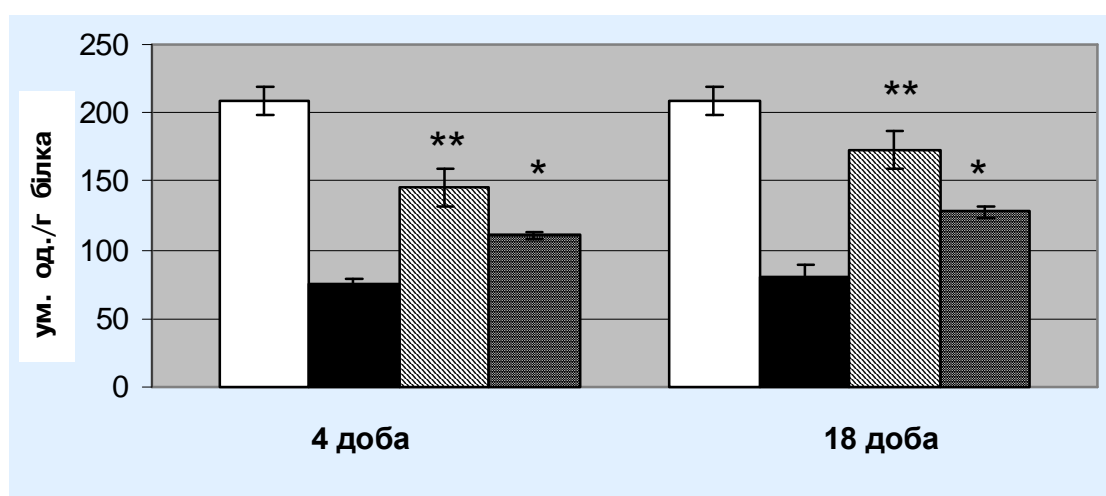


Рис. 4. Вміст супероксиддисмутази у тканинах мозку дослідних тварин на 4 та 18 доби спостереження.

білка/хв). Проте зсуви показників були менш вираженими та достовірно ($p < 0,05$) відрізнялись від контролю. На 18 добу експерименту рівень КТ зріс до $(4,73 \pm 0,41)$ мкат/мг білка/хв, а СОД – до $(127,94 \pm 4,26)$ ум. од./мг білка/хв, що було достовірно ($p < 0,05$) більше, ніж у групі контрольної патології.

На тлі введення глюкозаміну гідрохлориду рівень антиоксидантних ферментів на 4 добу знижувався (КТ – до $(4,62 \pm 0,2)$ мкат/мг білка/хв та СОД – до $(145,78 \pm 13,24)$ ум. од./мг білка/хв) достовірно ($p < 0,05$) менш виражено як порівняно з контролем, так і порівняно з тваринами, які отримували мексидол. На 18 добу спостереження вміст КТ становив $(5,02 \pm 0,18)$ мкат/мг білка/хв, СОД – $(172,72 \pm 13,23)$ ум. од./мг білка/хв. Показники статистично значно ($p < 0,05$) були вищими, ніж у контрольній групі та групі референтного препарату. Таким чином, встановлено властивість глюкозаміну гідрохлориду підвищувати активність антиок-

сидантного захисту організму, реалізуючи свою дію через каталазу і супероксиддисмутазу.

ВИСНОВКИ. 1. Глюкозаміну гідрохлорид має інгібуючий вплив на окиснювальну модифікацію білків, що підтверджується достовірно нижчим рівнем маркерів (альдегідфенілгідразону та кетонфенілгідразону) на 4 добу гострого порушення мозкового кровообігу та нормалізацією показників на 18 добу експерименту.

2. Глюкозаміну гідрохлорид за умов гострого порушення мозкового кровообігу підвищує активність антиоксидантної системи, про що свідчить більший рівень каталази і супероксиддисмутази на 4 та 18 доби експерименту порівняно з групами контролю і референтного препарату.

3. Здатність глюкозаміну гідрохлориду гальмувати процеси вільнорадикального окиснення та активізувати власну антиоксидантну систему тканин мозку може забезпечувати його церебропротекторну дію.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Беленичев И.Ф., Черний В.И., Колесник Ю.М. и др. Рациональная нейропротекция. – Донецк: Издатель Заславский А.Ю., 2009. – 262 с.

2. Буреш Я., Бурешова О., Дж.Н. Хьюстон. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Высшая школа, 1991 – С. 135-240.

3. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. – М.: Медицина, 2001. – 328 с.

4. Королюк М.А. Способ определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.

5. Мексидол в клинике и эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – Приложение 1. – М.: Изд-во РАМН, 2006. – 249 с.

6. Суслина З.А., Варакин Ю.Я., Верещагин Н.В. Сосудистые заболевания головного мозга: Эпидемиология. Основы профилактики. – М.: МЕДпресс-информ, 2006. – 256 с.

7. Туляков В.О., Зупанець К.О., Шебеко С.К. Фармакологічні властивості глюкозаміну: мембраностабілізуючі, протизапальні, антиоксидантні і імунотропні // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2009. – № 2. – С. 3-6.

8. Чевари С., Чаба И., Сеней Й. Роль супероксиддисмутази в окислительных процессах клетки и методы ее определения в биологическом материале // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 678-681.

9. Clegg D.O., Reda D.J., Harris C.L. et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and two in combination for painful knee osteoarthritis // N. Engl. J. Med. – 2006. – **354**. – P. 795-808.

10. De la Ossa N.P., Davalos A. Neuroprotection in cerebral infarction: the opportunity of new studies // Cerebrovasc. Dis. – 2007. – № 24. – P. 153-156.

11. Donnan G.A., Fisher M., Macleod M. et al. Stroke // Lancet. – 2008. – № 371. – P. 1612-1623.

12. Halliwell B., Yutteridge M.C. Free radical in Biology and Medicine. – Oxford: Clarendon Press, 1999. – 320 p.

13. Sims N.R., Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – **12**. – P. 12-17.

14. Vangness C.T.Jr., Spiker W., Erickson J. A review of evidence-based medicine for glucosamine and chondroitin sulfate use in knee osteoarthritis // Arthroscopy. – 2009. – № 25 (1). – P. 86-94.

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗАМИНА ГИДРОХЛОРИДА НА АКТИВНОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОСТРОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

Резюме

Сосудистые поражения головного мозга являются одной из основных причин инвалидизации и смертности больных неврологического профиля, поэтому поиск новых эффективных средств, обладающих церебропротекторной активностью, – актуальное направление современной фармакологии. В данной статье приведены результаты исследования, которые позволяют заключить, что глюкозамина гидрохлорид тормозит развитие окислительной модификации белков и повышает активность антиоксидантной системы у экспериментальных животных в условиях острого нарушения мозгового кровообращения на 4 и 18 сутки достоверно по отношению к контролю и группе референтного препарата. Установленные свойства обеспечивают церебропротекторный эффект глюкозамина гидрохлорида.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глюкозамина гидрохлорид, окислительная модификация белков, антиоксидантная система, церебропротекция.

O.Ye. Hrintsova
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

INFLUENCE OF GLUCOSAMINE HYDROCHLORIDE ON THE ACTIVITY OF OXIDATIVE PROTEIN MODIFICATION AND ON THE STATE OF ANTIOXIDANT SYSTEM IN THE TERMS OF EXPERIMENTAL ACUTE CEREBRAL ISCHEMIA

Summary

Vascular damages of brain are one of the main causes of disability and death of the patients in neurology hospital units. Research and development of new effective medicines with ability of cerebral protection is an actual direction of modern pharmacology. This article presents results of investigation that enable to make a conclusion that the glucosamine hydrochloride inhibits the development of oxidative protein modification and increases the activity of antioxidant system of experimental animals in terms of acute damage of cerebral blood circulation on the 4th and 18th days. The results are significant to the control group and to the reference group. The established properties prove the cerebroprotective effect of glucosamine hydrochloride.

KEY WORDS: glucosamine hydrochloride, oxidative protein modification, antioxidant system, cerebral protection.

Отримано 03.03.10

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

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

С.Г. Ісаєв, О.О. Павлій, О.В. Антоненко, Н.П. Кобзар, О.В. Колісник,
О.М. Сергієнко, І.А. Сокурєнко
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

МІДНІ КОМПЛЕКСИ 3,5-ДИНІТРО-N-ФЕНІЛАНТРАНІЛОВИХ КИСЛОТ, ЇХ СИНТЕЗ, БУДОВА ТА ФАРМАКОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ

Здійснено синтез нових мідних комплексів 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот через стадію утворення натрієвих солей відповідних кислот. Будову та чистоту 8 синтезованих сполук підтверджено даними елементного, ІЧ-спектрального та хроматографічного аналізу, якісними реакціями. За класифікацією К.К. Сидорова, мідні комплекси 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот при внутрішньошлунковому введенні належать до класу малотоксичних речовин. Встановлено, що синтезовані речовини проявляють протизапальну, жовчогінну, бактеріостатичну та протигрибкову активність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: синтез, N-фенілантранілові кислоти, мідні комплекси, фармакологічний скринінг.

ВСТУП. Попередніми дослідженнями доведено властивості біометалів у життєдіяльності організму. Вони входять до складу активних центрів ферментів, сприяють осмотичній рівновазі в клітині, беруть участь в усіх фізіологічних процесах. Мідь є металокомпонентом багатьох ферментних систем, відіграє роль незамінного активатора, має специфічну дію на синтез гемоглобіну та утворення еритроцитів [9]. Експериментально доведено, що в координаційних сполуках N-фенілантранілових кислот (N-ФАК) з біометалами підсилюється терапевтичний ефект та знижується токсичність [1, 4, 5, 8]. На основі вищенаведеного як об'єкт

досліджень нами було обрано мідні комплекси 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Мідні комплекси 3,5-динітро-N-ФАК (I-VIII) синтезовано шляхом взаємодії натрієвих солей відповідних кислот з міді сульфатом (рис. 1). Будову та індивідуальність сполук (I-VIII) підтверджено даними елементного, ІЧ-спектрального та хроматографічного аналізу (табл. 1). Дані елементного аналізу відповідають розрахованим. Інтерпретацію ІЧ-спектрів мідних комплексів 3,5-динітро-N-ФАК проведено порівняно зі спектрами модельних сполук [6, 7].

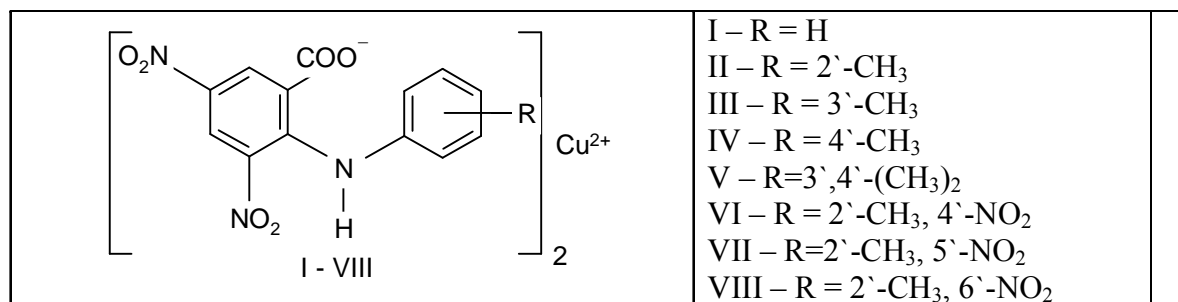


Рис. 1. Мідні комплекси 3,5-динітрофенілантранілових кислот.

З даних літератури [1, 5] відомо, що величина $\Delta\nu = \nu_{COO^-}^{as} - \nu_{COO^-}^s$ є мірою асиметрії зв'язку метал-оксиген. У молекулах калієвих солей 3,5-динітро-N-ФАК (іонний тип зв'язку)

група $-\overset{O^{1/2}}{\underset{O^{1/2}}{C}}$ симетрична на відміну від

групи $-\overset{O}{\underset{O^-}{C}}$ кислоти, що призводить до зміщення смуги поглинання в спектрі асиметричних коливань карбоксилат-іонів у низькочастотну ділянку спектра [1], що і підтверджує солеутворення. В ІЧ-спектрах мідних комп-

© С.Г. Ісаєв, О.О. Павлій, О.В. Антоненко, Н.П. Кобзар, О.В. Колісник, О.М. Сергієнко, І.А. Сокурєнко, 2010.

лексів (табл. 2) смуги поглинання асиметричних валентних коливань ($\nu_{COO^-}^{as}$) розміщені в ділянці 1636-1620 cm^{-1} , а симетричних ($\nu_{COO^-}^s$) – в інтервалі 1492-1468 cm^{-1} , таким чином величина $\Delta\nu$ зменшується до 146 cm^{-1} [1, 6, 7] порівняно з кислотами та їх калієвими соля-

ми. Цей факт свідчить про вищу симетрію зв'язків і є одним з аргументів утворення комплексу металу з N-ФАК. В ІЧ-спектрах мідних комплексів 3,5-динітро-N-ФАК (табл. 2) також інтерпретовані інші основні характеристики поглинання, які підтверджують їх будову – ν , cm^{-1} : ν , cm^{-1} 3318-3298 (ν_{NH}), 1600-1580 (ν_{CPh}), 1542-1530 ($\nu_{NO_2}^{as}$), 1368-1344 ($\nu_{NO_2}^s$).

Таблиця 1 – Мідні комплекси 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот

Сполука	R	Вихід, %	Т.топл., °C	Знайдено, %		Емпірична формула	Вирахувано, %		Rf*	
				N	Cu		N	Cu	1	2
I	H	90	>300	12,50	9,58	C ₂₆ H ₁₆ N ₆ O ₁₂ Cu	12,54	9,51	0,38	0,41
II	2'-CH ₃	91	185-189	12,03	9,10	C ₂₆ H ₂₀ N ₆ O ₁₂ Cu	12,07	9,13	0,40	0,37
III	3'-CH ₃	95	166-168	12,22	9,02	C ₂₆ H ₂₀ N ₆ O ₁₂ Cu	12,07	9,13	0,58	0,36
IV	4'-CH ₃	94	146-148	12,10	9,18	C ₂₆ H ₂₀ N ₆ O ₁₂ Cu	12,07	9,13	0,60	0,38
V	3',4'-(CH ₃) ₂	96	>300	11,63	8,70	C ₃₀ H ₂₈ N ₆ O ₁₂ Cu	11,60	8,73	0,55	0,34
VI	2'-CH ₃ ,4'-NO ₂	89	>300	14,33	8,26	C ₂₈ H ₁₈ N ₈ O ₁₆ Cu	14,26	8,08	0,36	0,30
VII	2'-CH ₃ ,5'-NO ₂	92	>300	14,19	8,22	C ₂₈ H ₁₈ N ₈ O ₁₆ Cu	14,26	8,08	0,35	0,28
VIII	2'-CH ₃ ,6'-NO ₂	93	>300	14,23	8,17	C ₂₈ H ₁₈ N ₈ O ₁₆ Cu	14,26	8,08	0,42	0,37

Примітка. *Значення R_f наведено в системах: 1 – діоксан-гексан (1:3); 2 – ацетон-хлороформ-гексан (1:1:1).

Таблиця 2 – Максимуми поглинання в ІЧ-спектрах мідних комплексів 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот

Сполука	Частота поглинання, cm^{-1}						
	ν_{NH}	$\nu_{COO^-}^{as} / \nu_{COO^-}^s$	ν_{C-Ph}	$\nu_{NO_2}^{as}$	$\nu_{NO_2}^s$	$\nu_{CH_3}^{as}$	$\nu_{CH_3}^s$
I	3300	$\frac{1630}{1770}$	1580	1540	1360	–	–
II	3310	$\frac{1630}{1472}$	1590	1530	1362	2905	2862
III	3305	$\frac{1632}{1468}$	1596	1533	1365	2908	2866
IV	3310	$\frac{1620}{1474}$	1592	1535	1366	2902	2860
V	3315	$\frac{1630}{1480}$	1590	1542	1368	2900	2858
VI	3318	$\frac{1632}{1478}$	1592	1536	1350	2910	2866
VII	3305	$\frac{1630}{1482}$	1598	1540	1346	2912	2990
VIII	3298	$\frac{1636}{1492}$	1600	1538	1344	2916	2876

Для виявлення протизапальної активності у металокомплексів (I-VIII) досліджували їх здатність пригнічувати розвиток набряку при гострому запаленні, яке викликане субплантарним введенням 1 % розчину карагеніну в лапку миші [3]. Досліджувані речовини (I-VIII) вводили перорально у дозі 20 мг/кг. Рефренс-препаратами були вольтарен (DE₅₀=8 мг/кг) та мефенамова кислота у дозі 100 мг/кг.

Бактеріостатичну і фунгістатичну активність мідних комплексів 3,5-динітро-N-

ФАК *in vitro* вивчали за методикою двократних серійних розведень [3] у рідкому живильному середовищі.

Жовчогінну дію речовин (I-VIII) досліджували на інтактних щурах за методом Н.П. Скаун, Д.Н. Олейника [3] у дозі 150 мг/кг. Холеритичну активність – порівняно з оксафенамідом.

Гостру токсичність синтезованих речовин вивчали при внутрішньошлунковому їх введенні білим мишам [3].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За класифікацією К.К. Сидорова, мідні комплекси 3,5-динітро-N-ФАК при внутрішньошлунковому введенні належать до малотоксичних сполук, їх $DL_{50} > 1500-2500$ мг/кг. Найбільшу токсичність мають сполуки (VI, VII, VIII), що містять в н-антраніловому фрагменті молекули метильну та нітрогрупи (табл. 3).

Вивчення протизапальної активності 6 металокомплексів у дозі 20 мг/кг (табл. 3) по-

казало, що антиексудативний ефект проявляють усі речовини, за винятком сполуки (V). Однак жодна субстанція не перевершує за своєю дією вольтарен та мефенамову кислоту. Найбільшу протизапальну дію проявляє мідний комплекс 3,5-динітро-N-(2-метил-4'-нітрофеніл)антранілової кислоти (VI) (табл. 3). Взагалі, мідні комплекси є менш активними речовинами, ніж 3,5-динітро-N-ФАК та їх калієві й глюкозиламонієві солі [1, 2, 4, 6, 7, 10].

Таблиця 3 – Біологічна активність мідних комплексів 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот

Сполука	Бактеріостатична активність, МПК (мкг/мл)				Фунгістатична активність, МПК (мкг/мл)		Проти-запальна, % у дозі 20 мг/кг	DL_{50} , мг/кг (внутрішньо-шлунково)
	Золотистий стафілокок	Сінна паличка	Кишкова паличка	Синьогнійна паличка	Candida albicans	Candida triadis		
I	250	250	250	250	125	250	18,3	–
II	250	250	250	250	125	250	21,4	>2500
III	125	62,5	125	250	–	–	–	>2500
IV	125	125	125	250	–	–	–	–
V	125	125	125	125	–	–	6,4	–
VI	125	125	62,5	125	62,5	125	28,2	>1500
VII	62,5	125	62,5	125	62,5	125	25,9	>1500
VIII	125	125	62,5	125	62,5	125	24,4	>1500
Етакридину лактат	31,2	15,6	31,2	62,5	–	–	–	21*
Фурацилін	–	–	–	–	64	–	–	84*
Гризеофульвін	–	–	–	–	–	25	–	–
Вольтарен (DE_{50})	–	–	–	–	–	–	37,5	360
Мефенамова кислота у дозі 100 мг/кг	–	–	–	–	–	–	30,0	628

Примітка. * DL_{50} при внутрішньочеревному введенні.

Мідні комплекси 3,5-динітро-N-ФАК (I, II) проявляють високу жовчогінну дію у дозі 150 мг/кг (табл. 4), але є в 1,6 раза більш токсичними, ніж оксафенамід ($DL_{50}=4000$ мг/кг).

Результати мікробіологічних досліджень (табл. 3) показали, що найбільш активними сполуками відносно штаму *Candida albicans* є мідні комплекси (VI-VIII), які в структурі містять

Таблиця 4 – Жовчогінна активність мідних комплексів 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот

Сполука	Кількість дослідів	Швидкість секреції жовчі				Загальна кількість жовчі за дослід, мг/100
		1 год	2 год	3 год	4 год	
Контроль	10	4,54±0,35	4,26±0,25	3,89±0,33	3,85±0,40	991
I у дозі 150 мг/кг	6	4,28±0,20	2,4±0,78 80 %	5,9±0,24 52 %	4,70±0,36 23 %	1360 37 %
II у дозі 150 мг/кг	6	4,7±0,65	6,57±0,36 56 %	5,62±0,34 46 %	4,79±0,30 25 %	1310 31 %
Оксафенамід у дозі 300 мг/кг	6	5,08±0,55	6,04±0,65 42 %	4,43±0,37 14 %	4,91±0,32 28 %	1228 24 %

три нітрогрупи (МПК=62,5 мкг/мл). Бактеріостатична дія мідних комплексів (I-VIII) відносно золотистого стафілокока, сінної, кишкової

та синьогнійної паличок перебуває в межах 62,5-250 мкг/мл і незначно відрізняється від активності вихідних кислот [7].

ВИСНОВКИ. 1. З метою пошуку біологічно активних речовин здійснено синтез мідних комплексів 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот і встановлено їх будову та індивідуальність.

2. Фармакологічними дослідженнями встановлено, що синтезовані речовини про-

являють протизапальну, жовчогінну, бактеріостатичну і фунгістатичну активність. Відзначено деякі закономірності зв'язку структура – активність серед похідних N-фенілантранілових кислот.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бризицький О.А. Синтез, фізико-хімічні властивості, реакційна здатність та біологічна активність нітробензойної та аміно- і нітро-N-фенілантранілової кислот: Автореф. дис. ... канд. фармац. наук. – Харків, 2005. – 20 с.

2. Брунь Л.В., Зупанець І.А., Ісаєв С.Г., Павлій О.О. Експериментальне дослідження взаємозв'язку протизапальних і репаративних властивостей N-фенілантранілових кислот та похідних глюкозаміну // Фізіологічно активні речовини. – 2002. – № 1 (33). – С. 65-69.

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

4. Інформ. лист № 193-2003. Оптимізація пошуку ефективних лікарських засобів на основі N-фенілантранілових кислот / С.Г. Ісаєв, О.О. Павлій, І.А. Зупанець та ін. – К., 2003. – Вип. № 13 "Фармація". – 3 с.

5. Ісаєв С.Г., Бризицький О.А., Свечнікова О.М. Синтез та фармакологічна активність металокмплесів N-фенілантранілових кислот // Мед. хімія. – 2003. – 5, № 4. – С. 104-107.

6. Ісаєв С.Г., Кобзар Н.П., Павлій О.І. та ін. Біологічна активність калієвих солей 3,5-динітро- та 5-бромсульфамойл-N-фенілантранілових кислот // Мед. хімія. – 4, № 3. – С. 63-65.

7. Ісаєв С.Г., Чикіна О.Л., Жегунова Г.П. Синтез і дослідження біологічної активності 3,5-динітро-N-фенілантранілових кислот // Мед. хімія. – 2004. – 6, № 4. – С. 13-17.

8. Ісаєв С.Г., Павлій А.И., Еремина З.Г. и др. Синтез и биологическая активность медных комплексов 3,5-динитро-N-фенилантраниловых кислот // Лекарства – человеку. – 2001. – 15, № 1/2. – С. 216-220.

9. Крис Е.Е., Волченкова И.Н., Григорьева А.С и др. Координационные соединения в медицине. – К.: Наук. думка, 1986. – 216 с.

10. Павлій О.О., Брунь Л.В., Ісаєв С.Г., Зупанець І.А. Д-(+)-глюкозиламонієві солі N-фенілантранілових кислот, їх синтез та біологічна активність // Мед. хімія. – 2002. – 4, № 3. – С. 81-83.

С.Г. Ісаєв, О.А. Павлій, О.В. Антоненко, Н.П. Кобзарь, Е.В. Колесник, Е.М. Сергиенко, І.А. Сокурєнко

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

МЕДНЫЕ КОМПЛЕКСЫ 3,5-ДИНИТРО-N-ФЕНИЛАНТРАНИЛОВЫХ КИСЛОТ, ИХ СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Резюме

Осуществлен синтез новых медных комплексов 3,5-динитро-N-фенилантраниловых кислот через стадию образования натриевых солей соответствующих кислот. Строение и чистоту 8 синтезированных соединений подтверждено данными элементного, ИК-спектрального и хроматографического анализа, качественными реакциями. По классификации К.К. Сидорова, медные комплексы 3,5-динитро-N-фенилантраниловых кислот при внутривенном введении относятся к классу малотоксичных веществ. Установлено, что синтезированные вещества проявляют противовоспалительную, желчегонную, бактериостатическую и противогрибковую активность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: синтез, N-фенилантраниловые кислоты, медные комплексы, фармакологический скрининг.

S.H. Isayev, O.O. Pavliy, O.V. Antonenko, N.P. Kobzar, O.V. Kolisnyk, O.M. Serhiyenko,
I.A. Sokurenko
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

COPPER COMPLEXES OF 3,5-DINITRO-N-PHENYLANTHRANILIC ACIDS, SYNTHESIS, STRUCTURE AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES

Summary

The synthesis of copper complexes of 3,5-dinitro-N-phenylanthranilic acids carried has been out through the stage of sodium salts formation of the appropriate acids. The structure and clearance of 8 synthesized compounds has been confirmed by the data of element, IR-spectral and chromatographic analysis, qualitative reactions. According to classification by K.K. Sydorova, synthesized copper complexes of 3,5-dinitro-N-phenylanthranilic acids by intrastomach entering belong to low toxic compounds. It has been established, that the synthesized substances have anti-inflammatory, choplogic, bacteriostatic and antifungal activity.

KEY WORDS: **synthesis, N-phenylanthranilic acids, copper complexes, pharmacological screening.**

Отримано 15.04.10

Адреса для листування: С.Г. Ісаєв, вул. Гарібальді 11^а, кв. 21, Харків, 31121, Україна.

ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОКІНЕТИКИ КВЕРЦЕТИНУ ТА ЙОГО КОМПОЗИЦІЇ З АМІНОЦУКРАМИ – ПОХІДНИМИ ГЛЮКОЗАМІНУ

Наведено результати порівняльного вивчення фармакокінетичних параметрів кверцетину та його композиції з аміноцукрами – похідними глюкозаміну після одноразового перорального застосування у кролів.

Установлено, що при потрапленні до організму кролів кверцетин інтенсивно піддається процесам біотрансформації з утворенням активних метаболітів, основним з яких є ізорамнетин. При застосуванні у кролів субстанція кверцетину в дозі 10 мг/кг повільно всмоктується та утворює у плазмі крові максимальну концентрацію – приблизно 440 нг/мл, при цьому період напіввиведення складає 4,8 год.

Сумісне пероральне застосування кверцетину з аміноцукрами глюкозаміну гідрохлоридом та N-ацетилглюкозаміном дозволяє змінити фармакокінетичні параметри даного флавоноїду, підвищити його максимальну концентрацію у 2,0 рази, відносно біодоступність у 2,5 раза та збільшити період напіввиведення до 6,4 год.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: глюкозаміну гідрохлорид, N-ацетилглюкозамін, кверцетин, фармакокінетика, біодоступність.

ВСТУП. Кверцетин – один з найпоширеніших рослинних біофлавоноїдів, що проявляє найрізноманітніші фармакологічні ефекти, які є цінними при лікуванні захворювань серцево-судинної, опорно-рухової, дихальної, травної та інших систем організму. Він є одним з найбільш потужних антиоксидантів не тільки серед флавоноїдів, але й серед сполук інших груп. Так, за своїми антиоксидантними властивостями кверцетин перевершує аскорбінову кислоту та α -токоферол [1, 11, 14, 17].

На сьогодні фармакокінетику кверцетину остаточно не вивчено, незважаючи на ряд досліджень з вивчення фармакокінетичних параметрів кверцетину як на лабораторних тваринах [6-8, 15, 18, 19], так і на людях [10, 12, 13, 16]. Дані дослідження показали, що біодоступність кверцетину в незмінній формі при пероральному прийманні невисока [6, 12, 16, 19].

Зважаючи на це, пошук перспективних поєднань кверцетину з іншими активними субстанціями, як правило, в більшості випадків спрямований на модифікацію його розчинності та, як наслідок, показники всмоктування біофлавоноїду.

Нами в серії раніше проведених досліджень експериментально обґрунтована доцільність поєднання кверцетину з аміноцукрами – похідними глюкозаміну (глюкозаміну гідрохло-

ридом та N-ацетилглюкозаміном). Показана синергічність даного поєднання на моделях ексудативного, альтеративного та проліферативного запалення [2, 3].

Метою представленої роботи стало порівняльне вивчення фармакокінетичних параметрів власне кверцетину та при його застосуванні у складі композиції на основі суміші аміноцукрів – глюкозаміну гідрохлориду, N-ацетилглюкозаміну та флавоноїду кверцетину.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження фармакокінетичних властивостей кверцетину та його композиції з аміноцукрами глюкозаміну проведено на 8 безпородних кролях обох статей масою 2500-3000 г. Експерименти виконано відповідно до правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [9].

Кролів було поділено на 2 дослідні групи по 4 тварини у кожній: 1-ша група – кролі, які отримували перорально субстанцію кверцетину в дозі 10 мг/кг; 2-га – кролі, які одержували перорально комбінацію кверцетину з аміноцукрами в дозі 10 мг/кг за кверцетином.

Субстанцію кверцетину та дослідну комбінацію вводили внутрішньошлунково за допомогою зонда одноразово у вигляді суспензій, які виготовляли з попереднім подрібненням речовин у ступці та використанням необхідної кількості фізіологічного розчину.

Забір крові проводили одночасно у всіх тварин через такі інтервали часу: 0,25, 0,5, 1, 2, 4 та 8 год після введення препаратів.

Як біоаналітичний метод визначення концентрації кверцетину та його метаболітів (метоксі-, сульфатно- та/або глюкуронові кон'югати) у біозразках застосовували ультра-ефективну рідинну хроматографію з мас-селективним детектором.

Загальну концентрацію кверцетину та його метаболітів у плазмі крові відображали у перерахунку на чистий кверцетин і визначали за допомогою рівняння:

$$C = C(Q) + 0,95567 \times C(Ir),$$

де $C(Q)$ – концентрація кверцетину в плазмі крові;

$C(Ir)$ – концентрація ізорамнетину в плазмі крові;

0,95567 – коефіцієнт перерахунку ізорамнетину на кверцетин.

На підставі залежності концентрації кверцетину в плазмі крові від часу, за допомогою загальноприйнятих розрахунків та комп'ютерних програм визначали максимальну концентрацію препарату (C_{max}), час досягнення максимальної концентрації (T_{max}), площу під кривою (AUC_{0-8}), період напіввиведення ($T_{1/2}$).

Як програмні інструментальні засоби застосовували ліцензійне програмне забезпечення: MassLynx® 4.0 – TargetLynx® (Waters®), Microsoft Office Excel® 2003, WinNon-lin Professional 5.2 (Pharsight Corporation). Оцінку фармакокінетичних параметрів проведено з

використанням моделей розрахунків “NCA Model 200” та “NCA Model 201” WinNonlin Professional 5.2.

Загальну статистичну обробку результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента та непараметричних методів статистичного аналізу [4, 5].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані результати свідчать про те, що в організмі кролів кверцетин піддавався активним метаболічним перетворенням з утворенням ряду метаболітів, основним з яких є ізорамнетин, що також має біологічну активність із спектром фармакодинаміки, притаманним кверцетину.

Результати дослідження загального вмісту кверцетину та його метаболітів (ізорамнетин) у перерахунку на кверцетин залежно від часу наведено в таблиці 1.

Аналіз одержаних даних свідчить про те, що в більшості тварин, які перорально отримували субстанцію кверцетину, діюча речовина з'являлась у крові на 2-4 год після введення та набувала максимальної концентрації на 8 год, тобто всмоктування відбувалось повільно. Але в деяких кролів даний процес перебігав значно швидше з утворенням високої концентрації вже протягом 1 год. В середньому концентрація кверцетину та його метаболітів у плазмі крові тварин протягом 1 год після введення препарату утримувалась у межах 340-440 нг/мл.

Таблиця 1 – Загальний вміст суми кверцетину (Qu) та ізорамнетину (Ir) у плазмі крові дослідних тварин, нг/мл (n=8)

Умови досліджу	Код тварини	Час забору крові, год						
		0	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0
1-ша група (субстанція кверцетину)	01/1	<25,0	<25,0	<25,0	<25,0	<25,0	<25,0	55,8
	01/2	<25,0	<25,0	<25,0	<25,0	45,6	76,3	76,7
	01/3	<25,0	1767,0	1512,0	1384,0	987,4	625,3	346,2
	01/4	<25,0	<25,0	<25,0	<25,0	<25,0	38,1	78,5
	Сер. значення	<25,0	441,7	378,1	345,9	258,3	184,9	139,3
2-га група (кверцетин з аміноцукрами)	04/1	56,1	1730,7	548,7	545,0	133,4	264,5	289,6
	04/2	310,0	152,7	207,1	145,2	159,3	360,6	372,0
	04/3	50,7	1690,1	1501,0	1694,7	1590,0	1169,3	1234,9
	04/4	62,4	109,0	79,5	81,7	140,7	253,5	447,5
	Сер. значення	119,8	920,6	584,1	616,6	505,9	512,0	586,0

Примітка. Сума концентрацій розрахована за формулою: $C = C(Qu) + 0,95567 \times C(Ir)$, де 0,95567 – коефіцієнт перерахунку ізорамнетину на кверцетин.

При застосуванні у тварин суміші кверцетину з аміноцукрами спостерігалась така картина. Інтенсивність всмоктування флавоноїду була значно більшою, ніж при використанні чистої субстанції. Так, у половини кролів максимальна концентрація утворювалась вже через перші 15 хв після введення препаратів та досягала досить високого рівня (1700 нг/мл), після чого починала плавно зменшуватись. В інших тварин показники вмісту кверцетину в плазмі крові були дещо нижчими та мали певні розбіжності у значеннях, що, найімовірніше, пов'язано з індивідуальними особливостями всмоктування діючої речовини в окремих

кролів. При аналізі середніх значень виявлено, що максимальна концентрація кверцетину спостерігалась через 15 хв після введення і досягала 920 нг/мл, що вдвічі вище, ніж при використанні чистої субстанції. Далі вміст біофлавоноїду повільно зменшувався, але протягом усього часу обстеження не опускався нижче 500 нг/мл.

Отримані експериментальні дані дозволили за середніми значеннями побудувати фармакокінетичні криві, що відображають залежність загального вмісту кверцетину та його метаболітів (ізорамнетин) у сироватці крові піддослідних тварин від часу (рис. 1).

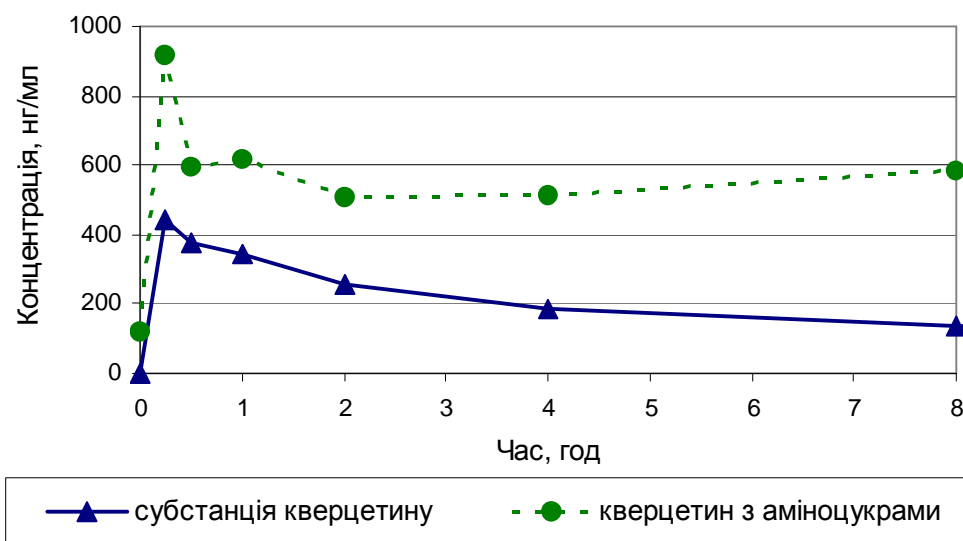


Рис. 1. Графіки залежності середніх значень суми концентрацій кверцетину та ізорамнетину в плазмі крові кролів від часу.

Під час порівняльного аналізу фармакокінетичних кривих кверцетину виявлено, що нижчі значення концентрації препарату в крові виникали при введенні саме чистої субстанції кверцетину, при цьому фармакокінетична крива мала пологий вигляд з максимумом на 15 хв без наявності виражених піків.

При застосуванні комбінації кверцетину з аміноцукрами фармакокінетична крива за характером свого профілю повторювала криву чистої субстанції кверцетину, але при вдвічі більшому рівні значень концентрації. В інтервалі часу 4-8 год спостерігалось формування вираженого "плато" на рівні концентрації 500 нг/мл.

Описані вище результати зумовлюють наявність у дослідних об'єктів певних фармакокінетичних параметрів, наведених у таблиці 2.

Результати, наведені в таблиці 2, свідчать про те, що значення C_{max} було вдвічі вищим при застосуванні кверцетину з аміноцукрами, ніж при використанні власне субстанції квер-

цетину. В обох дослідних групах показник T_{max} склав 15 хв.

На особливу увагу під час аналізу фармакокінетичних параметрів дослідних лікарських форм кверцетину заслуговує показник площі під кривою AUC_{0-8} , оскільки він відображає загальну дозу діючої речовини, що досягла системного кровообігу тварини. При поєднанні кверцетину з аміноцукрами даний показник підвищувався у 2,5 раза порівняно з чистою субстанцією.

При екстраполяції показника AUC_{0-8} до нескінченності ($AUC_{0-\infty}$) та розрахунку їх відсоткового співвідношення (AUC_{0+} , %) виявлено, що комбінування кверцетину з аміноцукрами призводило до збільшення часу затримки діючої речовини в організмі тварин в 1,4 раза порівняно з чистою субстанцією (45,4 проти 64,3 %).

Вищеописана картина підтверджується показниками коефіцієнтів елімінації, що свідчать про інтенсивність виведення кверцетину з організму

Таблиця 2 – Середні фармакокінетичні показники кверцетину та ізорамнетину в дослідних лікарських формах (n=8)

Дослідна група	C_{\max} , нг/мл	T_{\max} , год	AUC_{0-8} , год·нг/мл	$AUC_{0-\infty}$, год·нг/мл	AUC_{0-t} , %	K_{el} , год ⁻¹	$T_{1/2}$, год	F, %
1-ша група (субстанція кверцетину)	441,7	0,25	1731,8	2694,4	64,3	0,14	4,8	100,0
2-га група (кверцетин з аміноцукрами)	920,6	0,25	4394,0	9686,0	45,4	0,11	6,4	254,0

тварин. Так, при комбінуванні кверцетину з аміноцукрами відбувалось зниження його виведення з організму кролів, про що свідчило зменшення K_{el} в 1,4 раза (0,11 год⁻¹) порівняно з чистою субстанцією флавоноїду (0,14 год⁻¹).

У кореляції з показниками K_{el} перебували результати розрахунків періоду напіввиведення ($T_{1/2}$). При пероральному застосуванні флавоноїду у вигляді чистої субстанції показник $T_{1/2}$ дорівнював 4,8 год. Слід відмітити, що в разі використання комбінації флавоноїду з аміноцукрами відбувалось збільшення показника $T_{1/2}$ в 1,3 раза (6,4 год) порівняно із субстанцією. Дана тенденція є позитивною в плані застосування комбінованої форми кверцетину з аміноцукрами при тривалому лікуванні хронічних хворих (наприклад, на остеоартроз), оскільки дозволяє створити в організмі пацієнта стійку терапевтичну концентрацію флавоноїду.

Важливе значення під час аналізу фармакокінетичних параметрів дослідних лікарських форм має показник відносної біодоступності по субстанції кверцетину (F, %), оскільки він показує, наскільки збільшується біодоступність флавоноїду при його поєднанні з модифікаторами розчинності у складі фармацевтичних композицій для перорального введення. При застосуванні комбінації кверцетину з аміноцукрами показник F перевищував рівень субстанції у 2,5 раза.

Таким чином, отримані дані дозволяють зробити висновок, що застосування аміно-

цукрів – похідних глюкозаміну як модифікаторів розчинності кверцетину в комбінованих пероральних лікарських формах значно покращує фармакокінетичні параметри даного флавоноїду, збільшуючи його біодоступність та сприяючи пролонгації фармакокінетичного профілю, що дозволяє скоректувати його фармакокінетичні параметри відповідно до терапевтичної мети.

ВИСНОВКИ. 1. При потраплянні до організму кролів кверцетин інтенсивно піддається процесам біотрансформації з утворенням активних метаболітів, основним з яких є ізорамнетин. Концентрація кверцетину перевищує вміст ізорамнетину в середньому в 2,0-3,0 рази, з часом концентрації даних речовин змінюються прямо пропорційно.

2. При пероральному одноразовому застосуванні у кролів чиста субстанція кверцетину в дозі 10 мг/кг повільно всмоктується та утворює у плазмі крові максимальну концентрацію – приблизно 440 нг/мл, при цьому період напіввиведення складає 4,8 год.

3. Сумісне пероральне застосування кверцетину з аміноцукрами глюкозаміну гідрохлоридом та N-ацетилглюкозаміном дозволяє змінити фармакокінетичні параметри даного флавоноїду, підвищити його максимальну концентрацію у 2,0 рази, відносну біодоступність у 2,5 раза та збільшити період напіввиведення до 6,4 год.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
2. Зупанець К.О., Отрішко І.А. Вплив композиції на основі аміноцукрів – похідних глюкозаміну та флавоноїду кверцетину на альтернативне і проліферативне запалення // Вісник фармації. – 2010. – № 1 (61). – С. 69-71.
3. Зупанець К.О., попов С.Б., Усенко В.Ф., Отрішко І.А. Дослідження токсичних та протизапальних властивостей композиції на основі

аміноцукрів – похідних глюкозаміну та флавоноїду кверцетину // Клінічна фармація. – 2009. – 13, № 4. – С. 50-53.

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

5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – 3-е изд. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.

6. Ader P., Wessmann A., Wolfram S. et al. Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – **28**. – P. 1056-1067.
7. Chi-Yu Y., Su-Lan H., Kuo-Ching W. et al. Bioavailability and Metabolic Pharmacokinetics of Rutin and Quercetin in Rats // *Journal of Food and Drug Analysis.* – 2005. – **13**. – P. 244-250.
8. De Boer V.C.J., Dihal A.A., van der Woude H. et al. Tissue Distribution of Quercetin in Rats and Pigs // *Journal of Nutrition.* – 2005. – **135**. – P. 1718-1725.
9. 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.
10. Ferry D.R., Smith A., Malkhandi J. et al. Phase I Clinical Trial of the Flavonoid Quercetin: Pharmacokinetics and Evidence in vivo Tyrosine Kinase Inhibition // *Clinical Cancer Research.* – 1996. – **2**. – P. 659-668.
11. 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.
12. Graefe E.U., Derendorf H., Veit M. et al. Pharmacokinetics and bioavailability of the flavonol quercetin in humans // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* – 1999. – **37**. – P. 219-233.
13. Huang H., Fu J., Tian H. et al. Effects of quercetin and enalapril on amount of PDGF-B and VEGF-1 in kidney of diabetic rats // *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi (Journal Of Biomedical Engineering).* – 2005. – **22**, № 4. – P. 791-794.
14. Morales A.I., Vicente-Sanchez C., Jerkic M. et al. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats // *Toxicology And Applied Pharmacology.* – 2006. – **210**, № 1-2. – P. 128-135.
15. Mullen W., Graf B.A., Caldwell S.T. et al. Determination of flavonol metabolites in plasma and tissues of rats by HPLC-radiocounting and tandem mass spectrometry following oral ingestion of [2-(14C)] quercetin-4'-glucoside // *Journal Of Agricultural And Food Chemistry.* – 2002. – **50**, № 23. – P. 6902-6909.
16. Oliveira E.J., Watson D.G., Grant M.H. et al. Metabolism of quercetin and kaempferol by rat hepatocytes and the identification of flavonoid glycosides in human plasma // *Xenobiotica.* – 2002. – **32**. – P. 279-287.
17. Satyanarayana P.S., Singh D., Chopra K. et al. Quercetin, a bioflavonoid, protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cyclosporine in rats // *Methods And Findings In Experimental And Clinical Pharmacology.* – 2001. – **23**, № 4. – P. 175-181.
18. Ueno I., Nakano N., Hirono I. et al. Metabolic Fate of ¹⁴C-Quercetin in the ACI Rat // *Japan Journal of Experimental Medicine.* – 1983. – **53**. – P. 41-50.
19. Xiao Ch., Ophelia Q.P. Yin, Zh.Z., Moses S.S. Chow Pharmacokinetics and Modeling of Quercetin and Metabolites // *Pharmaceutical Research.* – 2005. – **22**, № 6. – P. 892-901.

Е.А. Зупанец, С.К. Шебеко, Ю.В. Подпружников, И.А. Отришко
 НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ КВЕРЦЕТИНА И ЕГО КОМПОЗИЦИИ С АМИНОСАХАРАМИ – ПРОИЗВОДНЫМИ ГЛЮКОЗАМИНА

Резюме

Представлено результаты сравнительного изучения фармакокинетических параметров кверцетина и его композиции с аminosахарами – производными глюкозамина после однократного перорального применения у кролей.

Установлено, что при попадании в организм кролей кверцетин интенсивно подвергается процессам биотрансформации с образованием активных метаболитов, основным из которых является изорамнетин. При применении у кролей субстанция кверцетина в дозе 10 мг/кг медленно всасывается и образует в плазме крови максимальную концентрацию – около 440 нг/мл, при этом период полувыведения составляет 4,8 часа.

Совместное пероральное применение кверцетина с аminosахарами глюкозамина гидрохлоридом и N-ацетилглюкозамином позволяет изменить фармакокинетические параметры данного флавоноида и повысить его максимальную концентрацию в 2,0 раза, относительную биодоступность в 2,5 раза и увеличить период полувыведения до 6,4 часа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глюкозамина гидрохлорид, N-ацетилглюкозамин, кверцетин, фармакокинетика, биодоступность.

COMPARATIVE PHARMACOKINETICS STUDY OF QUERCETINE AND ITS COMPOSITION WITH AMINOSUGARS – DERIVATIVES OF GLUCOSAMINE

Summary

There are presented the results of comparison study of pharmacokinetic parameters of quercetine and its composition with aminosugars – derivatives of glucosamine after singleaction peroral application in rabbits.

It have been established that after hit into rabbits organism quercetine intensively exposed to the processes of biotransformation with formation of active metabolites, the main of which is isoramnetin. At application in rabbits the quercetine substance in dose 10 mgs/kg is slowly absorbed and formed in blood plasma maximum concentration about 440 ng/ml, here the half-life is 4,8 hours.

Joint peroral application of quercetine with aminosugars glucosamine hydrochloride and N-acetylglucosamine allows to change the pharmacokinetic parameters of this flavonoid and promote its maximum concentration in 2,0 times, relative bioavailability in 2,5 times and increase half-life to 6,4 hours.

KEY WORDS: **glucosamine hydrochloride, N-acetylglucosamine, quercetine, pharmacokinetics, bioavailability.**

Отримано 01.09.10

Адреса для листування: К.О. Зупанець, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 27, Харків, 61057, Україна.

ВАЛІДАЦІЯ ХІМІЧНИХ МЕТОДІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ЕТАКРИДИНУ ЛАКТАТУ В ЛІКАРСЬКІЙ ФОРМІ АПТЕЧНОГО ВИГОТОВЛЕННЯ

Здійснено підбір хімічних методів якісного визначення етакридину лактату в лікарській формі аптечного виготовлення відповідно до вимог сучасної нормативної документації. Проведено вивчення метрологічних характеристик обраних методів ідентифікації, використовуючи принцип "виявлення з бінарним відгуком". Рекомендовано методики, що дають можливість достовірно підтвердити присутність аналізованої речовини у препараті.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ідентифікація, етакридину лактат, валідація.

ВСТУП. Етакридину лактат широко застосовують у лікарській практиці. Водні розчини аптечного виробництва використовують як антисептичний засіб у різних галузях медицини (хірургії, гінекології, урології, оториноларингології, дерматології та ін.). Але як етакридину лактат сприяє якісному поліпшенню здоров'я людини, так і важливою є саме його якість. За це відповідають методики контролю якості. Сучасний стан нормативної документації вимагає проведення валідації аналітичних методик ідентифікації та кількісного визначення [2, 4].

Тому метою нашого дослідження є підбір та валідація методик ідентифікації водного розчину етакридину лактату 0,02 %, що користується попитом в аптечній рецептурі [1].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. При проведенні дослідження використовували субстанцію етакридину лактату ("Shangai Sunve Pharmaceutical Co., Ltd", Китай, номер серії 200610018 від 14.05.2007 р., сертифікат аналізу № 14 від 31.05.2007 р.), що відповідає вимогам Європейської Фармакопеї [7], ваги АВ 204 S/A METTLER TOLEDO, реактиви, що відповідають вимогам ДФУ [2].

Методика проведення реакції флуоресценції. 2 мл препарату поміщають у мірну колбу ємністю 100 мл і доводять водою Р до мітки. Розчин набуває жовто-зеленого забарвлення та за довжини хвилі 365 нм спостерігається флуоресценція. Після додавання 5 мл розчину 1 М хлористоводневої кислоти або 5 мл

1 М розчину натрію гідроксиду флуоресценція зникає.

Методика проведення реакції на лактат-іон. До 10 мл препарату додають 8-10 крапель розчину натрію гідроксиду, розведеного до утворення осаду жовтого кольору. Осад фільтрують і додають 5-7 крапель розведеної сірчаної кислоти Р. При додаванні до підкисленого фільтрату 1 краплі розчину калію перманганату розчин знебарвлюється під час нагрівання.

Випробуваний та модельні розчини. Модельні розчини лікарської форми готували за правилами аптечної технології, використовуючи рівномірний розкид концентрації етакридину лактату від номінальної на всьому діапазоні застосування методики від 70 до 130 % (допуск вмісту становить $\pm 15\%$) [4].

Щоб уникнути впливу фактора суб'єктивності на якість результатів, дослідження виконували в трьох різних лабораторіях, використовуючи нові лікарські форми, різні реактиви, аналіз проводили різні аналітики.

У кожній серії модельних розчинів для кожної окремої концентрації (70, 85, 100, 115, 130 %) проводили 20 дослідів ($N_k=20$). Таким чином, для кожного значення концентрації отримували 60 результатів трьох серій спостережень ($\overline{N_k} = 60$). Щоб уникнути можливості хибної позитивної реакції відсутньої речовини, паралельно проводили дослідження з використанням "холостого" дослідження, який містить усі реактиви, крім аналіту. Ефект кожної реакції порівнювали з ефектом, який дає дана речовина за стандартною методикою.

Далі розраховували частоти виявлення речовини в кожній серії за формулою: $\alpha_k = n_k / N_k$, де n_k – число негативних результатів при свідомій присутності аналіту в аліквоті, N_k – загальна кількість розчинів з аналітом в аліквоті для концентрації C_k . Оскільки нас більше цікавить вірогідність виявлення етакридину лактату за умов даної методики, то її значення розраховували для кожної із серій за формулою: $P(C_k) = 1 - (\alpha_k / N_k)$. Далі розраховували ймовірність виявлення аналіту $P_{(C_k)} = 1 - \alpha_k$ та

$$\overline{P_{C_k}} = \frac{1}{m} \times \sum_{i=1}^m P_{C_k}^i$$

середні значення $\overline{P_{C_k}}$ між лабораторіями в межах однієї концентрації (де m – кількість лабораторій). Побудову “кривих ефективності” проводили, використовуючи значення концентрації аналіту по осі абсцис, а отримані середні значення $\overline{P_{C_k}}$ і $\overline{P_{(C_k)}}$ – по осі ординат.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Державна Фармакопея України (ДФУ) пропонує проведення валідації методики ідентифікації за одним єдиним параметром – специфічність. Підбір специфічних методів ідентифікації здійснювали відповідно до загальних принципів, що сформульовані у ДФУ [2].

За хімічною будовою етакридину лактат являє собою сіль молочної кислоти і 2-етоксидіаміноакридину [6].

З метою ідентифікації етакридину лактату використовують здатність водних розчинів флуоресцювати, утворювати кольоровий осад з розчином йоду або йодидом, реакцію на присутність аніона молочної кислоти – лактат-іона. Наявність ароматичної аміногрупи у положенні 6 акридинового циклу підтверджують створенням діазосполучення вишнево-червоного кольору за умови додавання натрію нітриту в кислому середовищі [5].

На наш погляд, для підтвердження специфічності етакридину лактату в його 0,02 % розчині (аптечний пропис) достатньо провести дві реакції. Перша реакція – це перевірка наявності флуоресценції, яка дозволить відрізнити етакридину лактат від інших лікарських речовин, що не характеризуються флуоресценцією. Також за допомогою випробування на флуоресценцію підкисленого розчину етакридину лактату його можна відрізнити від інших сполук, схожих за забарвленням. Так, схожими сполуками є фурацилін, розчини якого не мають флуоресценції, та рибофлавін,

флуоресценція розчинів якого зникає при додаванні розчину лугу. Навпаки, при додаванні до розчину етакридину лактату розчину лугу випадає жовтий осад основи етакридину. Отже, дане випробування досить специфічне, нескладне за виконанням і може бути використане для ідентифікації етакридину лактату в умовах аптеки.

Друга реакція – це підтвердження наявності лактат-іона, що дозволить відрізнити етакридину лактат від акрихіну, водні розчини якого теж мають флуоресценцію. До того ж, акрихіні є сіллю хлористоводневої кислоти.

Умови проведення обох реакцій наведено в монографії на субстанцію етакридину лактат у розділі “друга ідентифікація” ЄФ [7].

Фармакопейна методика: 0,1 мл 2,0 % розчину поміщають у мірну колбу ємністю 100 мл та доводять водою Р до мітки. Розчин має жовто-зелений колір та при 365 нм спостерігається флуоресценція. Після додавання 5 мл 1 М розчину хлористоводневої кислоти флуоресценція зникає. Концентрація етакридину лактату в даному розчині дорівнює 0,002 %, або 20 мг/л (10 ppm) [7].

Концентрація випробуваного розчину складає 0,02 %. При розведенні 1 мл цього розчину в мірній колбі ємністю 100 мл вона буде дорівнювати 0,0002 %, або 2 мг/л (1 ppm). Тобто концентрація випробуваного розчину в 10 разів менша. Використовувати для проведення реакції ідентифікації 10 мл випробуваного розчину не практично при аналізі лікарської форми. Тому метою даного дослідження було вивчити, якої аліквоти лікарської форми достатньо для коректного проведення реакції ідентифікації.

Реакція на лактат-іон Д за монографією ЄФ [7] на етакридину лактат: до 50 мл 2 % розчину додають 10 мл розчину натрію гідроксиду розведеного. Осад, що утворюється, фільтрують. До 5 мл фільтрату додають 1 мл розведеної сірчаної кислоти. 5 мл розчину дають реакцію на лактат-іон 2.3.1 [2, 7]. Аліквота 5 мл містить 0,025 г лактат-іона.

Реакція на лактат-іон у загальній статті 2.3.1. наводиться із вмістом лактат-іона 5 мг на 5 мл або 0,005 г на 5 мл, що в 5 разів менше [2, 7].

В умовах аптеки ця реакція дуже трудомістка та потребує багато часу. В довідковій методичній літературі з аналізу аптечних лікарських форм наведено модифіковану реакцію на лактат-іон, що базується на знебарвленні розчину калію перманганату в середовищі розведеної сірчаної кислоти після додавання його до отриманого фільтрату.

Концентрація лактат-іона в 5 мл нашої лікарської форми складає 0,25 мг, тобто в 100 разів менша, ніж за методикою ЄФ, та в 20 разів нижча щодо вимог статті 2.3.1.

Отже, щоб виконати фармакопейні методи, розчин потрібно концентрувати, аліквота для аналізу може варіювати від 100 до 500 мл.

Тому було вирішено перевірити модифіковану реакцію на лактат-іон.

Вивчення достовірності обраних методів якісного аналізу проводили за стандартизованим підходом, що описаний у роботі [3].

Результати дослідження ефекту першої реакції в умовах різних лабораторій наведено в таблиці 1. За статистично обробленими даними побудовано графік впливу концентрації етакридину лактату на достовірність ефекту реакції (рис. 1).

Таблиця 1 – Результати дослідження ефекту реакції флуоресценції

С етакридину, мг/л	Число негативних результатів			Частота невиявлення α			Частота невиявлення $\bar{\alpha}$	Ймовірність виявлення, \bar{P}	Достовірність R, %
	лаб.1 (n)	лаб.2 (n)	лаб.3 (n)	лаб.1	лаб.2	лаб.3			
				α_1	α_2	α_3			
14	8	4	7	0,40	0,20	0,35	0,32	0,68	68
17	4	3	2	0,20	0,15	0,10	0,15	0,85	85
20	1	0	0	0,05	0,00	0,00	0,02	0,98	98
23	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
26	0	1	0	0,00	0,05	0,00	0,02	0,98	98
28	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
34	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
40	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
46	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
52	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
0	20	20	20	1	1	1	1,00	0,00	0

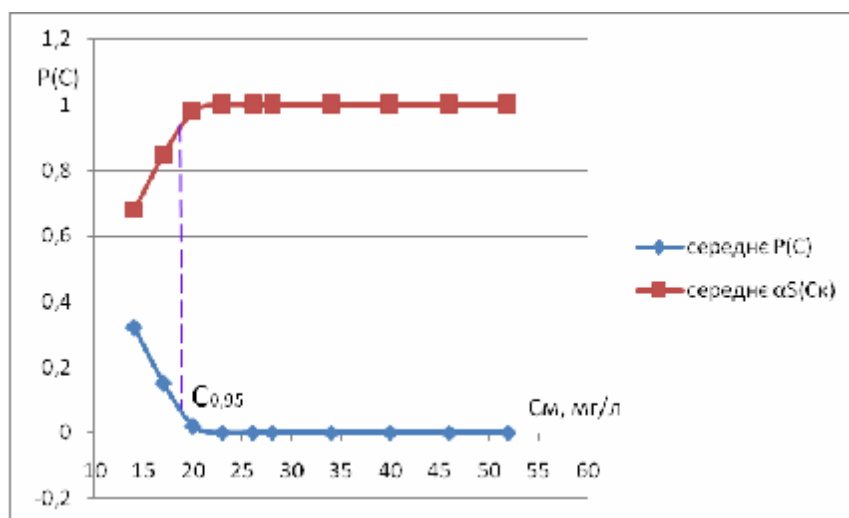


Рис. 1. Крива ефективності реакції флуоресценції.

Отримані експериментальні дані свідчать про те, що реакція є високочутливою. При даному розведенні визначити ширину інтервалу ненадійності неможливо. З метою визначення ширини інтервалу ненадійності та його відносної величини необхідно розширювати об'єм дослідження. Однак для проведення надійної ідентифікації за цією методикою в даній лікарській формі достатньо концентрації $C_{0,95}$, яка дорівнює 20 мг/л, за умови присутності аналізованої речовини дана реакція дає

чіткий ефект і дозволяє з довірчою 95 % ймовірністю виявити етакридин. При використанні 1 мл лікарської форми та розведенні за умовами реакції до 100 мл ця реакція в межах діапазону застосування від 70 до 130 % дасть достовірний результат для розчинів від 100 %, а нижче – результат буде сумнівним. Тому для проведення ідентифікації етакридину лактату в даній лікарській формі рекомендовано використовувати аліквоту 2 мл з подальшим розведенням у мірній колбі ємністю 100 мл.

Результати дослідження модифікованої реакції на лактат-іон та їх статистичної обробки наведено в таблиці 2. На рисунку 2 зображено криву ефективності, що дає можливість наочно представити інтервал ненадійності методики, який характеризує ті концентрації етакридину лактату, що дають сумнівний результат при проведенні реакції.

Наведені в таблиці 2 результати точно вказують на те, що запропонована реакція іден-

тифікації є чутливою та дає достовірні результати при аліквоті лікарської форми 10 мл у межах всього діапазону застосування методики. При значенні концентрації етакридину лактату 0,35 мг/мл та вище методика характеризується довірою 97 % ймовірністю. Тож, реакцію ідентифікації з розчином калію перманганату рекомендуємо проводити, використовуючи 10 мл лікарської форми, щоб остаточно впевнитись у результатах.

Таблиця 2 – Результати дослідження ефекту реакції на лактат-іон

С лактат-іона, мг/л	Число негативних результатів			Частота невиявлення α			Частота невияв- лення $\bar{\alpha}$	Ймовірність виявлення, \bar{P}	Досто- вірність R, %
	лаб.1 (n)	лаб.2 (n)	лаб.3 (n)	лаб.1	лаб.2	лаб.3			
				α_1	α_2	α_3			
0,17	20	20	20	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0
0,21	20	20	19	1,00	1,00	0,95	0,98	0,02	2
0,25	16	14	18	0,80	0,70	0,90	0,80	0,20	20
0,29	6	4	7	0,30	0,20	0,35	0,28	0,72	72
0,33	2	1	3	0,10	0,05	0,15	0,10	0,90	90
0,35	0	1	1	0,00	0,05	0,05	0,03	0,97	97
0,43	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
0,50	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
0,58	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
0,65	0	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	1,00	100
0	20	20	20	1	1	1	1,00	0,00	0

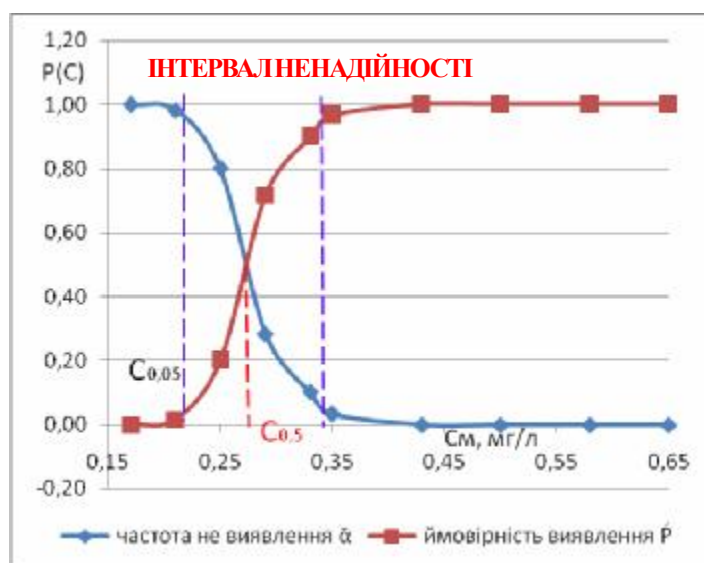


Рис. 2. Крива ефективності реакції на лактат-іон.

ВИСНОВКИ. 1. Проведено аналіз та здійснено вибір оптимальних методик ідентифікації етакридину лактату в його аптечній лікарській формі. Встановлено, що для підтвердження присутності етакридину лактату достатньо прийнятні результати дають реакції, що основані на здатності водних розчинів етакридину лактату до флуоресценції, та на наявності лактат-іона.

2. Вивчено специфічність і чутливість обраних методик та підбрано коректні аліквоти для аналізу. Проведена валідація обраних методик ідентифікації експериментально доводить їх прийнятність для виконання в умовах аптек та лабораторій з аналізу якості лікарських засобів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Вимоги до виготовлення нестерильних лікарських засобів в умовах аптек: Методичні рекомендації (затверджено наказом МОЗ України № 391 від 3.08.2005 р.). – 2-ге вид. – К.: МОЗ України, 2005. – 98 с.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.; Доповнення 1. – Харків: РІРЕГ, 2004. – 494 с.; Доповнення 2. – Харків: РІРЕГ, 2008. – 608 с.
3. Євтіфеева О.А. Стандартизація підходів до оцінки хімічних методів ідентифікації речовин, які входять до складу екстемпоральних лікарських препаратів // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2010. – № 1 (7). – С. 19-24.
4. Про затвердження правил виробництва (виготовлення) лікарських засобів в умовах аптеки: Наказ МОЗ України № 626 від 15.12.2004 р. (зі змінами та доповненнями) // Юридичні аспекти фармації. – Х., 2006. – Т. 3. – С. 49-59.
5. Фармацевтическая химия: Учеб. пособие / Под ред. А.П. Арзамасцева. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 604 с.
6. Шабаров Ю.С. Органическая химия: В 2-х кн.: Часть 2. Циклические соединения: Учебник для вузов. – М.: Химия, 1994. – 848 с.
7. European Pharmacopoeia. – 5th ed. – Electronic version. – 2779 p.

А.Ю. Бочкарёва, О.А. Евтифеева, О.А. Здорик, В.А. Георгианц
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ВАЛИДАЦИЯ ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЭТАКРИДИНА ЛАКТАТА В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ АПТЕЧНОГО ИЗГОТОВЛЕНИЯ

Резюме

Осуществлен подбор химических методов качественного определения этакридина лактата в лекарственной форме аптечного изготовления в соответствии с требованиями современной нормативной документации. Проведено изучение метрологических характеристик выбранных методов идентификации, используя принцип “обнаружение с бинарным отзывом”. Рекомендовано методики, которые дают возможность достоверно подтвердить присутствие анализированного вещества в препарате.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **идентификация, этакридина лактат, валидация.**

A.Yu. Bochkarova, O.A. Yevtifeyeva, O.A. Zdoryk, V.A. Heorhiyants
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

VALIDATION OF THE CHEMICAL METHODS OF IDENTIFICATION OF ETHACRIDINI LACTATE IN THE EXTEMPORAL DOSAGE FORMS

Summary

The selection of chemical methods of quality determination of ethacridini lactate in the medical forms of the pharmacy making is carried out in accordance with the requirements of modern normative documents. The study of metrological characteristics of selected methods identification is implemented, using principle of “exposure with a binary review”. The methods that enable certainly to confirm presence of analyzed substance in preparation are recommended.

KEY WORDS: **identification, ethacridini lactate, validation.**

Отримано 01.07.10

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

Медична хімія – т. 12, № 3, 2010

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ДОСЛІДЖЕННЯ ВАЛІДАЦІЙНИХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ
КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КУМАРИНІВ У НАСТОЙЦІ СКЛАДНИЙ
“ПРОСТАТОФІТ”

Визначено основні валідаційні характеристики аналітичної методики кількісного дослідження кумаринів методом УФ-спектрофотометрії у настійці складній “Простатофіт”: лінійність, правильність та збіжність, стабільність, внутрішньолабораторну точність. Запропонована методика характеризується достатньою чутливістю, простотою виконання і може бути використана при контролі якості розробленого лікарського засобу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: настійка складна, валідаційні характеристики, спектрофотометрія, кумарини, біхромат калію.

ВСТУП. Створення національних стандартів якості лікарських засобів на основі об'єктивних методів аналізу є гарантією їх ефективності та безпечності. Установлення відповідності якості лікарських засобів рекомендованим нормам передбачає застосування різних аналітичних методів, при цьому остаточний висновок про їх якість значною мірою залежить від самого методу, який повинен відповідати певним вимогам. Загальні прийняті у світі рекомендації з виробництва ліків у вигляді правил GMP містять вимоги до методів випробувань, які використовують для оцінки відповідності фармацевтичної продукції установленим специфікаціям відносно точності та достовірності [1, 10, 16].

Мета нашої роботи полягала у розробці уніфікованої методики одночасного аналізу лікарських рослин розробленої нами настійки складної “Простатофіт” [2] і отримання доказів її валідності на основі вивчення валідаційних характеристик [2, 5, 7].

У практиці стандартизації лікарської рослинної сировини і препаратів рослинного походження широко використовують спектрофотометричний метод оцінки сумарного вмісту біологічно активних речовин (БАР), який є достатньо точним, не вимагає багато часу, дає можливість економно витратити реактиви і досліджувані речовини, про що свідчить той факт, що цей метод аналізу включено до Міжнародної, Британської, Європейської,

Німецької фармакопей. Як розчини порівняння використовують, як правило, розчини стандартних зразків [11-13, 15, 16].

Багатокомпонентність складу настійки “Простатофіт” зумовлює пошук оптимального способу аналізу і стандартизації його діючих речовин. У результаті попередньої роботи ми визначилися здійснювати кількісний аналіз розробленого препарату за сумою кумаринів [2].

Спектрофотометричний метод в УФ-ділянці спектра застосовують для кількісного визначення похідних кумарину, де беруть до уваги зміну оптичної густини розчинів кумарину за довжини хвилі максимуму поглинання в УФ-ділянці спектра того чи іншого кумарину залежно від його концентрації на основі питомих показників поглинання [9, 12, 14].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Відповідно до вмісту кумаринів (не менше 0,035 %) у лікарській формі та з урахуванням вимог нормативної документації (в нашому випадку ± 10 %) ми обрали діапазон застосування методики від 80 до 120 %. Симетричні допуски вмісту згідно з ДФУ становлять ± 10 % [7, 8].

Кількісне визначення кумаринів у препараті проводили за власним поглинанням. Практично всі похідні кумаринів розчинні в органічних розчинниках: хлороформі, етиловому спирті, етиловому ефірі. Тому на етапі пробопідготовки ми проводили екстракцію хлороформом, при цьому витягали супутні групи речовин, які не заважали подальшому визначенню. Для одержання стабільних резуль-

татів випробовуваний розчин готували у 96 % спирті етиловому. Хлороформні витяги об'єднували, випарювали і залишок розчиняли у 96 % спирті. Як розчин порівняння використовували 96 % спирт етиловий.

Для кількісного визначення вмісту суми похідних кумарину в настійці "Простатофіт" (у відсотках) в перерахунку на кумарин використовували метод спектрофотометрії в УФ-ділянці спектра за довжини хвилі 272 нм. Для розрахунку суми похідних кумарину застосовували питомий показник поглинання кумарину за довжини хвилі 272 нм ($E_{\text{лит.}}=734$).

Спочатку проводили теоретичний розрахунок критеріїв прийнятності методики аналізу: максимально допустимої повної невизначеності методики – $\Delta A_s=3,2$, максимальної систематичної похибки – $\text{max}\delta=1,024$. Внесок плацебо в сумарну величину фонового поглинання є незначущим і ним можна знехтувати, коли виконується відношення $\delta_{\text{exc}} \leq 0,5 \%$, критичне

$$\text{значення } RSD_0 \% = \frac{\max \Delta A_s}{t(95 \%, n-2)} = 1,81 \%$$

критичне значення індексу кореляції – $R_c=0,9593$, критичне значення практичної невизначеності вільного члена лінійної залежності – $a=5,12$ [5].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Перед початком експерименту з валідації аналітичної методики запропонований метод було випробовано на стандартній речовині кумарин. Перевірили лінійність стандартного розчину в діапазоні застосування методики від 80 до 120 % з рівномірним розкидом концентрацій (рис. 1).

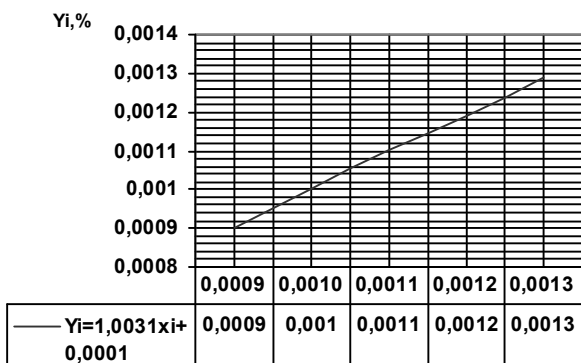


Рис. 1. Графік залежності оптичної густини від концентрації кумарину в нормалізованих координатах.

Отримані результати обробляли статистично методом найменших квадратів для прямої $Y=b \cdot x+a$. Розраховували статистичні величини: $b=0,9867$; $S_b=0,0324$; $a=0,00001$; $S_a=0,00004$; $S_r=0,00018$ та $r=0,9930$. Як видно з рисунка

1, вимоги лінійності виконувались на всьому діапазоні застосування методики.

На основі отриманих результатів ми дійшли висновку, що за допомогою даної методики можна визначати вміст кумаринів у настійці складній "Простатофіт".

Далі за цією методикою ми визначали вміст кумаринів методом спектрофотометрії. Оцінку лінійної залежності проводили на всьому діапазоні застосування методики методом питомого показника поглинання. Характер залежності оптичної густини від концентрації вивчали, використовуючи 5 модельних розчинів для аналізу з рівномірним розкидом концентрацій на всьому діапазоні застосування методики (80, 90, 100, 110, 120 %). Значення оптичної густини вимірювали для кожної концентрації тричі.

Отримані результати було статистично оброблено методом найменших квадратів згідно з вимогами ДФУ [7]. Калібрувальний графік будували в нормалізованих координатах (рис. 2).

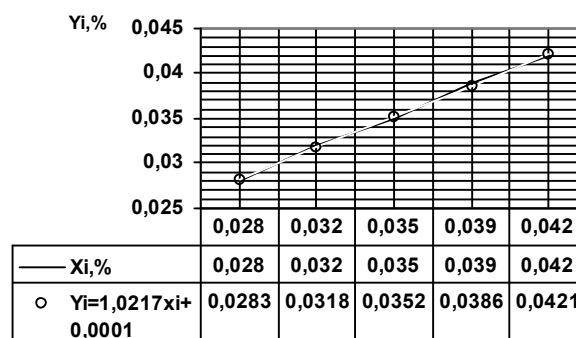


Рис. 2. Графік залежності оптичної густини від концентрації кумаринів у нормалізованих координатах.

Для кожного з 5-ти розчинів зразка розраховували середні значення оптичної густини (A_i). Одержані результати обробляли методом найменших квадратів для прямої $Y=b \cdot x+a$. Розраховані статистичні величини b , S_b , a , S_a , S_r (остаточне стандартне відхилення) та r (коефіцієнт кореляції) наведено в таблиці 1.

Вимоги до параметрів лінійної залежності в нашому випадку виконувались на всьому діапазоні застосування методики (80-120 %).

Перевірку стабільності аналітичного розчину проводили протягом 45 хв. У результаті проведених досліджень ми виявили, що розчин зберігає свою стабільність протягом 30 хв, саме цей час і рекомендуємо для вимірювання оптичної густини.

Статистична оцінка впливу часу на аналізований розчин відповідає критеріям прийнятності.

Результати досліджень наведено в таблиці 2.

Таблиця 1 – Результати вивчення лінійності модельних розчинів та отримані параметри лінійної залежності

№ модельного розчину	Об'єм аликвоти, мл	Введено	Оптичні густини A_i	Знайдено	Значення	$Y_i=bx_i+a$
1	8	0,028	0,156	0,0280		0,0283
2			0,156	0,0286		0,0283
3			0,156	0,0284		0,0283
4	9	0,032	0,178	0,0315		0,0318
5			0,177	0,0320		0,0318
6			0,176	0,0320		0,0318
7	10	0,035	0,193	0,0351		0,0352
8			0,195	0,0352		0,0352
9			0,193	0,0351		0,0352
10	11	0,039	0,212	0,0386		0,0386
11			0,214	0,0385		0,0386
12			0,216	0,0384		0,0386
13	12	0,042	0,234	0,0420		0,0421
14			0,232	0,0423		0,0421
15			0,239	0,0423		0,0421
Кутовий коефіцієнт лінійної залежності b					0,9827	
S_b					0,0109	
Вільний член лінійної залежності a					0,0008	
S_a					0,0004	
Критичне значення для вільного члена лінійної залежності					5,12	
Залишкове стандартне відхилення S_{rest}					0,0002	
Критичне значення залишкового стандартного відхилення RSD ₀					0,0051	
Коефіцієнт кореляції методики r					0,9992	
Критерій лінійного коефіцієнта кореляції R _c					0,9593	

Таблиця 2 – Дослідження стабільності приготованого розчину

Розчин*	Термін дослідження стабільності nt, хв				Середнє	RSD, %	Δ , %	max δ , %
	відразу	15	30	45				
A _i	0,1933	0,1932	0,1941	0,2009	0,1954	1,899	4,0502	1,024
A _i	0,1933	0,1932	0,1941		0,1935	0,341	0,995	1,024

Примітка. * – значення оптичної густини розчину є середнім трьох вимірювань.

Для проведення вимірів та розрахунку метрологічної оцінки збіжності й правильності методики нами було одержано 15 значень оптичних густин модельних розчинів за схемою, наведеною в роботі. Розраховували фактичні величини (X_i факт), відношення середніх значень оптичних густин для кожного з 15-ти розчинів до показника поглинання $A_{1cm}^{1\%}$. Результати розрахунків наведено в таблиці. 3.

Експериментальні результати збіжності характеризуються припустимим розкиданням відносно середнього та, відповідно, низьким стандартним відхиленням $S_z\%$ ($S_z\%=1,056 \leq 3,2$) на всьому діапазоні концентрацій (80-120 %), що свідчить про якість роботи аналітика та методики, яку застосовували. Систематична

похибка методики МПП становить $\delta\%=0,05$, що характеризує достатню близькість середнього результату отриманої оптичної густини до його номінального значення ($0,05 \leq \max \delta = 1,024$).

Щоб дослідити відтворюваність методики МПП в умовах іншої лабораторії, було проведено вимірювання оптичної густини розчинів однієї аналітичної серії на іншому обладнанні, в різні дні, у двох різних лабораторіях, різними аналітиками. Отримані результати є результатами порівняння статистичних відхилень двох різних вимірювань і свідчать про те, що дана методика може бути коректно відтворена в іншій лабораторії та характеризується відносним довірчим інтервалом ($100 \pm 0,448$) % з вірогідністю 95 % [3] (табл. 4).

Таблиця 3 – Результати аналізу модельних розчинів та їх статистична обробка

№ модельного розчину	Введено (x_i , %) (X_i факт%)	Оптичні густини A_i	y_i % (Y_i %)	Знайдено у % до введеного $Z_i=100(Y_i/X_i)$
1	0,028	0,156	0,0280	100,00
2	0,028	0,156	0,0286	102,14
3	0,028	0,156	0,0284	101,43
4	0,032	0,178	0,0315	98,44
5	0,032	0,177	0,0320	100,00
6	0,032	0,176	0,0320	100,00
7	0,035	0,193	0,0351	100,29
8	0,035	0,195	0,0352	100,57
9	0,035	0,193	0,0351	100,29
10	0,039	0,212	0,0386	98,97
11	0,039	0,214	0,0385	98,72
12	0,039	0,216	0,0384	98,46
13	0,042	0,234	0,0420	100,00
14	0,042	0,232	0,0423	100,71
15	0,042	0,239	0,0423	100,71
Середнє Z%			100,05	
Відносне стандартне відхилення, Sz%			1,056	
Відносний довірчий інтервал, Δs %			2,26	
Критичне значення для збіжності результатів, Δs %			3,2	
Систематична похибка, δ			0,05	
Критерій невизначеності систематичної похибки			0,264	
Загальний висновок про методику			Коректна	

Таблиця 4 – Результати дослідження відтворюваності методики

№ випробовуваного розчину	Величини Z_i	
1	100,00	101,23
2	102,14	101,65
3	101,43	102,01
4	98,44	99,65
5	100,00	99,68
6	100,00	99,68
7	100,29	100,3
8	100,57	101,22
9	100,29	100,25
10	98,97	99,56
11	98,72	99,34
12	98,46	101,02
13	100,00	100,31
14	100,71	100,44
15	100,71	100,5
Середнє		100,456
Об'єднане середнє $Z_{int\ ra}$ %		100,25
$S_{int\ ra}$ %		1,055
$SD_{int\ ra}$ %		0,936
Міжлабораторна систематична похибка δ		0,252
Відносний довірчий інтервал $\Delta_{int\ ra}$ %		0,448

Для роботи використовували аналітичне обладнання: спектрофотометр Specord-200, ваги – METTLER TOLEDO, рН-метр –

Іономер І-130, реактиви та мірний посуд класу А (першого класу), що відповідають вимогам ДФУ.

Вимірювання здійснювали з використанням кювети завтовшки 1 см при температурі $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$ за однакових умов з мінімальним інтервалом у часі.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили відповідно до статті ДФУ “Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту” [6, 7].

У процесі валідації було розглянуто такі характеристики, як діапазон застосування, специфічність, лінійність, збіжність, правильність, відтворюваність [6].

Примітка. При використанні цієї методики, для отримання коректних результатів, проводять контроль оптичної густини спектрофотометрів за біхроматом калію для виключення впливу приладового фактора в разі застосування МПП [4].

ВИСНОВКИ. 1. Проведено валідацію методики кількісного визначення кумаринів у настійці складній “Простатофіт” методом спектрофотометрії (метод показника поглинання) за довжини хвилі 272 нм.

2. Вивчено валідаційні характеристики спектрофотометричної методики методом показника поглинання настійки “Простатофіт”: лінійність, правильність та збіжність, стабільність, внутрішньолабораторну точність.

3. У результаті роботи доведено, що вимірювання оптичної густини препарату доцільно проводити протягом 30 хв з моменту приготування розчину (час, протягом якого розчин зберігає стабільність) за власним поглинанням кумарину.

4. Запропонована методика характеризується достатньою чутливістю, простотою виконання і може бути використана при контролі якості розробленого лікарського засобу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Арзамасцев А.П., Садчикова Н.П., Харитонов Ю.Я. Валідація аналітичних методів // Фармація. – 2006. – № 4. – С. 8-13.
2. Вишневська Л.І. Розробка методик визначення якості настійки складної “Простатофіт” // Журнал органічної і фармацевтичної хімії. – 2008. – 6, вип. 1 (21). – С. 76-80.
3. Гризодуб А.И. Валідація спектрофотометричних методик кількісного аналізу лікарських засобів в соответствии с требованиями ГФУ // Фармаком. – 2002. – № 3. – С. 42-50.
4. Гризодуб А.И., Зволинская Н.Н., Архипова Н.Н. Воспроизводимость фармакопейных спектрофотометрических методик количественного определения лекарственных средств в разных лабораториях // Фармаком. – 2004. – № 2. – С. 20-34.
5. Гризодуб А.И. Стандартные процедуры валідації методик контролю якості лікарських засобів // Фармаком. – 2006. – № 1/2. – С. 35-44.
6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків, РІПЕГ, 2001. – 556 с.
7. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – Доповнення 1. – Харків: РІПЕГ, 2004. – 520 с.
8. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Доповнення 2. – Харків, 2008. – 620 с.
9. Муллажонов М.Т., Бекчанов Х.Н., Назаров Э.А., Комилов Х.М. Количественное определение кумарина в доннике лекарственном методом ВЭЖХ // Farmatsevtika journali. – 2006. – № 1-2. – С. 51-52.
10. Руководство по валідації методик аналізу лікарських засобів. – М., 2007. – 57 с.
11. British Pharmacopoeia. – 2001. – Vol. 11, Appendix III, A 141-A144.
12. By Kracmar J., Kracmarova J., Zyka J. Preview UV-Spektrophotometrie in der Arzneimittelkontrolle. Einfluss der Substitution und der Lösungsmittel auf das UV-spektrophotometrische Verhalten von Stoffen mit Pyridin-Chromophor // Die Pharmazie. – 1968. – 23 (10). – P. 567-573.
13. European Pharmacopoeia. – 5th ed. – Electronic version. – 2779 p.
14. Kovacik Jozef, Repcak Miroslav Accumulation of coumarin-related compounds in leaves of Matricaria chamomilla related to sample processing // Food Chemistry. – 2008. – 111. – Issue 3. – P. 755-757.
15. Salgado H.R.N., Oliveira C.L.C.G. Development and validation of an UV spectrophotometric method for determination of gatifloxacin in tablets // Pharmazie. – 2005. – № 4. – P. 263-264.
16. The rules governing medicinal products in the European Union. – Vol. 4. – Good manufacturing practice. – Medicinal products for human and veterinary use. – Guide to good manufacturing practice for medicinal products.

Л.И. Вишневская, А.Г. Чистяков, В.А. Георгиянц, В.К. Яковенко, Е.А. Хохлова
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ИССЛЕДОВАНИЯ ВАЛИДАЦИОННЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КУМАРИНОВ В НАСТОЙКЕ СЛОЖНОЙ “ПРОСТАТОФИТ”

Резюме

Определены основные валидационные характеристики аналитической методики количественного исследования кумаринов методом УФ-спектрофотометрии в настойке сложной “Простатофит”: линейность, правильность и сходимость, стабильность, внутрилабораторная точность. Предложенная методика характеризуется достаточной чувствительностью, простотой выполнения и может быть использована при контроле качества разработанного лекарственного средства.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: настойка сложная, валидационные характеристики, спектрофотометрия, кумарины, бихромат калия.

L.I. Vishnevskaya, O.H. Chistyakov, V.A. Heorhiyants, V.K. Yakovenko, K.O. Khokhlova
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

RESEARCHES OF VALIDATION CHARACTERISTICS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF COUMARINS METHOD IN TINCTURE COMPLEX “PROSTATOFIT”

Summary

We have determined basic validation characteristics for analytical method of coumarins quantitative determination by UF spectrophotometry method in tincture complex “Prostatofit”: linearity, rightness stability, insidelaboratory exactness. The offered method is characterized by sufficient sensitiveness, simplicity of implementation and can be used for quality control of the developed drugs.

KEY WORDS: tincture complex, validation characteristics, spectrophotometry, coumarins, potassium bichromate.

Отримано 28.01.10

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

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

В.О. Волошина², М.О. Литвиненко¹, І.Д. Сапегин², Г.Г. Берест¹,
С.І. Коваленко¹, А.А. Бабанін², Р.С. Синяк¹
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ¹
КРИМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ С.І. ГЕОРГІЄВСЬКОГО²

ГЕТЕРОЦИКЛІЗАЦІЇ НА ОСНОВІ [2-(3-R-1H-[1,2,4]ТРИАЗОЛ-5-ІЛ)ФЕНІЛ]АМІНІВ ТА АНГІДРИДІВ АЛКІЛДИКАРБОНОВИХ КИСЛОТ

Взаємодія [2-(3-R-1H-[1,2,4]тріазол-5-іл)феніл]амінів з ангідридами алкілдикарбонних кислот у м'яких умовах призводить до утворення відповідних N-ацильних похідних, а в жорстких умовах – (2-R-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)алкілкарбонних кислот. Будову синтезованих сполук підтверджено елементним аналізом та спектральними методами. Вивчено антигіпоксичну активність деяких синтезованих сполук за умов моделювання ішемічної гіпоксії мозку в хронічних експериментах на безсонних кроликах.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гетероциклізація, [2-(3-R-1H-[1,2,4]тріазол-5-іл)феніл]аміни, ангідриди алкілдикарбонних кислот.

ВСТУП. Аелюванню тріазолового циклу до хіназолінового фрагмента з утворенням 1,2,4-тріазолохіназолінів присвячено цілий ряд робіт. Аналіз підходів щодо їх синтезу показав, що основними 1,4-NNCN-бінуклеофілами, які використовуються у гетероциклізаціях, є 2-R-4-гідразінохіназоліни [1, 5, 10, 18-20], тоді як [2-(3-R-[1,2,4]тріазол-5-іл)феніл]аміни (**1**) як класичні 1,5-NCCN-бінуклеофіли мало досліджено [15, 16]. Існуючі теоретичні уявлення про властивості та реакційну здатність цих субстратів (**1**) вказують на те, що вони можуть вступати в реакції [5+1]-циклоконденсації з діелектрофілами. Крім того, для них характерні імін-енамінна таутомерія та існування у декількох таутомерних формах (1H-, 2H- та 4H-таутомери), і внаслідок циклоконденсацій можливе формування як s-тріазоло[4,3-с]хіназолінів, так і їх ізомерних [1,5-с]-серій. Враховуючи зазначене і продовжуючи дослідження з методів формування 1,2,4-тріазолохіназолінів, нами проведено вивчення поведінки [2-(3-R-[1,2,4]тріазол-5-іл)феніл]амінів (**1**) відносно ангідридів алкілдикарбонних кислот.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Температуру плавлення визначали капілярним методом на приладі ПТП (М). ІЧ-спектри знімали на спектрофотометрі Bruker Alpha в ділянці 7500-400 см⁻¹ з використанням приставки ATR (пряме вве-

дення речовини); ¹H ЯМР-спектри – на спектрофотометрі ядерного магнітного резонансу Mercury 400, розчинник – DMSO-D₆, внутрішній стандарт – TMC; хромато-мас-спектри – на високоефективному рідинному хроматографі Agilent 1100 Series, оснащеному діодно-матричним та мас-селективним детектором Agilent LC/MSD SL. Спосіб іонізації – хімічна іонізація при атмосферному тиску (APCI). Режим іонізації – одночасне сканування позитивних та негативних іонів у діапазоні мас 80-1000 m/z. Мас-спектри реєстрували на приладі Varian 1200L, іонізацію здійснювали електронним ударом (70 eV) при прямому введенні зразка. Температура іонного джерела – 200 °C, нагрівання відбувалось від 25 до 390 °C зі швидкістю 300 °C/хв.

Термогравіметричний аналіз проводили на дериватографі DTG-60 (s: mulateneous DTA-TG apparatus) фірми "Shimadzu". Швидкість нагрівання – 5 °C/хв від 25 до 320 °C на повітрі, швидкість самописця – 5 мм/хв. Як еталон використовували прожарений оксид алюмінію. Маса взірців становила 18,66 мг (**3.1**), 35,38 мг (**2.6**). Записували криві T, TGA, DTA. Крива T – зміна температури, TGA – диференційна крива зміни маси, DTA – диференційна крива зміни теплових ефектів.

Синтез [2-(3-R-1H-[1,2,4]тріазол-5-іл)феніл]амінів (**1.1-1.9**) здійснено відомими методами з константами, які відповідають літературним даним [15, 16].

1.1.1. 4-[2-(3-R-1H-1,2,4-тріазол-5-іл)аніліно]-4-оксобутанові кислоти (**2.1, 2.3, 2.4, 2.6**). До

© В.О. Волошина, М.О. Литвиненко, І.Д. Сапегин, Г.Г. Берест, С.І. Коваленко, А.А. Бабанін, Р.С. Синяк, 2010.

розчину 0,01 М відповідного [2-(3-*R*-1*H*-[1,2,4]тріазол-5-іл)феніл]аміну (**1.1-1.9**) в 15 мл метанолу або етанолу додають 1,10 г (0,011 М) янтарного ангідриду та перемішують на магнітній мішалці при кімнатній температурі 12 год. Осади, що утворились, відфільтровують. Для аналізу сполуки кристалізують з метанолу.

4-[2-(3-метил-1*H*-1,2,4-тріазол-5-іл)аніліно]-4-оксобутанова кислота (2.1). Вихід: 49,6 %; Т. пл. 152-154 °С; ІЧ-спектр, ν , см⁻¹: 3159, 3089, 2925, 1726, 1714, 1671, 1620, 1591, 1565, 1550, 1486, 1469, 1423, 1400, 1376, 1317, 1298, 1259, 1232, 1198, 1155, 1093, 1062, 992, 956, 910, 860, 835, 793, 753, 717, 659, 645; МС (APCI): m/z = 275 [M+1], 258 [M-H₂O]⁺; МС-EУ, m/z (I_{rel}, %) = 275 (3.5), 274 (M⁺, 34.6), 212 (55.9), 211 (100), 201 (26.6), 175 (7.1), 174 (43.1), 171 (10.0), 170 (5.5), 155 (8.8), 131 (7.2), 129 (5.6), 119 (6.6), 118 (46.2), 117 (7.0), 91 (9.8), 90 (21.5), 89 (14.1), 88 (9.8), 78 (5.0), 77 (16.0), 76 (10.9), 75 (9.0), 63 (17.3), 62 (10.0), 57 (28.3), 56 (12.1), 55 (16.0), 52 (5.7), 45 (45.4). Знайдено, %: N, 20.42. C₁₃H₁₄N₄O₃. Вирахувано, %: N, 20.43.

4-[2-(3-Бензил-1*H*-1,2,4-тріазол-5-іл)аніліно]-4-оксобутанова кислота (2.3). Вихід: 71,4 %; Т. пл. 184-186 °С; ІЧ-спектр, ν , см⁻¹: 3394, 3254, 3172, 3059, 3027, 1712, 1624, 1529, 1491, 1430, 1395, 1292, 1258, 1192, 1155, 1119, 770, 746, 706, 697, 656, 612; ¹H ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 13.81 (уш. с, COOH), 12.80 (уш. с, 1H, -CONH), 12.03 (с, 1H, -NH), 8.19 (д, 1H, H-6-PhNH), 7.85 (д, 1H, H-3-PhNH), 7.52 (т, 1H, J=7.6, 5-PhNH), 7.36 (т, 1H, J=7.6, 4-PhNH), 7.31-7.25 (м, 5H, H-2,3,4,5,6 PhCH₂), 3.82 (с, 2H, -CH₂Ph), 2.87 (м, 4H, -CH₂CH₂COOH); МС (APCI): m/z = 351 [M+1], 334 [M-H₂O]⁺. Знайдено, %: N, 15.99. C₁₉H₁₈N₄O₃. Вирахувано, %: N, 16.01.

4-[2-(3-Фенетил-1*H*-1,2,4-тріазол-5-іл)аніліно]-4-оксобутанова кислота (2.4). Вихід: 47,9 %; Т. пл. 146-148 °С; ІЧ-спектр, ν , см⁻¹: 3025, 2928, 1721, 1627, 1613, 1563, 1500, 1469, 1456, 1427, 1393, 1354, 1324, 1280, 1188, 1179, 1157, 1122, 1077, 1024, 991, 959, 922, 904, 881, 771, 752, 696, 667, 635, 617; МС (APCI): m/z = 365 [M+1], 347 [M-H₂O]⁺. Знайдено, %: N, 15.37. C₂₀H₂₀N₄O₃. Вирахувано, %: N, 15.37.

4-[2-(3-Феніл-1*H*-1,2,4-тріазол-5-іл)аніліно]-4-оксобутанова кислота (2.6). Вихід: 59,7 %; Т. пл. 184-186 °С; ІЧ-спектр, ν , см⁻¹: 3384, 3258, 3172, 1714, 1623, 1606, 1525, 1478, 1446, 1429, 1384, 1267, 1176, 1151, 1137, 1101, 921, 788, 774, 723, 690, 630; МС (APCI): m/z = 337 [M+1], 319 [M-H₂O]⁺. Знайдено, %: N, 16.65. C₁₈H₁₆N₄O₃. Вирахувано, %: N, 16.66.

1.1.2. 5-[2-(3-*R*-1*H*-1,2,4-тріазол-5-іл)аніліно]-5-оксопентанові кислоти (2.2, 2.5). До розчину

0,01 М відповідного [2-(3-*R*-1*H*-[1,2,4]тріазол-5-іл)-феніл]аміну (**1.1-1.9**) в 15 мл метанолу додають 1,25 г (0,011 М) глутарового ангідриду та перемішують на магнітній мішалці при кімнатній температурі 12 год. Осади, що утворились, відфільтровують. Для аналізу сполуки кристалізують з метанолу.

5-[2-(3-Метил-1*H*-1,2,4-тріазол-5-іл)аніліно]-5-оксопентанова кислота (2.2). Вихід: 50,0 %; Т. пл. 113-115 °С; ¹H ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 13.84 (уш. с, COOH), 12.92 (уш. с, 1H, -CONH), 12.25 (с, 1H, -NH), 8.12 (д, 1H, 6-PhNH), 7.73 (д, 1H, H-3-PhNH), 7.58 (т, 1H, 5-PhNH), 7.45 (т, 1H, 4-PhNH), 2.48 (с, 3H, CH₃), 2.36-2.32 (м, 4H, -CH₂CH₂CH₂COOH), 1.98 (кв, 2H, J=7.3, -CH₂CH₂CH₂COOH); МС (APCI): m/z = 289 [M+1], 272 [M-H₂O]⁺. Знайдено, %: N, 19.43. C₁₄H₁₆N₄O₃. Вирахувано, %: N, 19.44.

5-[2-(3-Фенетил-1*H*-1,2,4-тріазол-5-іл)аніліно]-5-оксопентанова кислота (2.5). Вихід: 56,8 %; Т. пл. 124-126 °С; МС (APCI): m/z = 379 [M+1], 361 [M-H₂O]⁺. Знайдено, %: N, 14.82. C₂₁H₂₂N₄O₃. Вирахувано, %: N, 14.80.

1.1.1. (2-*R*-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)пропанові кислоти (3.1, 3.3, 3.5, 3.7, 3.9, 3.11).

Метод А. До розчину 0,01 М відповідного [2-(3-*R*-1*H*-[1,2,4]тріазол-5-іл)феніл]аміну (**1.1-1.9**) в 15 мл кислоти ацетатної льодяної додають 1,10 г (0,011 М) янтарного ангідриду та кип'ячать протягом 4-6 год. Розчинник видаляють у вакуумі й після охолодження додають метанол. Утворені осади відфільтровують та промивають на фільтрі 10 мл діетилового етеру, сушать.

Метод Б. До 0,01 М відповідної 4-[2-(3-*R*-1*H*-1,2,4-тріазол-5-іл)аніліно]-4-оксобутанової кислоти (**2.1, 2.3, 2.4, 2.6**) додають 15 мл кислоти ацетатної льодяної та кип'ячать протягом 4-6 год. Розчинник видаляють у вакуумі й після охолодження додають метанол. Утворені осади відфільтровують та промивають на фільтрі 10 мл діетилового етеру, сушать.

Метод В. 0,55 г (0,002 М) 4-[2-(3-метил-1*H*-1,2,4-тріазол-5-іл)аніліно]-4-оксобутанової кислоти (**2.1**) нагрівають 10 хв при температурі 187-189 ± 5 °С. Плав після охолодження до кімнатної температури розтирають у холодному пропанолі-2. Утворений осад відфільтровують та сушать. Вихід: 79 %.

(2-Метил-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)пропанова кислота (3.1). Вихід: 60,9 % (метод А), 94,5 % (метод Б); Т. пл. 230-232 °С; ІЧ-спектр, ν , см⁻¹: 3089, 3034, 2922, 2847, 2760, 2678, 2581, 2526, 1714, 1627, 1565, 1532, 1499, 1471, 1425, 1392, 1347, 1310, 1278, 1226, 1186, 1115, 1041,

1000, 968, 922, 881, 791, 770, 726, 713, 679, 650, 630; ^1H ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 11.70 (с, 1H, -COOH), 8.39 (д, 1H, $J=8.0$, H-10), 7.97 (д, 1H, $J=8.0$, H-7), 7.88 (т, 1H, $J=7.8$, H-8), 7.75 (т, 1H, $J=7.8$, H-9), 3.55 (т, 2H, $J=6.6$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 2.98 (т, 2H, $J=6.6$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 2.61 (с, 3H, CH_3); МС (APCI): $m/z = 258$ [M+2], 257 [M+1]. Знайдено, %: N, 21.84. $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$. Вираховано, %: N, 21.86.

(2-Бензил-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)пропанова кислота (**3.3**). Вихід: 78,3 % (метод А), 97,4 % (метод Б); Т. пл. 210-212 °С; ІЧ-спектр, ν , cm^{-1} : 3030, 3008, 2925, 2851, 2526, 1714, 1625, 1561, 1530, 1492, 1466, 1432, 1394, 1343, 1324, 1294, 1262, 1189, 1155, 1120, 1032, 1023, 1003, 986, 966, 926, 878, 838, 809, 796, 771, 745, 731, 705, 697, 661, 636, 609; ^1H ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 11.67 (с, 1H, -COOH), 8.42 (д, 1H, $J=8.0$, H-10), 7.98 (д, 1H, $J=8.0$, H-7), 7.89 (т, 1H, $J=7.8$, H-8), 7.76 (т, 1H, $J=7.8$, H-9), 7.32-7.27 (м, 4H, H-2,3,5,6 PhCH₂), 7.20 (м, 1H, H-4 PhCH₂), 4.01 (с, 2H, $-\text{CH}_2\text{Ph}$), 3.54 (т, 2H, $J=6.6$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 2.97 (т, 2H, $J=6.6$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$); МС (APCI): $m/z = 334$ [M+2], 333 [M+1]. Знайдено, %: N, 16.85. $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$. Вираховано, %: N, 16.86.

(2-Фенетил-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)пропанова кислота (**3.5**). Вихід: 86,7 % (метод А); Т. пл. 226-228 °С; ІЧ-спектр, ν , cm^{-1} : 3207, 3155, 3085, 3062, 3026, 2925, 2858, 2653, 2510, 1712, 1682, 1628, 1587, 1563, 1496, 1469, 1455, 1422, 1391, 1364, 1346, 1320, 1289, 1271, 1224, 1201, 1183, 1159, 1125, 1076, 1065, 1040, 1027, 985, 959, 909, 870, 843, 779, 768, 752, 699, 673, 655, 618; МС (APCI): $m/z = 348$ [M+2], 347 [M+1]. Знайдено, %: N, 16.18. $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$. Вираховано, %: N, 16.17.

(2-Феніл-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)пропанова кислота (**3.7**). Вихід: 72,3 % (метод А); Т. пл. 240-241 °С; ІЧ-спектр, ν , cm^{-1} : 2902, 1713, 1623, 1606, 1561, 1525, 1477, 1445, 1429, 1384, 1350, 1320, 1300, 1274, 1175, 1151, 1136, 1111, 1100, 1077, 1026, 988, 957, 921, 877, 787, 771, 743, 722, 690, 671, 630, 614; ^1H ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 12.34 (с, 1H, -COOH), 8.52 (д, 1H, $J=8.0$, H-10), 8.33 (д, 2H, H-2', 6'), 8.02 (д, 1H, $J=8.0$, H-7), 7.94 (т, 1H, $J=7.8$, H-8), 7.81 (т, 1H, $J=7.8$, H-9), 7.62-7.58 (м, 3H, H-3', 4', 5'), 3.63 (т, 2H, $J=6.6$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.03 (т, 2H, $J=6.6$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$); ^{13}C ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 173.90 (COOH), 163.39 (C-2), 151.49 (C-5), 149.77 (C-7a), 142.61 (C-10b), 132.78 (C-8), 131.13 (C-1 Ph), 130.41 (C-9), 129.53 (C-3, C-5 Ph), 128.72 (C-4 Ph), 128.48 (C-7), 127.63 (C-2, C-6 Ph), 123.82 (C-10), 117.21 (C-10a), 30.27 (Het-CH₂), 29.36 (CH₂COOH); МС (APCI): $m/z = 320$ [M+2], 319 [M+1]; МС-ЕУ, m/z (I_{rel} , %) = 319 (1.6), 318 (M⁺, 7.3), 274 (28.4), 273 (100), 214 (6.9), 170

(5.9), 155 (7.3), 118 (17.2), 101 (5.3), 90 (10.4), 89 (6.5). Знайдено, %: N, 17.62. $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$. Вираховано, %: N, 17.60.

(2-(4-Метилфеніл)-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)пропанова кислота (**3.9**). Вихід: 70,5 % (метод А); Т. пл. 227-230 °С; ІЧ-спектр, ν , cm^{-1} : 3019, 2959, 2923, 2859, 2617, 2550, 2498, 1708, 1631, 1612, 1562, 1529, 1483, 1443, 1419, 1385, 1351, 1320, 1293, 1279, 1215, 1178, 1136, 1111, 1065, 1018, 989, 973, 952, 930, 883, 831, 793, 766, 744, 724, 709, 654, 620; ^1H ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 12.30 (с, 1H, -COOH), 8.49 (д, 1H, $J=8.0$, H-10), 8.22 (д, 2H, $J=7.6$, H-2', 6'), 8.00 (д, 1H, $J=8.0$, H-7), 7.93 (т, 1H, $J=7.6$, H-8), 7.80 (т, 1H, $J=7.6$, H-9), 7.41 (д, 2H, $J=8.2$, H-3', 5'), 3.61 (т, 2H, $J=7.1$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.02 (т, 2H, $J=7.1$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 2.42 (с, 3H, CH_3); ^{13}C ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 173.95 (COOH), 163.44 (C-2), 151.42 (C-5), 149.58 (C-7a), 142.58 (C-10b), 140.91 (C-4 Ph), 132.73 (C-8), 128.66 (C-1 Ph), 124.45 (C-9), 130.11 (C-3, C-5 Ph), 127.63 (C-7), 127.57 (C-2, C-6 Ph), 123.74 (C-10), 117.17 (C-10a), 29.61 (Het-CH₂), 27.57 (CH₂COOH), 21.56 (CH₃); МС (APCI): $m/z = 334$ [M+2], 333 [M+1]; МС-ЕУ, m/z (I_{rel} , %) = 333 (23.0), 332 (M⁺, 100), 331 (8.7), 287 (41.1), 285 (7.1), 156 (5.1), 155 (16.7), 145 (10.2), 143 (10.0), 131 (9.5), 130 (10.0), 129 (24.8), 128 (14.9), 118 (81.1), 117 (35.2), 116 (36.9), 115 (21.6), 114 (7.2), 102 (25.6), 101 (16.0), 88 (6.0), 87 (7.8), 65 (6.2), 62 (12.9), 55 (15.2), 54 (6.6), 51 (16.1). Знайдено, %: N, 16.84. $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$. Вираховано, %: N, 16.86.

(2-(4-Хлорофеніл)-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)пропанова кислота (**3.11**). Вихід: 76,7 % (метод А); Т. пл. 228-232 °С; ІЧ-спектр, ν , cm^{-1} : 3017, 2976, 2915, 2851, 2630, 1703, 1625, 1606, 1579, 1561, 1530, 1518, 1476, 1441, 1413, 1393, 1348, 1316, 1300, 1289, 1274, 1217, 1177, 1137, 1112, 1091, 1016, 987, 959, 912, 900, 872, 840, 787, 770, 746, 708, 654; ^1H ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 12.34 (с, 1H, -COOH), 8.48 (д, 1H, $J=8.0$, H-10), 8.30 (д, 2H, $J=8.2$, H-2', 6'), 8.00 (д, 1H, $J=8.0$, H-7), 7.93 (т, 1H, $J=7.8$, H-8), 7.80 (т, 1H, $J=7.8$, H-9), 7.66 (д, 2H, $J=8.2$, H-3', 5'), 3.60 (т, 2H, $J=6.6$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 3.02 (т, 2H, $J=6.6$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$); МС (APCI): $m/z = 355$ [M+3], 354 [M+2], 353 [M+1]. Знайдено, %: N, 15.86. $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}_2$. Вираховано, %: N, 15.88.

1.1.2. (2-R-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)бутанові кислоти (**3.2, 3.4, 3.6, 3.8, 3.10**).

Метод А. До розчину 0,01 М відповідного [2-(3-R-1H-[1,2,4]тріазол-5-іл)феніл]аміну (**1.1-1.9**) в 15 мл кислоти ацетатної льодяної додають 1,25 г (0,011 М) глутарового ангідриду та кип'яють протягом 4-6 год. Розчинник

видаляють у вакуумі й після охолодження додають метанол. Утворені осадки відфільтровують та промивають на фільтрі 10 мл діетилового етеру, сушать.

Метод Б. До 0,01 М відповідної 5-[2-(3-*R*-1*H*-1,2,4-тріазоло-5-іл)аніліно]-5-оксопентанової кислоти (**2.2**, **2.5**) додають 15 мл кислоти ацетатної льодяної та кип'ячать протягом 4-6 год. Розчинник видаляють у вакуумі й після охолодження додають метанол. Утворені осадки відфільтровують та промивають на фільтрі 10 мл діетилового етеру, сушать.

(2-Метил-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)бутанова кислота (3.2). Вихід: 86,7 % (метод А), 96,3 % (метод Б); Т. пл. 191-194 °С; ІЧ-спектр, ν , см⁻¹: 2917, 2849, 2715, 2649, 2577, 2509, 1720, 1626, 1563, 1536, 1504, 1472, 1455, 1415, 1396, 1378, 1347, 1332, 1307, 1279, 1250, 1181, 1114, 1060, 1043, 999, 981, 941, 908, 878, 784, 770, 745, 710, 670, 634; ¹H ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 12.10 (с, 1H, -COOH), 8.36 (д, 1H, *J*=8.1, H-10), 7.99 (д, 1H, *J*=8.1, H-7), 7.88 (т, 1H, *J*=7.8, H-8), 7.75 (т, 1H, *J*=7.6, H-9), 3.31 (т, 2H, *J*=7.3, -CH₂CH₂CH₂COOH), 2.59 (с, 3H, CH₃), 2.46 (т, 2H, *J*=7.3, -CH₂CH₂CH₂COOH), 2.17 (кв, 2H, *J*=7.3, -CH₂CH₂CH₂COOH); ¹³C ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 174.57 (COOH), 163.44 (C-2), 150.96 (C-5), 149.97 (C-7a), 142.58 (C-10b), 132.43 (C-8), 128.50 (C-9), 128.36 (C-7), 123.56 (C-10), 117.05 (C-10a), 33.36 (Het-CH₂), 31.64 (CH₂COOH), 21.03 (-CH₂-), 14.68 (CH₃); МС (APCI): *m/z* = 272 [M+2], 271 [M+1]; МС-ЕУ, *m/z* (*I*_{rel}, %) = 271 (5.0), 270 (M⁺, 26.9), 229 (5.5), 212 (23.4), 211 (100), 199 (7.9), 198 (54.5), 197 (6.4), 156 (5.7), 155 (6.7), 128 (5.4), 118 (17.8), 117 (5.6), 115 (5.8), 89 (6.3), 88 (8.9), 77 (8.0), 76 (7.4), 75 (7.3), 63 (5.0), 62 (7.1), 55 (7.0), 45 (24.8), 43 (7.3), 42 (6.8). Знайдено, %: N, 20.72. C₁₄H₁₄N₄O₂. Вираховано, %: N, 20.73.

(2-Бензил-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)бутанова кислота (3.4). Вихід: 86,6 % (метод А); Т. пл. 167-169 °С; ІЧ-спектр, ν , см⁻¹: 3031, 3009, 2971, 2921, 2655, 2584, 1717, 1630, 1562, 1532, 1495, 1468, 1457, 1430, 1416, 1398, 1367, 1337, 1312, 1278, 1253, 1198, 1185, 1158, 1115, 1057, 1035, 985, 968, 911, 881, 776, 738, 731, 706, 693, 673, 658, 636, 614; ¹H ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 12.10 (с, 1H, -COOH), 8.38 (д, 1H, *J*=8.1, H-10), 8.00 (д, 1H, *J*=8.1, H-7), 7.89 (т, 1H, *J*=7.8, *J*'=1.3, H-8), 7.74 (т, 1H, *J*'=7.6, *J*'=1.2, H-9), 7.40 (д, 2H, *J*=7.3, H-2, 6 PhCH₂), 7.33 (т, 2H, *J*=7.6, H-3, 5 PhCH₂), 7.24 (т, 1H, *J*=7.3, H-4 PhCH₂), 4.31 (с, 2H, CH₂Ph), 3.34 (т, 2H, *J*=7.3, -CH₂CH₂CH₂COOH), 2.46 (т, 2H, *J*=7.3, -CH₂CH₂CH₂COOH), 2.19 (кв, 2H, *J*=7.3, -CH₂CH₂CH₂COOH); ¹³C ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 174.61 (COOH), 165.63 (C-2), 151.18 (C-5), 150.14 (C-7a), 142.60 (C-10b), 138.06 (C-1 Bz),

133.80 (C-8), 130.09 (C-9), 129.37 (C-3, C-5 Bz), 128.91 (C-2, C-6 Bz), 128.40 (C-7), 126.98 (C-10), 123.66 (C-10a), 34.71 (CH₂Ph), 33.35 (Het-CH₂), 31.73 (CH₂COOH), 20.98 (-CH₂-); МС (APCI): *m/z* = 348 [M+2], 347 [M+1]; МС-ЕУ, *m/z* (*I*_{rel}, %) = 347 (6.6), 346 (M⁺, 100), 328 (4.4), 302 (5.5), 301 (4.4), 287 (3.3), 285 (5.5), 275 (5.0), 274 (16.3), 259 (10.5), 254 (10.9), 149 (11.9), 143 (10.6), 131 (11.7), 129 (5.8), 118 (9.6), 116 (6.9), 92 (6.5), 91 (47.9), 77 (5.1), 65 (9.7), 45 (5.0), 43 (11.1). Знайдено, %: N, 16.17. C₂₀H₁₈N₄O₂. Вираховано, %: N, 16.14.

(2-Фенетил-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)бутанова кислота (3.6). Вихід: 61,1 % (метод А), 96,3 % (метод Б); Т. пл. 186-190 °С; ІЧ-спектр, ν , см⁻¹: 3022, 2973, 2940, 2861, 2821, 2736, 2660, 2591, 1716, 1627, 1612, 1562, 1535, 1500, 1470, 1454, 1416, 1400, 1371, 1343, 1317, 1279, 1255, 1220, 1199, 1189, 1158, 1143, 1117, 1073, 1058, 1029, 985, 969, 913, 850, 776, 747, 696, 675, 664, 638, 614; ¹H ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 12.08 (с, 1H, -COOH), 8.42 (д, 1H, *J*=8.1, H-10), 7.98 (д, 1H, *J*=8.1, H-7), 7.91 (т, 1H, *J*'=7.8, *J*'=1.3, H-8), 7.77 (т, 1H, *J*'=7.8, *J*'=1.3, H-9), 7.34-7.27 (м, 4H, H=2,3,5,6 Ph(CH₂)₂), 7.20 (т, 1H, *J*=7.1, H-4 Ph(CH₂)₂), 3.34 (т, 2H, *J*=7.3, -CH₂CH₂CH₂COOH), 3.24 (т, 2H, *J*=6.8, CH₂CH₂Ph), 3.18 (т, 2H, *J*=6.8, CH₂CH₂Ph), 2.45 (т, 2H, *J*=7.3, -CH₂CH₂CH₂COOH), 2.17 (кв, 2H, *J*=7.3, -CH₂CH₂CH₂COOH); МС (APCI): *m/z* = 362 [M+2], 361 [M+1]. Знайдено, %: N, 15.53. C₂₁H₂₀N₄O₂. Вираховано, %: N, 15.54.

(2-Феніл-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)бутанова кислота (3.8). Вихід: 52,4 % (метод А); Т. пл. 199-202 °С; ІЧ-спектр, ν , см⁻¹: 3056, 2982, 2931, 2908, 2864, 2847, 2720, 2652, 2604, 1713, 1628, 1605, 1565, 1534, 1519, 1478, 1443, 1393, 1350, 1321, 1299, 1282, 1272, 1222, 1174, 1134, 1105, 1070, 1037, 1022, 991, 961, 923, 892, 877, 851, 791, 782, 765, 747, 721, 689, 669, 653, 614; ¹H ЯМР-спектр, δ , м. ч.: 12.08 (с, 1H, -COOH), 8.50 (д, 1H, *J*=8.1, H-10), 8.32 (д, 2H, *J*=7.3, H-2', 6'), 8.05 (д, 1H, *J*=8.1, H-7), 7.94 (т, 1H, *J*=7.8, H-8), 7.80 (т, 1H, *J*=7.6, H-9), 7.62-7.56 (м, 3H, H-3', 4', 5'), 3.43 (т, 2H, *J*=7.3, -CH₂CH₂CH₂COOH), 2.45 (т, 2H, *J*=7.3, -CH₂CH₂CH₂COOH), 2.24 (кв, 2H, *J*=7.3, -CH₂CH₂CH₂COOH); МС (APCI): *m/z* = 334 [M+2], 333 [M+1]; МС-ЕУ, *m/z* (*I*_{rel}, %) = 333 (11.5), 332 (M⁺, 22.1), 288 (4.4), 287 (9.0), 274 (20.5), 273 (100), 261 (15.9), 260 (62.8), 259 (14.8), 258 (7.0), 245 (6.9), 229 (8.7), 155 (17.4), 149 (9.9), 129 (13.9), 128 (8.8), 118 (16.3), 104 (10.2), 103 (8.6), 102 (7.6), 91 (7.7), 90 (8.6), 89 (9.7), 88 (11.4), 77 (9.5), 70 (7.4), 69 (6.8), 61 (14.2), 57 (18.7), 56 (5.0), 45 (5.3), 43 (29.6), 41 (6.8). Знайдено, %: N, 16.86. C₁₉H₁₆N₄O₂. Вираховано, %: N, 16.86.

(2-(4-Метилфеніл)-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)бутанова кислота (**3.10**). Вихід: 75,1 % (метод А); Т. пл. 170-174 °С; ІЧ-спектр, ν , см^{-1} : 3324, 3061, 3013, 2974, 2918, 2570, 1915, 1698, 1628, 1612, 1559, 1529, 1479, 1441, 1413, 1384, 1360, 1344, 1316, 1294, 1273, 1213, 1175, 1135, 1110, 1101, 1044, 1019, 985, 940, 922, 900, 879, 862, 828, 770, 761, 740, 722, 708, 667, 615; МС (APCI): $m/z = 348$ [M+2], 347 [M+1]. Знайдено, %: N, 16.19. $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$. Вираховано, %: N, 16.17.

Дослідження на антигіпоксичну активність проводили на кролях породи "Шиншила" з попередньо вживленими у кору великих напівкуль, таламус та гіпоталамус голчастими платиновими електродами [3, 14]. Координати структур визначали відповідно до атласу стереотаксичних досліджень на мозку кролика [17]. Напругу кисню в тканинах вказаних структур вивчали методом полярографії [1]. Одержані дані без вираховань абсолютних значень pO_2 безпосередньо призводили до \pm % до вихідного рівня, який брали за 100 %. Моделювання антиортостатичної гіпокінезії з кутом нахилу 45° головою донизу проводили на спеціальному стенді (розроблений на кафедрі фармакології КДМУ імені С.І. Георгієвського) [4, 11]. Досліджувані сполуки вводили у вигляді суспензій (до наважки речовини додавали 0,3 мл твін-80) перорально в дозі 10 мг/кг за 30 хв до переведення тварин в антиортостатичне положення. Як препарат порівняння використовували пірацетам у дозі 250 мг/кг, який вводили у вигляді водного розчину перорально, також за 30 хв до переведення тварин в антиортостатичне положення.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Відомо [12], що результатом реакції ангідридів алкілдікарбонівих кислот з нуклеофілами можуть бути як N-ацильні похідні, так і ряд гетероциклічних систем. Нами встановлено, що взаємодія [2-(3-R-1H-[1,2,4]тріазол-5-іл)феніл]амінів (**1.1-1.9**) з янтарним і глутаровим ангідридом при витримці вихідних речовин протягом 12-24 год за кімнатної температури в метанолі або етанолі призводила до утворення відповідних N-ацильних похідних **2.1-2.6** (схема). На користь перебігу реакції ацилювання та утворення N-ацильних похідних (**2.1-2.6**) свідчить насамперед поява в ^1H ЯМР-спектрах речовин **2.2, 2.3** слабкопольних сигналів протонів карбоксильної та амідної груп у вигляді двох уширених синглетів при 14,09-13.81 та 13.20-12.80 м. ч. відповідно. Сигнал NH-протона тріазольного циклу за рахунок водневого зв'язку також зміщений у зазначену ділян-

ку і резонує при 12.41-12.03 м. ч. Що стосується ароматичної ділянки спектра, то протони анілідної субституенти сполук **2.2, 2.3** резонують у вигляді послідовно розташованих дублетів H-6 та H-3 і триплетів H-5 та H-4. В сильнопольній частині спектра сполук **2.2, 2.3** спостерігаються сигнали аліфатичних замісників. Так, у сполуці **2.2** чотири еквівалентні протони залишку пентанової кислоти резонують як мультиплет при 2.36-2.32 м. ч., а два – як квадруплет при 1.98 м. ч., тоді як у сполуці **2.3** чотири еквівалентні протони залишку бутанової кислоти резонують як мультиплет при 2.87 м. ч.

У хромато-мас-спектрах сполук **2.1-2.6** реєструють інтенсивні піки молекулярних іонів [M+2] та [M+1], і, що важливо, всі сполуки характеризуються додатковим молекулярним іоном $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$. Зазначений молекулярний іон вказує на те, що у результаті хімічної іонізації вже при атмосферному тиску проходять реакції циклоконденсації амідів (**2.1-2.6**). Мас-спектр (ЕУ) сполуки **2.1** додатково підтверджує будову N-ацильних похідних (**2.1-2.6**) [7]. Так, розпад зазначеної сполуки зумовлений викидом з молекулярного іона (M^+ , m/z 275) часток CH_2COOH , $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ та утворенням піків іонів з m/z 211 (100 %), 201 (26,6 %) та 174 (43,1 %) відповідно. Подальшим напрямком фрагментації іона $[\text{M}-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}]^+$ (m/z 174) є розрив зв'язків N(1)-N(2) та C(3)-N(4) тріазольного циклу з утворенням іонів з m/z 118 (47,2 %) та 55 (16,0 %).

В ІЧ-спектрах сполук **2.1-2.6** ключовими смугами є: смуга при 1767-1688 см^{-1} ("амід-I"), зумовлена валентними коливаннями СО-групи, і смуга при 1696-1512 см^{-1} ("амід-II"), змішане валентно-деформаційне коливання зв'язків NH та CN. Крім того, в спектрі сполук **2.1-2.6** є смуга валентних коливань NH-групи в ділянці 3486-3151 см^{-1} та плече при 3128-3013 см^{-1} , яке є обертоном смуги поглинання "амід-II" [8].

Реакція вихідних сполук (**1.1-1.9**) з янтарним та глутаровим ангідридом у середовищі киплячого діоксану, ДМФА або кислоти ацетатної льодяної супроводжується циклоконденсацією з утворенням відповідних (2-R-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)алкілкарбонівих кислот (**3.1-3.11**, схема). Зазначена циклоконденсація характерна також і для амідів **2.1-2.6**, і, що важливо, сполуки, синтезовані методами А та Б, мають подібні фізико-хімічні властивості.

Підтвердження будови сполук **3.1-3.11** та виключення альтернативних структур типу **4**, а саме 1-[2-(3-R-1H-1,2,4-тріазол-5-іл)феніл]-

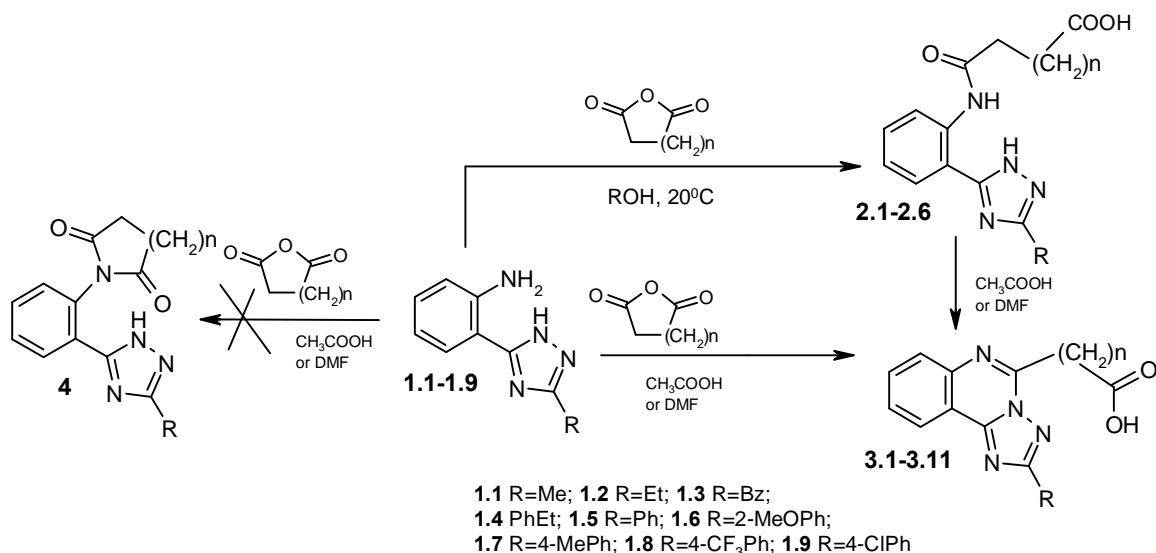


Схема.

піролідин-2,5-діонів, було здійснено на основі спектральних даних. Так, у хромато-мас-спектрах сполук **3.1-3.11** реєструють інтенсивні піки молекулярних іонів $[M+2]$ та $[M+1]$, які однозначно підтверджують очікувану молекулярну масу та індивідуальність синтезованих сполук.

У ¹H ЯМР-спектрах сполук **3.1-3.11** спостерігається парамагнітний зсув протонів триазолохіназолінового циклу, які утворюють систему ABCD, резонуючи у вигляді послідовно розташованих дублетів Н-10 та Н-7 і триплетів Н-9 та Н-8. Необхідно зазначити, що вказані зсуви та розташування сигналів у ¹H ЯМР-спектрі специфічні для триазоло[1,5-с]хіназолінів [10]. Окрім того, у спектрах сполук **3.1-3.11** зникають два слабкопольні синглети NHCO-, COOH-груп та синглет NH-триазольного циклу, які характерні для сполук **2.1-2.6**, а з'являється один уширений синглет карбоксильної групи при 12.35-11.70 м. ч. У сильно-польній частині спектра також спостерігаються сигнали аліфатичних замісників 5 положення з характеристичним розщепленням, що суттєво відрізняє їх від вихідних сполук **2.1-2.6**. Так, у сполуках **3.1, 3.3, 3.7, 3.9, 3.11** протони залишку пропанової кислоти резонують як два послідовно розташовані триплети при 3.63-3.55 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) та 3.03-2.98 м. ч. ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), тоді як у сполуках **3.2, 3.4, 3.6, 3.8** протони залишку бутанової кислоти резонують як послідовно розташовані триплети при 3.34-3.31 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$) та 2.46-2.45 м. ч. ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), а також квадруплет при 2.24-2.17 (кв, 2H, $J=7.3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$). На користь утворення триазоло[1,5-с]хіназолінової системи свідчать також і ¹³C ЯМР-спектри.

Так, спектри сполук **3.2, 3.4, 3.7, 3.9** характеризуються трьома дезекранованими атомами карбону, а саме карбоксильної групи при 173.90-174.61 м. ч., С-2 при 165.63-163.39 м. ч. та С-5 при 151.49-150.96 м. ч.

Що стосується ІЧ-спектрів сполук **3.1-3.11**, то вони є димерами і характеризуються валентними коливаннями асоційованих ОН-груп при 3207-3089 cm^{-1} , інтенсивним характерним контуром смуг при 2902-2510 cm^{-1} , коливаннями ν_{CO} -групи при 1714-1712 cm^{-1} та $\gamma_{(\text{OH}\dots\text{O})}$ -фрагмента при 986-909 cm^{-1} . Сполукам **3.1-3.11** властиві також симетричні й несиметричні коливання аліфатичної ν_{CH_2} -групи при 2974-2915 cm^{-1} , $\nu_{\text{C}=\text{C}}$ -зв'язку при 1643-1468 cm^{-1} та інтенсивні коливання δ_{CH} -зв'язків ароматичних кілець при 846-771 cm^{-1} [8].

Мас-спектрометричне дослідження (ЕУ) сполук **3.2, 3.4, 3.7, 3.8, 3.9** дозволило виявити ряд закономірностей їх фрагментації. Основні первинні етапи фрагментації сполук **3.7, 3.9** зумовлені елімінуванням з M^+ радикалів COOH, причому пік іона $[\text{M} - \text{COOH}]^+$ має високу інтенсивність. Так, у випадку сполуки **3.7** його інтенсивність складає 100 %, а **3.9** – 41,1 %. Подальша картина розпаду іона $[\text{M} - \text{COOH}]^+$ відбувається по зв'язках С(10b)–N(1) та N(3)–N(4) з відщепленням амідинового фрагмента (m/z 118 і 131 для сполук **3.7, 3.9** відповідно) та утворенням фрагментарного іона, маса якого відповідає розрахунковій масі 5-алкілхіназоліну (m/z 155). Мас-спектри сполук **3.2, 3.4** та **3.8** на початковому етапі відрізняються від мас-спектрів попередніх сполук **3.7** та **3.9**. Так, специфічною особливістю їх розпаду є утворення піків іонів $[\text{M}-\text{CO}_2]^+$, $[\text{M}-\text{COOH}]^+$, $[\text{M}-\text{CH}_2\text{COOH}]^+$, $[\text{M}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}]^+$

та $[M-CH_2CH_2CH_2COOH]^+$. Важливо відмітити, що для сполук **3.2** та **3.8** найбільшу інтенсивність мають іони $[M-CH_2COOH]^+$ (100 %) та $[M-CH_2CH_2COOH]^+$ (54-63 %), тоді як у сполуки **3.4** їх інтенсивність незначна. У подальшому розпад утвореного піку іона $[M-CH_2COOH]^+$ подібний до розпаду сполук **3.7**, **3.9** і відбувається по зв'язках C(10b)–N(1) та N(3)–N(4). Отже, сукупність спектральних даних дозволяє однозначно стверджувати, що гетероциклізація [2-(3-R-1H-[1,2,4]тріазол-5-іл)феніл]амінів з ангідридами дикарбонових кислот призводить до утворення (2-R-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)алкілкарбонових кислот [10, 15, 20].

Відомо, що 2-[(3H)-хіназолін-4-іліден]гідрази моноалкіл-(арил-, гетерил-) карбонових та діалкілкарбонових кислот при термолізі формують відповідні 2-заміщені [1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназоліни [9, 10]. З огляду на те, що в літературі відсутні будь-які дані щодо поведінки N-ацильних похідних **2.1-2.6** при нагріванні, нами в подальшому було досліджено процеси, які відбуваються при плавленні зазначених сполук, та вивчено можливість застосування термолізу для проведення гетероциклізацій на їх основі [13].

У процесі нагрівання 4-[2-(3-метил-1H-1,2,4-тріазол-5-іл)аніліно]-4-оксобутанової кис-

лоти (**2.1**) втрата в масі становить близько 18 а. о. м., що вказує на відщеплення молекул води (рис. 1). Даний процес починається при 95 °С, а максимальної швидкості він набуває при 154 °С та супроводжується відповідним ендотермічним мінімумом (крива DTA). Дегідратація перетинається з процесом плавлення речовини, який відбувається при 152-154 °С, що збігається з експериментально визначеною температурою плавлення. Даний процес закінчується при 189 °С. У подальшому, при 230-232 °С, починається другий процес плавлення утвореної (2-метил-[1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолін-5-іл)пропанової кислоти (**3.1**) (відповідний ендотермічний мінімум на кривій DTA). Подальше нагрівання призводить до декарбоксілювання (ендотермічний мінімум при 279 °С) та деструкції зразка. Таким чином, оптимальним температурним режимом для синтезу відповідного дегідратованого похідного (**3.1**) з амідів **2.1** можна вважати інтервал $187-189 \pm 5$ °С. Для визначення будови продукту дегідратації нами був проведений термоліз сполуки **2.1** (метод В). При цьому було встановлено, що синтезована речовина за своїми фізико-хімічними характеристиками була ідентична речовині **3.1**, яку одержано класичним методом циклоконденсації.

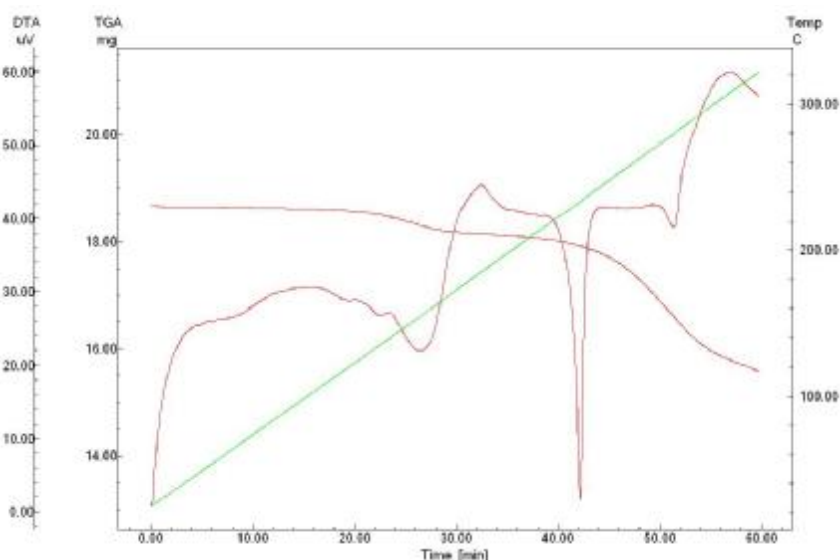


Рис. 1. Дериwатограма сполуки **2.1**.

Таким чином, [2-(3-R-1H-[1,2,4]тріазол-5-іл)-феніл]аміни (**1.1-1.9**) можуть бути використані як "класичні бінклеофіли" в реакціях циклоконденсації [5+1] з метою побудови [1,2,4]тріазоло[1,5-с]хіназолінових систем, і для проведення зазначеної циклоконденсації необхідні жорсткі умови (кип'ятіння ви-

хідних сполук в діоксані, ДМФА, кислоті ацетатній або термоліз).

Результати досліджень на антигіпоксичну активність за умов моделювання ішемічної гіпоксії мозку в хронічних експериментах на безсонних кроликах показали, що переведення тварин в антиортостатичне положення вик-

ликає зменшення напруги кисню у тканинах (табл. 1). Це зумовлено зміщенням крові у кра-
ніальному напрямку і рефлекторним спазмом
мозкових судин у відповідь на підвищення
внутрішньочерепного тиску [2-4, 6, 11, 14, 17].
Дана реакція має захисний характер і пере-
шкоджає розвитку набряку мозку.

Відповідно до розподілу активності за
структурами, досліджувані речовини можна
умовно поділити на 3 групи. Ступінь активності
“+” – “помірна” відмічали, якщо в результаті

дії речовини в даній структурі зберігалось зни-
ження pO_2 більш ніж на -5 % щодо контроль-
ного рівня (зменшення зниження показника).
Ступінь активності “++” – “середня” відзнача-
ли, якщо спостерігалось відхилення $pO_2 \pm 5$ %
щодо контрольного рівня (усунення знижен-
ня показника). Ступінь активності “+++” – “ви-
сока” відмічали, якщо мало місце абсолютне
підвищення pO_2 більш ніж на + 5 % щодо кон-
трольного рівня (абсолютне зростання показ-
ника).

Таблиця 1 – **Зміни напруги кисню (pO_2) у тканинах мозку кролів при АОП без застосування препаратів і на фоні дії досліджуваних сполук**

Показник	Зміни показника у \pm % щодо вихідного рівня (через 2 год впливу), який взято за 100 %			
	Сполука	Кора	Таламус	Гіпоталамус
1	2	3	4	5
M	Контроль	-29,22	-25,13	-19,28
$\pm m$		1,97	1,32	0,51
P		<0,01	<0,01	<0,01
Δ		-	-	-
M	Пірацетам	-18,54	-21,07	-4,37
$\pm m$		2,64	1,85	0,94
P		<0,01	<0,01	<0,01
Δ		+	+	++
M	1.1	-17,70	+3,75	+14,91
$\pm m$		0,72	1,41	1,98
P		<0,01	<0,05	<0,01
Δ		+	++	+++
M	1.2	-13,21	-18,42	+3,16
$\pm m$		2,06	2,96	4,46
P		<0,01	<0,01	>0,5
Δ		+	+	++
M	1.3	-7,54	+12,75	-7,56
$\pm m$		2,34	2,61	1,75
P		<0,01	<0,01	<0,01
Δ		+	+++	+
M	1.4	-2,18	+23,24	+18,66
$\pm m$		2,72	2,36	3,15
P		>0,5	<0,01	<0,01
Δ		++	+++	+++
M	1.6	-6,07	-12,22	-0,54
$\pm m$		3,18	1,27	1,54
P		>0,1	<0,01	>0,5
Δ		+	+	++
M	1.7	-6,94	+16,62	+13,69
$\pm m$		1,82	2,63	2,71
P		<0,01	<0,01	<0,01
Δ		+	+++	+++

1	2	3	4	5
M	1.8	-14,52	+2,60	+3,27
±m		1,84	3,34	2,70
P		<0,01	>0,5	>0,25
Δ		+	++	++
M	1.9	-0,65	-2,40	+6,38
±m		2,12	1,63	1,91
P		>0,5	>0,25	<0,01
Δ		++	++	+++
M	3.5	+15,35	+3,61	+6,24
±m		3,15	1,40	1,80
P		<0,01	>0,05	<0,01
Δ		+++	+++	+++
M	3.6	+26,45	+15,69	+17,92
±m		1,96	1,58	2,57
P		<0,01	<0,01	>0,01
Δ		+++	+++	+++

Препарат порівняння "Пірацетам" проявляє "помірну" антигіпоксичну активність, зменшуючи при цьому рО₂ найбільш виражено в гіпоталамусі (табл. 1). До цієї групи слід віднести сполуку **1.2**, для якої також характерні "помірна" активність у всіх структурах мозку і "середня" активність в одній із структур. Друга група (із "середньою" активністю) – "помірна" дія в одних структурах поєднується із "середньою" або "високою" в інших. До цієї групи слід віднести **1.1, 1.3, 1.6, 1.7, 1.8**. Третя група (з "високою" активністю) – рівномірна "середня" ефективність у всіх структурах мозку або її поєднання з "високою". До цієї групи слід віднести **1.4, 1.9**. Важливим є те, що досліджувані сполуки в більшості випадків суттєво відрізня-

лись від пірацетама як за ступенем антигіпоксичної активності (Δ), так і за її проявом у відповідних структурах мозку.

ВИСНОВОК. Дане дослідження мало скринінговий характер і надало можливість у подальшому для виявлених "структур-лідерів" (**1.4, 1.9**) здійснити моделювання молекули з метою підсилення антигіпоксичної активності. Проведений експеримент виправдав наші сподівання, і сполуки **3.5** та **3.6** з "високою" антигіпоксичною активністю на сьогодні проходять поглиблене дослідження.

Співробітництво. Колектив авторів вдячний компанії "Enamine Ltd." (Київ, Україна) за фінансову підтримку даної роботи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бабичев Ф.С., Ковтуненко В.А. Методы синтеза конденсированных 1,2,4-триазолов (обзор) // ХГС. – 1977. – № 2. – С. 147-164.
2. Бекетов А.И., Коняева Е.И. Кровообращение и напряжение кислорода в головном мозге бодрствующих и наркотизированных кроликов при антиортостатическом воздействии // Физиол. журн. СССР. – 1989. – **75**, № 11. – С. 1548-1553.
3. Бекетов А.И., Сапегин И.Д., Полевик И.В. Экспериментальное (доклиническое) изучение фармакологических средств, влияющих на мозговое кровообращение: Методические рекомендации. – К.: Авицена, 2002. – 33 с.

4. Березовский В.А. Напряжение кислорода в тканях животных и человека. – К.: Наукова думка, 1975. – 280 с.
5. Гизатуллина Э.М., Карцев В.Г. Аннелирование 1,2,4-триазольного ядра на основе α-гидразинозамещенных гетероциклов и их гидразонов (обзор) // ХГС. – 1993. – № 12. – С. 1587-1613.
6. Горгиладзе Г.И., Бряннов И.И. Космическая болезнь движения // Космич. биол. и авиакосмич. мед. – 1989. – **23**, № 3. – С. 4-14.
7. Заикин В.Г., Варламов А.В., Микая А.И., Простаков Н.С. Основы масс-спектрометрии органических соединений. – М.: Наука/Интерпериодика, 2001. – 286 с.

8. Казицина Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. – М.: Высшая школа, 1971. – 264 с.
9. Карпенко О.В., Коваленко С.И. Термогравиметричні дослідження 4-(N-ацил)гідразінохіназолінів та гетероциклізації на їх основі // Вопросы химии и химической технологии. – 2006. – № 5. – С. 12-16.
10. Карпенко О.В. Синтез анельованих гетероциклічних сполук похідних 4-гідразінохіназоліну та їх біологічна активність: Автореф. дис. ... канд. хім. наук. – Львів, 2007. – 23 с.
11. Коваленко Е.А., Березовский В.А., Эпштейн И.М. Полярографическое определение кислорода в организме. – М.: Медицина, 1975. – 231 с.
12. Общая органическая химия: В 12 т. / Под ред. Д. Бартона, У.Д. Оллиса. – М.: Химия, 1985. – Т. 8: Азотсодержащие гетероциклы / Под ред. П.Г. Сэмса. – Пер. с англ. / Под ред. Н.К. Кочеткова. – 752 с.
13. Павлова С.С., Журавлева И.В., Толчинский Ю.И. Термический анализ органических и высокомолекулярных соединений. – М.: Химия, 1983. – 118 с.
14. Сапегин И.Д. Влияние пикамилаона и фенибута на мозговое кровообращение при моделировании гемодинамических нарушений, связанных с болезнью движения: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук: 14.00.25. – К., 1993. – 20 с.
15. Balo C., Lopez C., Brea J.M. et al. Synthesis and Evaluation of Adenosine Antagonist Activity of a Series of [1,2,4]Triazolo[1,5-c]quinazolines // Chem. Pharm. Bull. – 2007. – 55, № 3. – P. 372-375.
16. Gatta F., Giudice M.R., Borioni A. Synthesis of [1,2,4]Triazoloquinazoline and [1,2,4]Triazolo-1,4-benzodiazepine Derivatives // J. Org. Chem. – 1993. – 30. – P. 11-16.
17. Monier M., Gangloff M. Atlas for stereotaxic brain research on the conscious rabbit. – Amsterdam: Elsevier Publishing Company, 1961. – 145 p.
18. Pat. USA 4463007. A61K 31/505. Triazoloquinazolinones, and compositions and methods for treating allergic disorders with them / Schlecker R., Friedrich L., Lenke D. (FRG); BASF AG (FRG); Заявл. 15.11.1982; Опыл. 31.07.1984.
19. Pat. USA 5631261. C07D 487/04. Triazoloquinazolinones, their preparation and their use / Schlecker R., Treiber H.-J., Behl B., Hofmann H.P. (Germany); BASF AG (Germany); Заявл. 27.11.1993; Опыл. 20.05.1997.
20. Potts K.T. The Chemistry of 1,2,4-Triazoles // Chem. Rev. – 1961. – 61. – P. 87-127.

**В.А. Волошина², Н.А. Литвиненко¹, И.Д. Сапегин², Г.Г. Берест¹,
С.И. Коваленко¹, А.А. Бабанин², Р.С. Синяк¹**

**ЗАПОРЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ¹
КРЫМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ С.И. ГЕОРГИЕВСКОГО²**

ГЕТЕРОЦИКЛИЗАЦИИ НА ОСНОВЕ [2-(3-R-1H-[1,2,4]ТРИАЗОЛ-5-ИЛ)ФЕНИЛ]АМИНОВ И АНГИДРИДОВ АЛКИЛДИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Резюме

Взаимодействие [2-(3-R-1H-[1,2,4]триазол-5-ил)фенил]аминов с ангидридами алкилдикарбоновых кислот в мягких условиях приводит к образованию соответствующих N-ацильных производных, а в жестких условиях – (2-R-[1,2,4]триазоло[1,5-c]хинозаолин-5-ил)алкилкарбоновых кислот. Строение синтезированных соединений подтверждено элементным анализом и спектральными методами. Изучено антигипоксическую активность некоторых синтезированных соединений в условиях моделирования ишемической гипоксии мозга в хронических экспериментах на бодрствующих кроликах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гетероциклізація, [2-(3-R-1H-[1,2,4]триазол-5-ил)фенил]аміни, ангидриды алкилдикарбоновых кислот.

**V.O. Voloschyna², M.O. Lytvynenko¹, I.D. Sapahyn², H.H. Berest¹,
S.I. Kovalenko¹, A.A. Babanin², R.S. Synyak¹**

**ZAPORIZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY¹
S.I. GEORGHIEVSKY CRIMEAN STATE MEDICAL UNIVERSITY²**

HETEROCYCLIZATION BASED ON [2-(3-R-1H-[1,2,4]TRIAZOLO-5-YL)PHENYL]AMINES AND ALKYL DICARBOXYLIC ACID ANHYDRIDES

Summary

Interaction of [2-(3-R-1H-[1,2,4]triazol-5-yl)phenyl]amines with anhydrides of alkylcarboxylic acids gives the proper N-acyl derivatives in mild conditions, and hard conditions – (2-R-[1,2,4]triazolo[1,5-c]quinazolin-5-yl)alkylcarboxylic acids. The structure of the synthesized substances was proved by element analysis and spectral data. Antihypoxic activity of some synthesized substances was investigated in the conditions of design of ischemic hypoxia of brain in chronic experiments on non-sleeping rabbit.

KEY WORDS: heterocyclization, [2-(5-R-2H-[1,2,4]triazolo-3-yl)phenyl]amines, alkyl dicarboxylic acid anhydrides.

Отримано 21.04.10

Адреса для листування: В.О. Волошина, просп. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.

О.В. Моспанова¹, І.В. Українець, О.В. Горохова, О.С. Головченко
ІНСТИТУТ ХІМІЧНИХ ТЕХНОЛОГІЙ СХІДНОУКРАЇНСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ
ВОЛОДИМИРА ДАЛЯ¹, РУБІЖНЕ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

ПОШУК АНТИМІКОБАКТЕРІАЛЬНИХ ЗАСОБІВ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДІЇ В РЯДУ ПІРИДИНІЛМЕТИЛЕНГІДРАЗИДІВ 1-R-4-ГІДРОКСИ-2-ОКСО-1,2- ДИГІДРОХІНОЛІН-3-КАРБОНОВИХ КИСЛОТ

Проведено мікробіологічний скринінг серії нових піридинілметиленгідразидів 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонних кислот. Виявлено речовини, здатні ефективно пригнічувати ріст туберкульозних та атипичних мікобактерій одночасно.

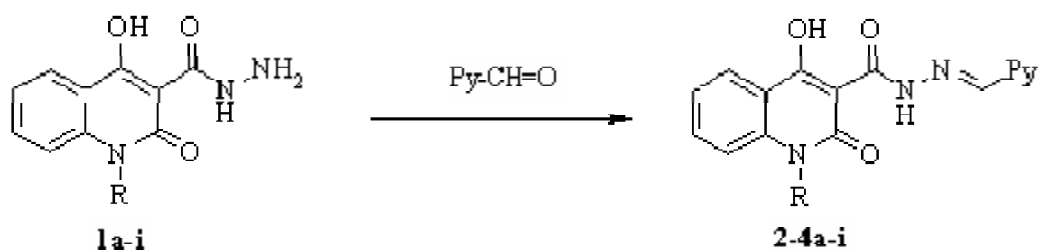
КЛЮЧОВІ СЛОВА: гідразони, 4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонні кислоти, піридин-альдегіди, антимікобактеріальна активність.

ВСТУП. Туберкульоз вважають однією з найбільш небезпечних інфекцій. За останні 20 років він перетворився в серйозну загрозу для здоров'я людей усього світу [12]. З появою хворих, що не піддаються лікуванню протитуберкульозними препаратами, ситуація ще більше загострилась. Враховуючи здатність мікобактерій швидко пристосовуватися до зовнішніх умов, причиною такого стану закономірно вважали масове розповсюдження їх лікарсько-резистентних форм. Однак при більш ретельному аналізі було виявлено, що зросла захворюваність не тільки на туберкульоз, але й на атипичні чи нетуберкульозні мікобактеріози, які, до того ж, важко розрізнити [4]. Групу збудників цих хвороб складають умовно-патогенні мікобактерії понад 40 видів, з яких найбільше значення мають представники комплексу *Mycobacterium avium* (МАК) [8]. Як правило, атипичні мікобактерії стійкі до протитуберкульозних препаратів, а лікування викликаних ними захворювань менш ефективне, ніж туберкульозу. На сьогодні вже розроблено методи діагностики, які дозволяють швидко і точно виявляти всі види мікобактерій [7]. Однак наступний етап – лікування – потребує неослабної уваги, оскільки зараз через відсутність ефективних ліків усунути проблему стає все важче. З огляду на це, пошук нових засобів боротьби з мікобактеріальними інфекціями – одне з найбільш акту-

альних завдань сучасної фармації. Причому, цілком очевидно, в ідеалі такі ліки повинні активно протистояти одночасно збудникам як туберкульозних, так і нетуберкульозних мікобактеріозів. Цікавими об'єктами дослідження для вирішення поставленого завдання є бензиліденгідразиди 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонних кислот. Висока протитуберкульозна активність, здатність певною мірою впливати і на атипичні мікобактерії, а також практично необмежені можливості до хімічних трансформацій роблять такі сполуки дуже зручною основою для подальшого цілеспрямованого синтезу речовин з покращеними біологічними властивостями.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Одним із прикладів необоротної модифікації бензиліденгідразидів 1-R-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонних кислот стали одержані в ході реакції гідразидів **1** з 2-, 3- та 4-піридинальдегідами в киплячому етиловому спирті відповідні піридинілметиленгідразиди **2-4a-i** (схема). Інтерес саме до такої трансформації продиктований тим, що вона дозволяє відстежувати вплив на антимікобактеріальні властивості досліджуваного класу сполук відразу двох факторів: заміни ароматичного бензольного кільця в азометиновій частині молекули на біозостерне йому піридиноє ядро й одночасно положення атома нітрогену в піридиновому фрагменті.

© О.В. Моспанова, І.В. Українець, О.В. Горохова, О.С. Головченко, 2010.



2-4: а R = H; б R = Me; в R = Et; г R = All; д R = Pr; е R = Bu; ж R = C₅H₁₁; з R = C₆H₁₃; і R = C₇H₁₅

Схема.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА. Антиміко-
бактеріальні властивості всіх синтезованих
нами піридинілметилєнгідразидів 1-R-4-
гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбо-
нових кислот **2-4a-i** вивчено у Національно-
му інституті алергії та інфекційних захворювань
США в межах Міжнародної програми ТААСФ
радіометричним методом [3, 5, 6, 9].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Перший
рівень випробовувань являє собою первин-
ний мікробіологічний скринінг, під час якого
всі речовини тестуються на одному штамові та в
однаковій початковій концентрації 6,25 мкг/мл.
Одержані експериментальні дані свідчать про
те, що деякі піридинілметилєнгідразиди про-
являють виражений протитуберкульозний
ефект, затримуючи ріст *Mycobacterium*
tuberculosis H37Rv ATCC 27294 на 94-100 % –
всі ці сполуки наведено в таблиці 1. Цікаво,
що, подібно до багатьох інших 4-гідрокси-2-
оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбоксамідів [2,

11], найбільш активними і в цьому випадку є
похідні з довгими (починаючи з бутильного)
замісниками при атомі нітрогену в положенні
1 хінолонового ядра. Слід все ж таки підкрес-
лити, що для піридиніл-3- та 4-ілметилєнгід-
разидів присутність великого 1-N-алкільного
фрагмента не обов'язкова – високу активність
проявляють 1-N-метильні й навіть незаміщені
похідні **3-4a,б** (табл. 1).

На другий рівень, згідно з прийнятими в
ТААСФ критеріями, переводяться тільки ті реч-
овини, які в концентрації 6,25 мкг/мл проде-
монстрували здатність гальмувати ріст міко-
бактерій туберкульозу не менше ніж на 90 %.
Спочатку визначають дійсну мінімальну інгібу-
ючу концентрацію (МІК) відібраних зразків.
Враховуючи цей показник, найбільш активни-
ми з усіх синтезованих речовин слід визнати
піридин-3- і 4-ілметилєнгідразиди 1-гексил- та
1-гептил-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-
3-карбонових кислот **3,4з-і**, оскільки їх МІК
склала 0,2 мкг/мл (табл. 1).

Таблиця 1 – МІК, цитотоксичність і протитуберкульозна дія найбільш активних піридинілме-
тиленгідразидів 2-4 на моделі уражених туберкульозом макрофагів

Спо- лука	R	Положення N в Py	Первинний скринінг*	МІК, мкг/мл	IC ₅₀ , мкг/мл	SI	EC ₉₀ , мкг/мл	EC ₉₀ /МІК
2е	C ₄ H ₉	2	99	6,25	Не розчиняється	–	–	–
2ж	C ₅ H ₁₁	2	99	6,25	10	1,6	–	–
2з	C ₆ H ₁₃	2	99	6,25	Не розчиняється	–	–	–
2і	C ₇ H ₁₅	2	99	3,13	10	3,2	–	–
3а	H	3	100	3,13	10	3,2	–	–
3б	CH ₃	3	94	6,25	6,4	1	–	–
3е	C ₄ H ₉	3	100	6,25	10	1,6	–	–
3ж	C ₅ H ₁₁	3	100	3,13	10	3,2	–	–
3з	C ₆ H ₁₃	3	99	0,2	10	50	2.0	10.0
3і	C ₇ H ₁₅	3	100	0,2	10	50	2.0	10.0
4а	H	4	100	6,25	5,4	0,9	–	–
4б	CH ₃	4	99	6,25	5,4	0,9	–	–
4ж	C ₅ H ₁₁	4	100	3,13	10	3,2	–	–
4з	C ₆ H ₁₃	4	99	0,2	10	50	2.0	10.0
4і	C ₇ H ₁₅	4	97	0,2	10	50	2.0	10.0

Примітка. * – пригнічення росту (%) *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 в концентрації 6,25 мкг/мл.

Окрім МІК, на другому рівні визначають також і цитотоксичність (IC_{50}). Випробовування проводять на *M. tuberculosis* H37Rv, концентрації речовин складають 10xМІК. Кінцеві результати наводять у вигляді індексу селективності (SI), який розраховують як співвідношення IC_{50} до МІК. Задовільними вважають сполуки, індекс селективності яких не менший 10. Цитотоксичність усіх зразків була приблизно однаковою, але з урахуванням величин МІК у цілому даний тест з 15 сполук, що залишилися після першого рівня, успішно здолали лише 4 речовини – піридин-3- та 4-ілметиленгідрозиди **3,4з-і**. Для деяких зразків цитотоксичність, на жаль, взагалі не вдалося визначити, оскільки їх розчинність у водному ДМСО виявилася надто низькою для такого дослідження.

Третій рівень вивчення антимікобактеріальної активності нових сполук за програмою ТААСФ складається з декількох етапів. По-перше, речовини випробовують на ефективність відносно мікобактерій туберкульозу, розміщених всередині клітин (тобто в макрофагах). Такі дослідження цікаві тим, що мікобактерії, які знаходяться зовні клітин, успішно пригнічуються звичайними протитуберкульозними препаратами. Однак після початку лікування часто починають переважати персистувальні форми збудника хвороби, які перебувають, головним чином, у макрофагах. Зрозуміло, що ефективно впливати на такі форми значно складніше, хоча це дуже важливо для результатів терапії в цілому, оскільки персистувальні мікобактерії швидко реверсують у вихідні форми, починають бурхливо розмножуватися і тим самим викликають загострення та рецидиви хвороби [1]. Результати досліджень наводять у вигляді EC_{90} – концентрації досліджуваної речовини, яка викликає гальмування росту мікобактерій у макрофагах на 90 %. Сполуки з EC_{90} більше 16xМІК (для зручності ці дані подають як співвідношення EC_{90} /МІК) вважають на такій моделі неактивними [10]. Аналіз наведених у таблиці 1 результатів дозволяє констатувати виражений інгібуючий вплив піридинілметиленгідрозидів **3,4з-і** на розміщені в макрофагах мікобактерії. Це вигідно відрізняє їх від багатьох відомих туберкулоstaticів, більшість з яких – ПАСК, тіоацетазон, стрептоміцин, канаміцин та ін. – взагалі не діє на внутрішньоклітинні збудники туберкульозу.

На третьому рівні мікробіологічного скринінгу вивчають також активність відібраних зразків відносно представників комплексу *M. avium*. Спочатку для дослідження використовують п'ять клінічних штамів, які відрізняються за рівнем сприйнятливості до антибіотиків. При позитивних результатах тестування роз-

ширюють і проводять уже на 30 штаммах, ізольованих з крові хворих на СНІД, і додатково на штаммах, резистентних до макролідів. Аналіз одержаних даних дозволяє однозначно стверджувати – піридинілметиленгідрозиди **3,4з-і** проявляють широкий спектр антимікробної активності відносно представників комплексу *M. avium*. Досить високі показники продемонстрували всі 4 сполуки – їх МІК складає від 2 до 4 мкг/мл, однак перевагу все ж таки слід віддати тільки одній з них, а саме піридин-4-ілметиленгідрозиду 1-гептил-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти (**4і**), оскільки він приблизно вдвічі активніший за свої структурні аналоги.

Здатність мікобактерій туберкульозу надзвичайно швидко пристосовуватися до зовнішніх умов добре відома не тільки мікробіологам. Широке застосування антибактеріальних препаратів (особливо неконтрольоване) спричиняє розвиток медикаментозної стійкості мікобактерій, яка, по суті, є одним з варіантів пристосування до несприятливих умов. Крім цього, в кожній мікробній популяції, в тому числі й мікобактеріальній, існують стійкі мутанти. Застосовувані людиною протимікробні засоби пригнічують ріст перш за все чутливих збудників, тоді як стійкі мутанти продовжують розмножуватися. Враховуючи ці особливості, третій рівень мікробіологічного скринінгу за програмою ТААСФ передбачає обов'язкове підтвердження протитуберкульозних властивостей відібраних на попередніх етапах сполук, але вже на двох штаммах: повторно на *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 і додатково на *M. tuberculosis* Erdman ATCC 35801. Крім того, визначають МІК на штаммах, стійких до одного з відомих лікарських препаратів. Як правило, це штамми, монорезистентні до ізоніазиду, рифампіцину, етамбутолу, канаміцину і ципрофлоксацину (в таблиці 2 вони позначені символом R). Одержані результати свідчать про високу протитуберкульозну активність усіх відібраних раніше сполук, хоча і тут піридин-4-ілметиленгідрозид **4і** був дещо активнішим.

Завершує третій рівень досліджень визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБК). Для цього використовують штам *M. tuberculosis* H37Rv і, крім того, декілька штамів, монорезистентних до окремих лікарських препаратів. В терапевтичних дозах бактерицидна дія притаманна лише рифампіцину, в більш високих – ізоніазиду та піразинаміду. Для інших протитуберкульозних засобів бактерицидний ефект можливий в дозах, що значно перевищують терапевтичні. З цієї причини при проведенні протитуберкульозної терапії роз-

Таблиця 2 – МІК піридинілметиленгідрозидів 3,4з-і відносно різних штамів *M. tuberculosis*

Штам <i>M. tuberculosis</i>	МІК, мкг/мл			
	3з	3і	4з	4і
H37Rv	0,2	0,2	0,2	0,1
Erdman	0,39	0,39	0,2	0,2
Ізоніазид-Р	0,39	0,39	0,39	0,2
Рифампіцин-Р	0,39	0,39	0,2	0,2
Етамбутол-Р	0,39	0,39	0,39	0,2
Канаміцин-Р	0,39	0,39	0,39	0,2
Ципрофлоксацин-Р	0,39	0,39	0,2	0,2

раховують в основному на бактеріостатичну дію, хоча більший інтерес, безумовно, викликають речовини з бактерицидним механізмом дії. Проведені експерименти показали, що МБК трьох з чотирьох піридинілметиленгідрозидів **3-4а,б**, які здолали всі попередні етапи скринінгу, як відносно *M. tuberculosis* H37Rv, так і відносно ізоніазид- та рифампіцинрезистентних штамів, дорівнює МІК або перевищує її не більше ніж у 2 рази (табл. 3). Інакше кажучи, дію піридинілметиленгідрозидів **3і**, **4з** та **4і** на мікобактерії туберкульозу можна кваліфікувати як бактерицидну.

Таким чином, є всі підстави стверджувати, що серед синтезованих нами сполук виявлено речовини, які продемонстрували високу

протитуберкульозну активність як на чутливих до відомих лікарських препаратів штамів, так і на монорезистентних культурах. При низькій цитотоксичності найбільш перспективні зразки здатні пригнічувати ріст мікобактерій туберкульозу в макрофагах, діють на них бактерицидно і, крім того, проявляють широкий спектр протимікробної активності відносно представників комплексу *M. avium*. За сукупністю всіх цих властивостей принаймні одна з досліджених речовин – піридин-4-ілметиленгідрозид 1-гептил-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонової кислоти (**4і**) – заслуговує на подальше розширене вивчення в досліджах *in vivo* як потенційний антимікобактеріальний засіб.

Таблиця 3 – МБК піридинілметиленгідрозидів 3,4з-і відносно різних штамів *M. tuberculosis*

Штам <i>M. tuberculosis</i>	3з		3і		4з		4і	
	МБК	МБК/МІК	МБК	МБК/МІК	МБК	МБК/МІК	МБК	МБК/МІК
H37Rv	> 0,78	> 4	0,39	2	0,2	1	0,2	2
Ізоніазид-Р	0,78	2	0,78	2	0,78	2	0,39	2
Рифампіцин-Р	0,78	2	0,78	2	0,2	1	0,2	1

ВИСНОВКИ. 1. Мікробіологічному скринінгу на виявлення антимікобактеріальних властивостей піддано серію нових піридинілметиленгідрозидів 1-Р-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонових кислот. При цьому експериментально встановлено, що сила біологічного ефекту досліджених сполук визначається характером замісника в

положенні 1 хінолонового циклу, а також розміщення атома нітрогену в азометинівій частині молекули.

2. За результатами проведених випробувань, одну з досліджених сполук рекомендовано для розширеного вивчення як потенційного антимікобактеріального засобу широкого спектра дії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Савула М.М., Ладний О.Я. Туберкульоз. – Тернопіль: Укрмедкнига, 1998. – 324 с.
2. Українець І.В., Петрушова Л.О., Сидоренко Л.В., Горохова О.В. Синтез та вивчення закономірностей взаємозв'язку "будова – протитуберкульозна дія" в ряду 4-арилзаміщених тіазоліл-2-амідів 1-Р-4-гідрокси-2-оксо-1,2-дигідрохінолін-3-карбонових

кислот // Журн. орган. та фармац. хімії. – 2006. – 4, № 1 (13). – С. 49-54.

3. Collins L., Franzblau S.G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* // Antimicrob. Agents Chemother. – 1997. – 41, № 5. – P. 1004-1009.

4. Esteban J., Ortiz-Perez A. Current treatment of atypical mycobacteriosis // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2009. – **10**, № 17. – P. 2787-2799.
5. 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.
6. Inderleid C.B., Nash K.A. Antimycobacterial agents: in vitro susceptibility testing, spectra of activity, mechanisms of action and resistance, and assays for activity in biological fluids // In: *Antibiotics in Laboratory Medicine* / 4-th ed. – Ed. Lorian V. – Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. – P. 127-175.
7. Ireng L.M., Walravens K., Govaerts M. et al. Development and validation of a triplex real-time PCR for rapid detection and specific identification of *M. avium* sub sp. paratuberculosis in faecal samples // *Vet. Microbiol.* – 2009. – **136**, № 1-2. – P. 166-172.
8. Pedro H.S., Pereira M.I., Goloni M.R. et al. Nontuberculous mycobacteria isolated in Sao Jose do Rio Preto, Brazil between 1996 and 2005 // *J. Bras. Pneumol.* – 2008. – **34**, № 11. – P. 950-955.
9. 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.
10. Skinner P.S., Furney S.K., Jacobs M.R. et al. A bone marrow-derived murine macrophage model for evaluating efficacy of antimycobacterial drugs under relevant physiological conditions // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1994. – **38**, № 11. – P. 2557-2563.
11. Ukrainets I.V., Grinevich L.A., Tkach A.A. et al. 4-Hydroxy-2-quinolones. 168. Synthesis, chemical and antitubercular properties of 1-R-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acid pyrazin-2-ylamides // *Chem. Heterocycl. Comp.* – 2009. – **45**, № 9. – P. 1058-1068.
12. WHO Web Site. Links for an overview of tuberculosis worldwide. <http://www.who.int/tb/en/>

Е.В. Моспанова¹, И.В. Украинец, О.В. Горохова, О.С. Головченко
 ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ВОСТОЧНОУКРАИНСКОГО НАЦИОНАЛЬНОГО УНИВЕРСИТЕТА
 ИМЕНИ ВЛАДИМИРА ДАЛЯ¹, РУБЕЖНОЕ
 НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ПОИСК АНТИМИКОБАКТЕРИАЛЬНЫХ СРЕДСТВ ШИРОКОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ В РЯДУ ПИРИДИНИЛМЕТИЛЕНГИДРАЗИДОВ 1-R-4-ГИДРОКСИ-2- ОКСО-1,2-ДИГИДРОХИНОЛИН-3-КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

Резюме

Проведен микробиологический скрининг серии новых пиридинилметиленидразидов 1-R-4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновых кислот. Выявлены вещества, способные эффективно угнетать рост туберкулезных и атипичных микобактерий одновременно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гидразоны, 4-гидрокси-2-оксо-1,2-дигидрохинолин-3-карбоновые кислоты, пиридин-альдегиды, антимикобактериальная активность.

O.V. Mospanova¹, I.V. Ukrainets, O.V. Horokhova, O.S. Holovchenko
 VOLODYMYR DAL CHEMICAL TECHNOLOGIES INSTITUTE
 OF EASTERN-UKRAINIAN NATIONAL UNIVERSITY¹, RUBIZHNE
 NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

SEARCH OF ANTIMYCOBACTERIAL AGENTS WITH WIDE SPECTRUM OF ACTION IN THE RANGE OF 1-R-4-HYDROXY-2-OXO-1,2-DIHYDROQUINOLINE-3- CARBOXYLIC ACID PYRIDINYLMETHYLENEHYDRAZIDES

Summary

The microbiological screening of 1-R-4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acid pyridinylmethylenhydrazides has been carried out. The substances, which are capable of to inhibit the growth of tuberculous and atypical mycobacteria simultaneously, have been found.

KEY WORDS: hydrazones, 4-hydroxy-2-oxo-1,2-dihydroquinoline-3-carboxylic acids, pyridine-aldehydes, antimycobacterial activity.

Отримано 22.04.10

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

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ АСПАРАГІНАТУ ЦИНКУ В ТАБЛЕТКАХ

Розроблено високочутливу методику кількісного визначення аспарагінату цинку в таблетках на основі реакції з алоксаном у середовищі диметилформаміду. Наведено статистично обґрунтовану процедуру валідації, яку проводили за схемою відповідно до ДФУ з розглядом таких параметрів, як: діапазон застосування, специфічність, лінійність, робастність, збіжність, правильність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: аспарагінат цинку, алоксан, спектрофотометрія, кількісне визначення, валідація.

ВСТУП. Препарати цинку використовують для лікування та профілактики багатьох захворювань. Це зумовлено здатністю цинку брати участь в регуляції активності більш ніж 200 ферментних систем, що регулюють основні процеси обміну в організмі [4-6].

У медичній практиці використовують різні солі цинку, зокрема й у сполучі з амінокислотами – цинк хелат.

Аспарагінат цинку являє собою цинкову сіль аспарагінової (амінобурштинової) кислоти у вигляді порошку білого кольору і використовується як сировина для виготовлення біологічно активних добавок в їжі та як мінеральна добавка до вітамінних препаратів.

З огляду на будову молекули аспарагінату цинку, можна запропонувати кількісне визначення як за вмістом катіонів цинку, так і за залишком аспарагінової кислоти. Офіційним методом визначення катіонів цинку є комплексометричне титрування [1]. В комплексних таблетованих препаратах з малою часткою цинку та великою кількістю сухого рослинного екстракту і вітамінів вміст цинку можна визначити методом атомно-абсорбційної спектроскопії [3]. Ці методи дозволяють встановити кількісний вміст аспарагінату цинку за катіоном, тоді як аніонна частина так не контролюється. Тому цікаво розробити метод кількісного визначення аспарагінату цинку за амінокислотою частиною.

Метою дослідження була розробка простої у виконанні, високочутливої, зручної та економічної спектрофотометричної методики

кількісного визначення аспарагінату цинку за реакцією з алоксаном.

Об'єктом дослідження були таблетки аспарагінату цинку, покриті оболонкою та без оболонки.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували такі реактиви та розчинники: алоксан, диметилформамід (ДМФА), розчин трилону Б (кваліфікації чда) і воду очищену (ДФУ, 1095504).

Аналітичне обладнання: спектрофотометр SPECORD 200, ваги електронні АВТ-120-5DM, мірний посуд класу В, водяна баня.

Загальна методика кількісного визначення аспарагінату цинку

Таблетки, які аналізували, розтирали в порошок. Наважку таблеткової маси, яка містила 0,0315-0,042 г аспарагінату цинку, розчиняли у воді очищеній в колбі ємністю 50 мл при нагріванні на киплячій водяній бані. Після охолодження доводили до позначки цим же розчинником з 1,00 мл розчину трилону Б, перемішували та фільтрували; перші порції фільтрату відкидали. 0,5 мл отриманого розчину з 1,5 мл ДМФА та 2 мл 7 % розчину алоксану нагрівали у пробірці на киплячій водяній бані 30 с. Реакційну суміш охолоджували та додавали 1 мл 5 % водного розчину цинку нітрату. Отриманий розчин переносили в мірну колбу ємністю 25 мл, доводили ДМФА до позначки та перемішували.

Паралельно проводили аналітичний дослід з розчином порівняння аспарагінату цинку і компенсаційним розчином, який не містив об'єкт дослідження.

Розчин порівняння. 0,014 г (точна наважка) субстанції аспарагіату цинку поміщали в мірну колбу ємністю 50 мл, розчиняли у воді очищеній з 1,00 мл розчину трилону Б, ретельно перемішуючи, доводили цим же розчинником до позначки. 0,5 мл одержаного розчину переносили в пробірку, додавали 1,5 мл ДМФА, 2 мл 7 % розчину алоксану в середовищі ДМФА, нагрівали на киплячій водяній бані 30 с, охолоджували та додавали 1 мл 5 % водного розчину цинку нітрату. Отриманий розчин переносили в мірну колбу на 25 мл і доводили ДМФА до позначки.

Оптичну густину досліджуваного розчину та розчину порівняння вимірювали на спектрофотометрі при довжині хвилі (456±2) нм у кю-

ветах з товщиною шару 1 см. Розрахунок вмісту діючої речовини проводили за типовою формулою.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В результаті попередньо проведених досліджень було встановлено, що аспарагіат цинку реагує з алоксаном за присутності розчину трилону Б при нагріванні в середовищі ДМФА з утворенням забарвленої сполуки з максимумом світлопоглинання при (456±2) нм (рис. 1). Враховуючи розчинність субстанції аспарагіату цинку, дана реакція перебігає тільки в середовищі ДМФА, а присутність значної кількості води негативно впливає на вихід забарвленого продукту.

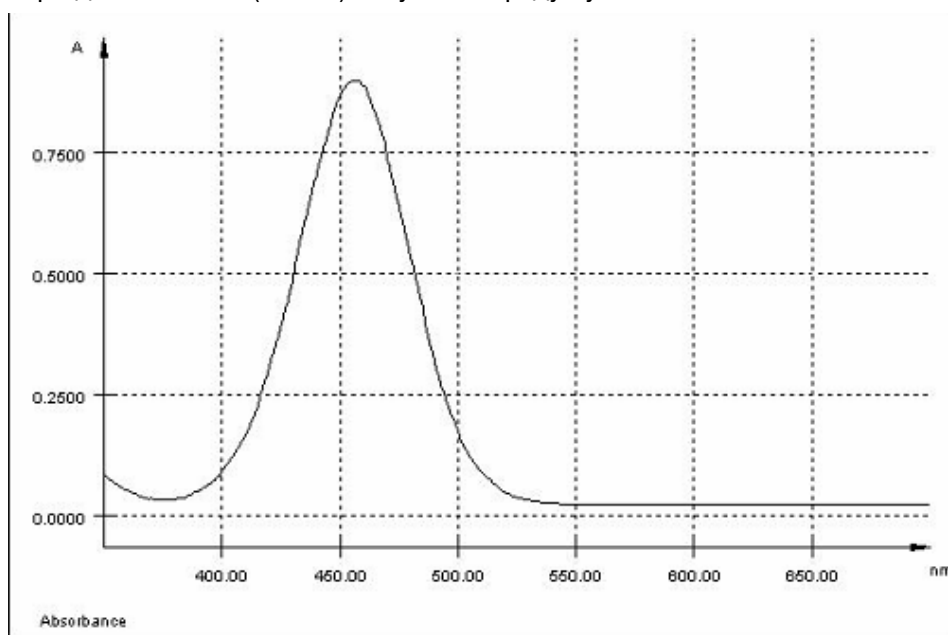


Рис. 1. Електронний спектр поглинання продукту реакції аспарагіату цинку з алоксаном.

Експериментально було встановлено, що для повноти перебігу реакції необхідне нагрівання при 100 °С на водяній бані. Оптимальна кількість реагенту, необхідна для утворення продукту з максимальним значенням величини оптичної густини, складає 2 мл, а концентрація – 7 %. Розчин алоксану використовували через 15 хв після приготування. Для стійкості забарвленого продукту в часі додавали 5 % розчин нітрату цинку (1 мл).

З отриманих результатів, наведених у таблиці 1, $\Delta_t \leq \max \delta = 0,77\%$, видно, що розчини стабільні протягом години.

Лінійна залежність оптичної густини від концентрації аспарагіату цинку спостерігається в межах концентрацій 0,24-0,32 мг/100 мл, для яких виконується підпорядкування закону Бера (рис. 2). Основні параметри лінійної залежності, а також значення молярного показника поглинання та відкритого мінімуму наведено в таблиці 2.

Таблиця 1 – Результати вивчення стабільності досліджуваного розчину та розчину порівняння

t, хв, A _t							Середнє	RSD _t %	Δ _t %	maxδ,%
0	20	40	60	80	100	120				
0,8082	0,8078	0,8070	0,8072	0,8069	0,8065	0,8062	0,8071	0,0009	0,002	0,77
0,8067	0,8070	0,8072	0,8069	0,8065	0,8063	0,8064	0,8067	0,0003	0,001	

Таблиця 2 – **Оптичні характеристики та основні параметри лінійної залежності реакції аспарагіату цинку з алоксаном**

Оптична характеристика	Основний параметр
Молярний показник поглинання	738,20
Відкриваний мінімум	22 мкг/мл
Рівняння лінійної регресії	$Y=bX+a$
Кутовий коефіцієнт $b \pm (S_b)$	$0,9986 \pm (0,0059)$
Вільний член лінійної регресії $a \pm (S_a)$	$0,15 \pm (0,5938)$
Стандартне відхилення S	0,2281
Коефіцієнт кореляції r	0,99988

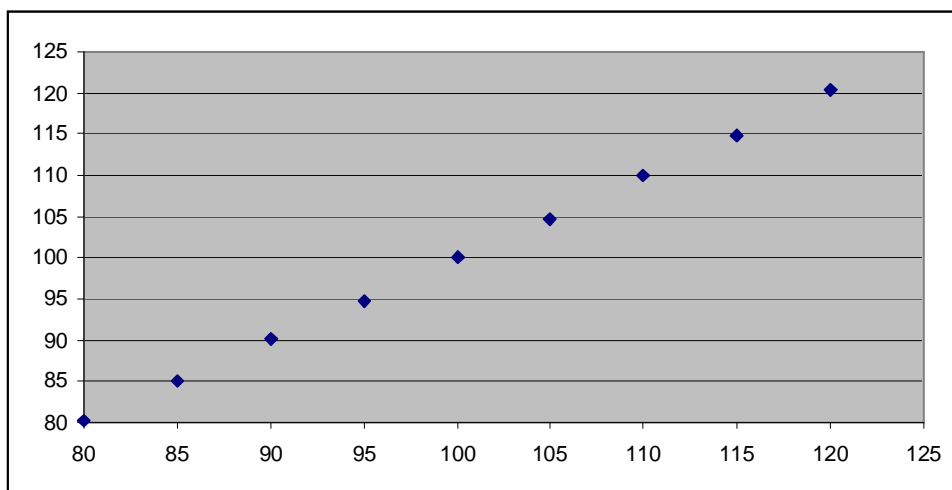


Рис. 2. Залежність оптичної густини від концентрації аспарагіату цинку в нормалізованих координатах

Таким чином, виконуються всі вимоги щодо параметрів лінійної залежності, тобто лінійність методики підтверджується у всьому діапазоні концентрацій.

Результати кількісного визначення аспарагіату цинку в таблетках наведено в таблиці 3.

Діапазон застосування (range) аналітичної методики. Згідно з вимогами ДФУ для кількісного визначення, було обрано діапазон застосування методики від 80 до 120 % [1].

Невизначеність аналітичної методики. Розрахунок критеріїв прийнятності методики аналізу: максимально допустимої повної невиз-

наченості – $\max \Delta_{as} = 2,40 \%$, яка пов'язана із симетричними допусками вмісту $\pm 7,5 \%$ [1], максимальної систематичної похибки – $\max \delta = 0,77$, вкладу плацебо в сумарну величину фонового поглинання 0,0284, критичного значення для залишкового стандартного відхилення – $RSD_o \% = \max \Delta_{as} / t(95, n-2) = 0,98$, індексу кореляції – $R_c = 0,99571$ і практичної невизначеності вільного члена лінійної залежності – $a = 3,8$ [2].

Правильність результатів встановлювали в 3 модельних сумішах різної концентрації. Отримані дані наведено в таблиці 4.

Таблиця 3 – **Результати аналізу таблеток з аспарагіатом цинку**

Назва лікарської форми	Проба, яку аналізують, г	Знайдено, г, у перерахунку на середню масу таблетки	Вміст аспарагіату цинку згідно з Державною Фармакопеею України, г
Таблетки, покриті оболонкою, по 0,05 г	Наважка таблеткової маси, 0,0315-0,042	0,0464-0,0495	0,04625-0,05375
Таблетки, не покриті оболонкою, по 0,05 г	Наважка таблеткової маси, 0,0234-0,0312	0,0473-0,0514	

Таблиця 4 – **Результати перевірки правильності методики**

Модельний розчин	Z	RSD	Δ_z	Z – 100
	100,01	0,205	0,3813	0,01

Таким чином, методика є коректною та правильною, оскільки критерій невизначеності не перевищує свій довірчий інтервал.

Прогноз повної невизначеності методики.

Прогноз повної невизначеності пробопідготовки.

Розрахунки проводили, використовуючи формулу АНД, а також підхід і невизначеності мірного посуду та процедури спектрофотометрування. Результати обрахунків наведено в таблиці 5.

Таким чином, прогнозована невизначеність пробопідготовки – $\Delta_{sp}=2,13\%$, сумарна невизначеність аналітичної методики кількісного визначення – $\Delta_{As}=\sqrt{\Delta_{sp}^2 + \Delta_{FAO}^2}=2,24\%$,

а повна невизначеність результатів не перевищує $\Delta_{As}=1,35\% \leq \max \Delta_{As}=2,24\%$, критичного значення 2,24 %.

Таблиця 5 – **Розрахунок невизначеності пробопідготовки для тесту “Кількісне визначення”**

Операція пробопідготовки	Параметр розрахункової формули	Невизначеність
Розчин порівняння		
Взяття наважки аспарагінату цинку	m_0	0,0002/0,014·100 %=1,43 %
Доведення до об'єму в мірній колбі 50 мл	50	0,17 %
Взяття аліквоти піпеткою 0,5 мл	0,5	1 %
Доведення до об'єму в мірній колбі 25 мл	25	0,23 %
Аналізований розчин		
Взяття наважки таблеткової маси	m_1	(0,0002/0,0347)·100 %=0,58 %
Доведення до об'єму в мірній колбі 50 мл	50	0,17 %
Взяття аліквоти піпеткою 0,5 мл	0,5	1 %
Доведення до об'єму в мірній колбі 25 мл	25	0,23 %

ВИСНОВКИ. 1. Розроблено високочутливу методику кількісного визначення аспарагінату цинку в таблетках на основі реакції з алоксаном.

2. Здійснено валідацію методики кількісного визначення аспарагінату цинку відповідно до вимог ДФУ.

3. Встановлено, що методика валідна та відповідає вимогам ДФУ за специфічністю, лінійністю, точністю та робастністю, а отже, може застосовуватись для кількісного визначення аспарагінату цинку в таблетках.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гризодуб А.И., Леонтьев Д.А., Денисенко Н.В. и др. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 1-15.
 2. Державна Фармакопея України. – Х.: ПІРЕГ, 2004. – Доп. 1. – С. 85-100.
 3. Коваль В.М., Вронська Л.В. Ідентифікація і кількісне визначення цинк аспарагінату в багатокомпонентному лікарському засобі // Мед. хімія. – 2009. – 11, № 1. – С. 75-79.

4. Bor N.M. Zinc and copper deficiency in patients with allergic diseases and treatment with zinc sulfate-preliminary report // New Istanbul Contribution to Clinical Science. – 1980. – 13. – P. 58-59.
 5. Cunningham-Rundles S. Physiological and Pharmacological effects of zinc on immune response // Ann. NY Acad. Sci. – 1990. – 587. – P. 113-122.
 6. Produktion of Zinc Tablets and Zinc Oral Solutions. Guidelines for Programmer Managers and Pharmaceutical Manufacturers. – World Health Organization. – Geneva, 2006. – 36 p.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АСПАРАГИНАТА ЦИНКА В ТАБЛЕТКАХ

Резюме

Разработана высокочувствительная методика количественного определения аспарагината цинка в таблетках на основе реакции с аллоксаном в среде диметилформамида. Приведена статистически обоснованная процедура валидации, которую осуществляли по схеме согласно ГФУ с рассмотрением таких параметров, как: диапазон применения, специфичность, линейность, робастность, сходимость, правильность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аспарагинат цинка, аллоксан, спектрофотометрия, количественное определение, валидация аналитической методики.

V.M. Koval

M.I. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE QUANTITATIVE DETERMINATION METHOD OF THE ASPARAGINATE ZINC IN TABLETS

Summary

The method of quantitative spectrophotometric identification of Asparaginate zinc tablets is worked out. This method is based on the interaction preparation reaction with aloxanum. This method is sufficient sensitive. Statistical motivated procedure of the validation is brought. The validation of the analytical methods held at scheme, which is specified in SPU; the following parameters were considered: range of application, specificity, linearity, exactness, accuracy, robustness, convergence of the results.

KEY WORDS: asparaginatium zinc, aloxanum, spectrophotometric method, quantitative determination, validation of the analytical method.

Отримано 06.07.10

Адреса для листування: В.М. Коваль, Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21029, Україна.

**МОРФОЛОГІЧНИЙ КОНТРОЛЬ ЕФЕКТИВНОСТІ ЛІКУВАННЯ
ФОРМАЛІНОВОГО ПРОКТИТУ СУПОЗИТОРІЯМИ “ЛІПРОПРОСТ”**

Наведено результати дослідження ефективності супозиторіїв “Ліпропрост” при експериментальному формаліновому проктіті. Гістоморфологічне вивчення слизової оболонки прямої кишки в щурів із проктітом показало, що супозиторії “Ліпропрост” і “Просталін” ефективні при лікуванні формалінового проктіту.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: проктіт, формалін, лейкоцитоз, ефективність.

ВСТУП. Проблеми проктології набули великої актуальності наприкінці ХХ століття, оскільки стали частою причиною тривалої непрацездатності та інвалідизації людей як літнього, так і молодого віку [1, 2, 6, 9, 13, 17, 19].

Сьогодні спостерігається зростання інтересу клініцистів і фармакологів до проблем проктології, бо, згідно зі статистичними даними, захворювання прямої кишки мають тенденцію до збільшення. За останні десятиліття захворюваність на рак прямої кишки зросла на 16,2 %, а на неспецифічні коліти і проктіти – на 45 % [1, 3-5, 7, 14].

Розробка нових методів лікування даної нозологічної групи хвороб є дуже важливою проблемою. Вона зумовлена тим, що лікування запальних захворювань прямої кишки одночасно є основним методом профілактики раку. Згідно зі статистичними даними, рак прямої та ободової кишок почав зустрічатися частіше, ніж рак шлунка [12, 14, 20].

Незважаючи на те, що серед методів лікування в проктології переважають хірургічні, велика кількість запальних захворювань прямої кишки потребує консервативного лікування [10, 11]. Особливу увагу в останні 5 років приділяють консервативній терапії з додаванням комплексів природного походження, вітамінам і, особливо, продуктам бджільництва [16, 18].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Формаліновий проктіт викликали шляхом дворазового, через день, введення 15 % розчину формаліну в пряму кишку на глибину 1,5 см. Експерименти виконували на нелінійних щурах масою (180,0±20,0) г, яких утримували за стандартних умов віварію при сталій температурі й во-

логості повітря з вільним доступом до води та їжі. Усі маніпуляції, що спричиняють біль, проводили під етамінал-натрієвим наркозом (60 мг/кг підшкірно) згідно з міжнародними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986).

Лікування починали, згідно з методикою, через 24 год. Експеримент тривав 10 днів. На 10-й день експерименту після евтаназії тварин контрольної та експериментальних груп проводили оцінку стану слизової оболонки за зовнішніми параметрами (некроз, довжина ураженої ділянки, кількість точкових крововиливів) та її біохімічне дослідження. Ефективність лікування проктіту контролювали шляхом гістоморфологічного вивчення слизової оболонки прямої кишки на 3-й, 5-й і 7-й дні лікування. Щурів було поділено на 4 групи (група інтактних тварин, контрольна група – проктіт без лікування, експериментальна група – тварини, яких лікували супозиторіями “Ліпропрост” і група порівняння – щури, яких лікували супозиторіями “Просталін”). Матеріал для мікроскопічного дослідження фіксували в 10 % нейтральному формаліні. Після спиртової проводки шматочки тканини заливали у парафін з перпендикулярним орієнтуванням ділянки стінки прямої кишки. Зрізи товщиною 5-6 мкм фарбували гематоксилін-еозином, Шифф-йодною кислотою (ШИК-реакція) [8, 15].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати дослідження показали, що в групі контрольної патології на 3-тій, 5-ту, 7-му доби після пошкодження мав місце гострий деструктив-

© М.Є. Березнякова, Т.В. Аверіна, 2010.

ний проктит з поступовим відновленням цілісності слизової оболонки. У локусах незначного пошкодження слизової оболонки повну регенерацію спостерігали вже на 3-тю добу. В локусах некрозу слизова оболонка гинула аж до ділянки дна крипт (де розміщуються і діляться епітеліальні клітини), починав формуватися шар грануляційної тканини, який на 7-му добу вже частково покритий низьким одношаровим епітелієм. У цій групі, ймовірно, процес загибелі епітеліоцитів є пролонгованим, тому що навіть на 5-ту добу можна було побачити руйнування крипт з безліччю еозинофілів, що оточують її. У ділянках з регенованими криптами їх кількість знижена порівняно з інтактними тваринами, поверхневий епітелій розміщений менш щільно, висота його менша, ніж в інтактних тварин, а у власній пластинці слизової оболонки або зберігався лейкоцитарний інфільтрат з великою частиною еозинофілів, або формувався склероз.

У ділянках з регенеруючими криптами і збереженими ерозіями спостерігали значну лейкоцитарну інфільтрацію власної пластинки слизової оболонки. Повна загибель крипт у групі порівняння призвела до утворення шару грануляційної тканини, частково покритого одним шаром епітеліоцитів. При лікуванні розвиненого гострого проктиту супозиторіями "Просталін" з їх імуностимулювальним і репаративним ефектами (група порівняння) звертали увагу на те, що на 3-тю добу лікування регеновані невеликі пошкодження слизової оболонки мали високий, "соковитий" поверхневий епітелій. Однак ще зустрічалися невеликі локуси некрозу слизової оболонки, не покриті грануляційною тканиною. У локусах, де відбувалася повна регенерація слизової оболонки, на 5-ту добу лікування ще мали місце невеликі сплюснені дефекти (ерозії). На 7-му добу в тканинах стінки прямої кишки спо-

стерігали в основному повну регенерацію слизової оболонки з невеликими ділянками ерозій. Надалі регенерація в цій групі відбувалася також більш успішно, ніж у групі контролю, причому відновлення слизової оболонки випереджало усунення ознак запалення в м'язовій оболонці й параректальній клітковині. Саме в цих ділянках зберігався лейкоцитарний інфільтрат власної пластинки слизової оболонки. Привертали увагу більш щільне розміщення крипт і велика їх довжина в регенованій слизовій оболонці порівняно з такою в групі контролю (слизова оболонка в групі порівняння після регенерації товстіша, ніж у групі контролю). Судини власної пластинки слизової оболонки повнокровні, а сама пластинка досить густо інфільтрована макрофагами, лімфоцитами, еозинофілами. До 5-ї доби слизова оболонка регенерувала, продукція муцину інтенсифікована, він яскраво ШИК-позитивний. Власна пластинка слизової оболонки в поверхневому шарі більш густо інфільтрована, ніж у її глибині. В основній групі експерименту на 3-тю добу в жодному разі не зазначено наявності ділянок не тільки тотального некрозу слизової оболонки, але й більш чи менш істотного дефекту. Поверхневі епітеліоцити мали темні ядра і щільну цитоплазму з високим вмістом глікопротеїдів. У криптах – збільшена кількість келихоподібних клітин. На 7-му добу лікування супозиторіями "Ліпропрост" слизова оболонка прямої кишки ще мала лейкоцитарний інфільтрат, але ступінь його вираження менший, ніж у попередні дні. Зустрічалися поодинокі лімфоїдні фолікули, вони були великими, багатоклітинними.

ВИСНОВОК. Гістоморфологічне вивчення слизової оболонки прямої кишки підтвердило ефективність супозиторіїв "Ліпропрост" при лікуванні формалінового проктиту.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ашурков М.Г. Диагностика и распространенность проктологических заболеваний // Доктор. – 1997. – № 1. – С. 64-67.
2. Ветров П.П., Носовская Т.Д., Гарная С.В. и др. Новые технологии получения и применения биологически активных веществ // Тезисы докладов. – Симферополь: Изд-во КНЦ, 2002. – С. 68-70.
3. Давыдов М.Н., Аксель Е.Н. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ (состояние онкологической помощи, заболеваемость и смертность. – М., 2002. – 45 с.

4. Золотухін С.Е. Розповсюджений рак прямої кишки. Шляхи підвищення ефективності лікування: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Донецький держ. мед. університет. – Донецьк, 2005. – 35 с.
5. Кондратюк Н.А., Дмитрієвський Д.І. Супозиторії – раціональна лікарська форма для лікування проктологічних захворювань // Сьогоднішня та майбутня фармація: Тез. доп. Всеукр. конгр. (16-19 квітня 2008 р., м. Харків). – Х.: Вид-во НФаУ, 2008. – С. 275.
6. Кондратюк Н.А., Мошиц В.Ф., Дмитрієвський Д.І. Лікарські засоби, представлені на фармацевтично-

му ринку України, що застосовуються для лікування проктологічних захворювань (огляд) // Фармаком. – 2007. – № 1. – С. 103-108.

7. Котешева И.А. Заболевания кишечника. Лечение и профилактика. – М.: ЭКЕМО-Пресс, 2004. – 314 с.

8. Луппа Х. Основы гистохимии / Под ред. Н.Т. Райхлина. – М.: Мир, 1980. – 343 с.

9. Масляк В.М., Павловський М.П., Лозинський Ю.С., Варивода І.М. Практична колопроктологія. – Львів: Світ, 1993. – 140 с.

10. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. – М.: ООО “Издательство Новая Волна”, 2002. – Т. 1. – С. 292; 172; 310.

11. Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. – Элиста: АПП “Джангар”, 1998. – 250 с.

12. Пирс Э. Гистохимия. – М.: Иностранная литература, 1962. – 962 с.

13. Савранский В.М., Абдулаев Э.Н. Советы проктолога. – 2001. – 189 с.

14. Семионкин Е.И. Колопроктология: Учебное пособие. – М.: МЕДПРАКТИКА, 2004.

15. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Основные фармакологические эффекты и дозы // Элементы экспериментальной фармакологии. – М., 2000. – С. 192.

16. Тихонов А.И., Азаренко Ю.Н. Современные принципы терапии проктологических заболеваний // Провизор. – 1999. – № 9. – С. 37-38.

17. Хворостинка В.М., Фещенко І.О., Сокрыто О.В. Характеристика імунних порушень на хронічний коліт та можливості їхньої медикаментозної корекції // Сучасна гастроентерологія. – 2004. – № 6. – С. 58-61.

18. Яковлева Л.В., Авдеева І.І. Лікування експериментального проктиту супозиторіями “Пропофен” // Клінічна фармація. – 2000. – 4, № 2. – С. 46-50.

19. Kumar С.М., Bellamy M. Gastrointestinal and Colorectal Anesthesia. – USA: Informa, 2007. – P. 103.

20. Sands L.R., Sands D.R. Ambulatory Colorectal Surgery. – USA: Informa, 2009. – P. 96-126.

М.Е. Березнякова, Т.В. Аверина

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ФОРМАЛИНОВОГО ПРОКТИТА СУППОЗИТОРИЯМИ “ЛИПРОПРОСТ”

Резюме

Представлены результаты исследования эффективности суппозиториев “Липропрост” при экспериментальном формалиновом проктите. Гистоморфологическое изучение слизистой оболочки прямой кишки у крыс с проктитом показало, что суппозитории “Липропрост” и “Просталин” эффективны при лечении формалинового проктита.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: проктит, формалин, эффективность.

M.Ye. Bereznyakova, T.V. Averina

NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

MORPHOLOGICAL CONTROL OF TREATMENT EFFECTIVENESS OF THE FORMALIN PROCTITIS BY SUPPOSITORIES “LIPROPROST”

Summary

The results of efficiency of suppository “Liproprost” has been presented at experimental formalin proctitis. Histomorphological study of mucous membrane of rectum in rats with proctitis has proved that suppositories “Liproprost” and “Prostalin” are effectual at treatment of formalin proctitis.

KEY WORDS: proctitis, formalin, leukocytosis, efficiency.

Отримано 09.04.10

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

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДУБИЛЬНИХ РЕЧОВИН У РОСЛИННІЙ
СИРОВИНІ, СУБСТАНЦІЯХ ТА ЛІКАРСЬКІЙ ФОРМІ**

Визначено кількісний вміст дубильних речовин методом перманганометрії у траві парила звичайного, траві плакуна іволистого, листі чаю китайського, плодах анісу зірчастого і траві гадючника в'язолистого, субстанціях на їх основі та лікарській формі. Найменший вміст дубильних речовин спостерігали у плодах та екстракті анісу зірчастого.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: лікарська рослинна сировина, сухі екстракти, тверді капсули, перманганометричний метод.

ВСТУП. В останні десятиріччя у різних країнах збільшується попит на лікарські рослини. Багатовіковим досвідом було відібрано чималу кількість рослин та їх комбінацій з лікувальною і профілактичною діями при певних захворюваннях [8]. Тому разом із пошуком нових лікарських рослин проводять поглиблене вивчення хімічного складу сировини, яку традиційно використовують у медицині. Найбільш поширеною та вивченою групою біологічно активних речовин (БАР) лікарських рослин є поліфенольні сполуки, а саме: дубильні речовини, флавоноїди, фенолкарбонові кислоти, фенілпропаноїди тощо [5, 6]. Відомо чимало лікарських рослин, які є джерелами дубильних речовин [8-11, 13]. Найбільшу кількість видів рослин з найвищим вмістом дубильних речовин відмічено в родинях Fabaceae, Anacardiaceae, Rosaceae, Polygonaceae, Asteraceae, Labiatae, Salicaceae, Myrtaceae тощо [3].

Тому для даної лікарської рослинної сировини (ЛРС) обґрунтованим є проведення стандартизації за вмістом дубильних речовин [1, 5, 12-14].

На даний час відомо чимало способів кількісного визначення дубильних речовин, які можна поділити на групи, а саме: гравіметричні – основані на кількісному осадженні дубильних речовин желатиною, іонами важких металів тощо; титриметричні – основані на реакціях окиснювання, насамперед із застосуванням калію перманганату [2]; фотометричні – основані на реакціях із солями заліза (III), кислотою фосфорно-вольфрамовою, реактивом Фоліна–Деніса [7]; комплексометрія.

Фармакопейним методом кількісного визначення дубильних речовин є перманганато-

метричний метод – метод Левенталєя [2]. Він традиційний та найбільш поширений для кількісного визначення дубильних речовин. При проведенні дослідження слід враховувати ряд особливостей методу: здатність калію перманганату окиснювати інші групи фенольних сполук, які належать до різних класів за хімічною будовою; розтягнутість переходу забарвлення при титруванні тощо.

Метою даного дослідження було визначення кількісного вмісту дубильних речовин методом перманганометрії в лікарській рослинній сировині, субстанціях на її основі та лікарській формі.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом даного дослідження була ЛРС: трава парила звичайного (*Agrimonia eupatoria* L.), трава плакуна іволистого (*Lythrum salicaria* L.), листя чаю китайського (*Camellia sinensis* L.), плоди анісу зірчастого (*Illicium verum* Hook L.) і трава гадючника в'язолистого (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.); отримані з неї сухі екстракти; тверда лікарська форма у вигляді капсул.

Для визначення кількісного вмісту дубильних речовин в сировині отримували водні витяжки.

Сухі екстракти отримували за загальною схемою: 300,0 г подрібненої повітряно-сухої сировини просіювали крізь сито з діаметром отворів 3-5 мм, вміщували в екстрактор. Екстракцію вели гарячою водою у співвідношенні сировина–екстрагент 1:10 при температурі 70-80 °С протягом 1,5-2 год двічі. Отримані витяжки об'єднували, фільтрували і концентрували у вакуум-випарному апараті при температурі 50-60 °С і тиску 80-87 кПа до густої консистенції. Одержані густі екстракти висушували до сухих у вакуумній сушильній шафі при температурі 100-120 °С і тиску 80-87 кПа до залишкового вмісту вологи не більше 5 % [4].

Отримані сухі екстракти входили до складу твердих желатинових капсул. Технологічний процес одержання капсул мав такі етапи. Спочатку просіювали та зважували всі інгредієнти. У змішувачі перемішували підготовлені допоміжні компоненти (лактоза, стеарат кальцію) та додавали до них сухі екстракти трави парила звичайного, трави плакуна іволистого, листя чаю китайського, плодів анісу зірчастого і трави гадючника в'язолистого. Все ретельно перемішували. Отриману масу засипали у тверді желатинові капсули (№ 3) та знепилювали. Одержані капсули, що мали масу 0,3 г, фасували у пластикові контейнери. Капсули – тверді лікарські засоби з твердою оболонкою, що складаються з двох попередньо виготовлених частин циліндричної форми, один кінець кожної частини заокруглений і закритий, а інший відкритий [4].

При визначенні дубильних речовин у сухих екстрактах та капсулах використовували наважку 0,5 г екстракту (точна наважка) та вміст однієї капсули, розчиняли у воді очищеній

в мірній колбі місткістю 100 мл. Для аналізу застосовували аліквотну частину (10 мл).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані сухі екстракти характеризували відповідно до вимог ДФУ за такими показниками: *опис* – однорідний порошок рослинного походження від коричневого до темно-бурого кольору з білого кольору допоміжними речовинами у твердих желатинових капсулах; *запах* – специфічний, зумовлений наявністю рослинної сировини; сторонні запахи цвілі не дозволяються; *смак* – специфічний, зумовлений наявністю рослинної сировини; сторонні присмаки цвілі не дозволяються.

Результати кількісного визначення дубильних речовин у досліджуваних об'єктах наведено в таблиці 1.

Серед об'єктів ЛРС найбільший вміст дубильних речовин мали листя чаю китайського (27,23 %), трава гадючника в'язолистого і плакуна іволистого (14,87 і 14,35 % відповідно). Найменший вміст дубильних речовин встановлено у плодах анісу зірчастого (7,34 %).

Таблиця 1 – Кількісне визначення дубильних речовин у сировині, субстанціях та лікарській формі

Об'єкт дослідження		Вміст дубильних речовин, %
<i>Парило звичайне</i> (<i>Agrimonia eupatoria</i> L.)	трава	7,83±0,54
	сухий екстракт	19,4±0,79
<i>Плакун іволистий</i> (<i>Lythrum salicaria</i> L.)	трава	14,35±0,53
	сухий екстракт	28,4±1,38
<i>Гадючник в'язолистий</i> (<i>Filipendula vulgaris</i>)	трава	14,87±0,54
	сухий екстракт	33,29±0,79
<i>Чай китайський</i> (<i>Camellia sinensis</i> L.)	листя	27,23±0,99
	сухий екстракт	35,29±2,07
<i>Аніс зірчастий</i> (<i>Illicium verum</i> Hook L.)	плоди	7,34±0,19
	сухий екстракт	8,32±0,79
Капсули з рослинними екстрактами		0,3112±0,01 г

Аналогічна закономірність кількісного вмісту дубильних речовин спостерігалась і в сухих екстрактах, отриманих із ЛРС. Відповідно до вмісту дубильних речовин в екстрактах було розраховано їх співвідношення у капсулах. Вміст дубильних речовин у капсулах, за вимогами ДФУ, виражений у грамах і складав 0,3112 г. Отримана величина кількісного вмісту відображає теоретично прогнозований вміст дубильних речовин у капсулах. На основі одержаних даних розраховано профілактичне та лікувальне дозування засобу в медичній практиці.

ВИСНОВКИ. 1. Отримано сухі екстракти із ЛРС: трави парила звичайного, трави плакуна іволистого, листя чаю китайського, плодів анісу зірчастого і трави гадючника в'язолис-

того методом мацерації двократною водною екстракцією до залишкового вмісту вологи не більше 5 %.

2. Визначено кількісний вміст дубильних речовин у ЛРС та сухих екстрактах. Серед досліджуваних об'єктів найбільший вміст дубильних речовин спостерігався у листі (27,23 %) та сухому екстракті (35,29 %) чаю китайського, траві (14,87 %) та сухому екстракті (33,29 %) гадючника в'язолистого, траві (14,35 %) та сухому екстракті (28,4 %) плакуна іволистого.

3. Визначено кількісний вміст дубильних речовин у капсулах. Середнє значення при визначенні у 20 капсулах складало 0,3112 г. На основі отриманих даних розраховано профілактичне та лікувальне дозування засобу в медичній практиці.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Георгієвський В.П. Проблема стандартизації фітохімічних препаратів: шляхи та методи її розв'язання / В.П. Георгієвський, Ю.В. Подпрудников, О.І. Гизодуб // Тези доп. I Конгр. Світ. Федер. укр. фарм. Товариств. – Львів, 1994. – С. 187-188.
2. Государственная Фармакопея СССР : Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М. : Медицина, 1987. – 336 с.
3. Государственная Фармакопея СССР : Вып. 2. – 11-е изд., доп. – М. : Медицина, 1989. – 257 с.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Х. : РІРЕГ, 2001. – 556 с.
5. Куркин В.А. Современные аспекты химической классификации биологически активных соединений лекарственных растений / Куркин В.А. // Фармация. – 2002. – № 2. – С. 8-16.
6. Некоторые аспекты изучения биологически активных веществ и фармакологических свойств лекарственных растений / В.Д. Белоногова, Н.С. Корепанова, Г.И. Олешко [и др.] // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2003. – № 4. – С. 16-20.
7. Спектрофотометричне визначення дубильних речовин у корі дуба / Н.В. Хохленкова, Т.Г. Ярних, В.М. Чушенко, М.В. Буряк // Фармац. часопис. – 2008. – № 3. – С. 10-12.
8. Ярних Т.Г. Вибір оптимальних технологічних параметрів отримання густого екстракту з кори дуба / Т.Г. Ярних, Н.В. Хохленкова, В.М. Чушенко // Вісник Фармації. – 2007. – № 3 (51). – С. 27-29.
9. Antibacterial and free radical scavenging activity of the seeds of *Agrimonia eupatoria* / A. Copland, L. Nahar, C.T.M. Tomlinson [et al.] // Fitoterapia. – 2003. – 74, № 1-2. – P. 133-135.
10. Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants *Agrimonia eupatoria*, *Salvia* sp. and *Satureja montana* / Maria S. Giau, Claudia I. Pereira, Susana C. Fonseca [et al.] // Food Chemistry. – 2009. – 117. – P. 412-416.
11. European Pharmacopoeia, Edn. 2004. Strasbourg. Council of Europe. – 2570 p.
12. Ramarethinam S. Standardization of conditions for effective clarification and concentration of green tea extract by membrane filtration / S. Ramarethinam, G. R. Anitha, K. Latha // Journal of Scientific and Industrial Research. – 2006. – 65. – P. 821-825.
13. Saint-Cricq de Gaulejac N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods / N. Saint-Cricq de Gaulejac, C. Provost, N. Vivas // J. Agric. Food Chem. – 1999. – 47, № 2. – P. 425-431.
14. Standardized extracts of Chinese medicinal herbs: case study of Danshen / Junhui Chen, Frank Sen-Chun Lee, Lei Li [et al.] // Journal of Food and Drug Analysis. – 2007. – 15, № 4. – P. 347-364.

А.С. Напрасникова, И.Н. Владимирова, В.А. Георгианц
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ, СУБСТАНЦИЯХ И ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

Резюме

Определено количественное содержание дубильных веществ методом перманганатометрии в траве репейника обыкновенного, траве дербенника иволистого, листьях чая китайского, плодах аниса звездчатого и траве лабазника вязолистого, субстанциях на их основе и лекарственной форме. Наименьшее содержание дубильных веществ установлено в плодах и экстракте аниса звездчатого.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лекарственное растительное сырьё, сухие экстракты, твёрдые капсулы, перманганатометрический метод.

H.S. Naprasnikova, I.M. Vladymyrova, V.A. Heorhiyants
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

QUANTITATIVE DETERMINATION OF TANNINS IN HERBAL, SUBSTANCES AND IN MEDICINAL FORM

Summary

The quantitative contents of tannins by permanganatometry in herbal of the Agrimony, in herbal of the Loosestrife, in tea leaves of the Chinese, in the fruits of the *Illicium verum* Hook L. and in herbal of the *Filipendula vulgaris*, substances on their basis and in medical form has been determined. The lowest content of tannins has been observed in the fruit and dry extract of the *Illicium verum* Hook L.

KEY WORDS: herbal drugs, dry extracts, hard capsules, permanganatometry.

Отримано 17.06.10

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

РОЛЬ МІТОХОНДРІЙ У ПОШКОДЖЕННІ ДНК ЗА АПОПТОЗУ

Здійснено аналіз літературних даних щодо участі мітохондрій у механізмах фрагментації ДНК за апоптозу. Внаслідок підвищення проникності мембран цих органел під дією різних індукторів апоптозу відбувається вивільнення з мітохондрій у цитозоль апоптогенних молекул (цитохрому с, білків Smac/Diablo та Omi/HtrA2, фактора індукції апоптозу AIF, ендонуклеази G) та запускається каскад протеолітичних реакцій, що призводять до порушення структурної організації хроматину, фрагментації ДНК, внаслідок чого реалізується програма загибелі клітини.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мітохондрії, фрагментація ДНК, апоптоз, цитохром с, Smac/Diablo, Omi/HtrA2, AIF, ендонуклеаза G.

Під дією як зовнішніх фізіологічних (фактори росту, цитокіни, гормони), так і нефізіологічних (гіпоксія, оксидативний стрес, іонізуюча радіація, ксенобіотики та ін.) [2, 6, 7, 10, 26, 58] чинників у клітині активуються біохімічні програми відповіді, які сформувалися у процесі еволюції живих систем та забезпечують адаптацію клітинних популяцій до нових умов. Проведення регуляторних сигналів у відповідь на дію різних факторів, яке відбувається з участю транскрипційних факторів, продуктів генної експресії, інгібіторів та активаторів біохімічних реакцій, завершується реалізацією одного з трьох типів програмованої відповіді клітин: зміна темпу проліферації, вступ на шлях диференціювання та загибель клітин за програмою апоптозу чи шляхом некрозу. Основним механізмом підтримання гомеостазу тканин як за фізіологічних, так і за патологічних умов є апоптоз, який характеризується конденсацією хроматину, фрагментацією ДНК, руйнуванням цитоскелета та утворенням апоптичних тілець [1, 9, 50, 57]. Розщеплення хроматину за апоптозу – це багатоступінчастий процес, що розпочинається великомасштабною фрагментацією ДНК, яка збігається в часі з проявом ранніх морфологічних ознак апоптозу та завершується накопиченням олігонуклеосомних фрагментів і утворенням апоптичних тілець [8, 22, 38, 59].

Пошкодження хроматину за дії апоптогенних чинників зумовлене не тільки структурно-функціональними порушеннями в ядрі, але й активацією у цитоплазмі сигнальних каскадів, компонентами яких є активні форми кисню, іони кальцію, ендонуклеази, каспази, цитохром с та ін. [1, 4, 6, 11, 52, 54].

На сьогодні накопичено значний матеріал, який свідчить про важливу роль мітохондрій у механізмах пошкодження ДНК. Порушення структурно-функціонального стану мітохондрій, зниження мітохондріального трансмембранного потенціалу та підвищення рівня продукції активних форм кисню, які призводять до пошкодження клітинних білків, нуклеїнових кислот та відкриття неселективних пор у внутрішній мембрані мітохондрій, є визначальним етапом апоптозу, тісно пов'язаним з такими загальноновизначеними ознаками, як конденсація хроматину та фрагментація ДНК. Такий взаємозв'язок виявлено у клітинах різних типів (В- і Т-лімфоцитах, тимоцитах, фібробластах та ін.) за дії різних фізіологічних та фармакологічних індукторів апоптозу (етопозид, стауроспорин, пероксид водню та ін.) [24, 44, 54, 58, 63, 65]. Вивчення механізмів ініціації та реалізації пошкоджень ДНК відкриває перспективи для розробки методів корекції патологічних змін клітинного гомеостазу та направлено пошуку препаратів, здатних ініціювати або пригнічувати загибель клітин.

© І.І. Гринюк, 2010.

Механізми вивільнення апоптогенних факторів з мітохондрій.

Безпосередній вплив мітохондрій на ядро під час індукції апоптозу вивчено у безклітинних системах, компонентами яких були ізольовані ядра контрольних клітин, система регенерації АТФ та мітохондрії чи цитоплазматична фракція [5, 6, 20, 62-64, 70]. Показано, що обробка мітохондрій речовинами, які здатні відкривати пори у цих органах, призводить до апоптичних змін у ядрах (конденсації хроматину та фрагментації ДНК) [62]. Мітохондрії, виділені з апоптичних клітин, також індукують фрагментацію ДНК ядер контрольних клітин [5, 6, 64, 70]. Так, показано, що через 1 год після дії 100 мкМ H_2O_2 у мітохондріях тимоцитів відбуваються порушення, які зумовлюють їх здатність викликати фрагментацію ДНК у ядрах контрольних клітин за умови внесення у безклітинну систему. А внесення у безклітинну систему постмітохондріального супернатанту, виділеного з тимоцитів через 1 год після додавання 100 мкМ H_2O_2 або через 3 год після опромінення у дозі 4,5 Гр, призводить до посилення фрагментації ДНК у ядрах, що свідчить про залучення позаядерних та позамітохондріальних факторів до порушення структури хроматину та деградації ДНК за дії досліджуваних чинників [5, 6].

Фактори, які можуть активувати процес деградації хроматину, містяться як у міжмембранному просторі, так і в матриксі мітохондрій, а необхідною умовою їх виходу є відкриття неселективних пор у внутрішній мембрані мітохондрій [34, 39, 73].

На даний час запропоновано два механізми вивільнення апоптогенних факторів з мітохондрій: перший – неспецифічний прорив зовнішньої мітохондріальної мембрани, який відбувається в результаті набрякання мітохондрій, другий – утворення автономних каналів у зовнішній мембрані мітохондрій за допомогою білків підродино Вах.

Перший з механізмів передбачає набрякання мітохондріального матриксу, яке пов'язується з утворенням неселективних пор у внутрішній мембрані мітохондрій (НМП) [3, 54, 70]. Відкриття пор відбувається за умов окисного стресу, високої концентрації Ca^{2+} , низької концентрації АТФ, при підвищенні рН, рівня неорганічного фосфату, окисненому стані мембранних тіолів та глутатіону, зниженні мембранного потенціалу, тоді як антиоксиданти, спермін, хелатори кальцію інгібують цей процес [15, 25, 46].

Механізм формування та молекулярний склад неселективних пор на сьогодні вивче-

но недостатньо. Відомо, що НМП – це високомолекулярний білковий комплекс, який пронизує одночасно як внутрішню, так і зовнішню мітохондріальні мембрани. Припускають, що до формування НМП залучений АТФ/АДФ-антипортер. Цей білок розташований на внутрішній мітохондріальній мембрані та може перебувати у двох конформаціях – m (коли його зв'язуючий центр обернений до матриксу) та c (коли зв'язуючий центр знаходиться зовні). Пори можуть утворюватись тільки у c-конформації білка, коли він перетворюється на неспецифічний канал, проникний для будь-яких речовин з молекулярною масою <1,5 кДа [3, 73]. Важливими компонентами пори також є білки зовнішньої мембрани мітохондрій порин або VDAC (voltage-depend anion channel) та периферичний бензодіазепіновий рецептор, ферменти гексокіназа та креатинкіназа, а також циклофілін D. Базова структура НМП формується комплексом VDAC, АТФ/АДФ-антипортером, циклофіліном D та іншими білками в місцях контакту між зовнішньою і внутрішньою мембранами мітохондрій [3, 25, 61].

НМП викликає порушення осмотичного балансу між матриксом та міжмембранним простором мітохондрій. Внутрішня мембрана мітохондрій стає проникною для іонів K та Cl. Тільки високомолекулярні сполуки, такі, як білки, зумовлюють осмотичний тиск, тому що для них мембрана залишається непроникною. Оскільки в матриксі білків набагато більше, ніж у міжмембранному просторі, вода проникає у матрикс для вирівнювання концентрацій. Це викликає набрякання матриксу мітохондрій, в результаті відбувається розрив зовнішньої мембрани мітохондрій, площа якої менша площі внутрішньої мембрани. Білки міжмембранного простору, зокрема проапоптичні (цитохром c, AIF та ін.), потрапляють у цитозоль [19, 39, 44].

Згідно з другою моделлю, проапоптичні білки (Вах, Вак, Від), які містяться в цитозолі або слабоасоційовані з мембранами, після отримання апоптичного сигналу транслюються у зовнішню мембрану мітохондрій [18, 31, 51, 68]. Там ці білки гомо-олігомеризуються і формують функціональні іонні канали (мультиелектропровідні, потенціал- та рН-незалежні зі слабкою вибірковістю іонів), через які вивільнюються апоптичні фактори міжмембранного простору мітохондрій. Антиапоптичні білки, такі, як Bcl-2, Bcl-x_l, взаємодіють з Вах або Вак, зупиняючи їх конформаційні зміни [41, 69]. Блокувати функції Bcl-x_l здатний білок Bad, який, активуючись шляхом дефосфорилування, гетеродимеризується з ним.

Припускається, що активатором проапоптогенних білків родини Bcl-2 є гістон H1, а саме його ізоформа H1.2, яка внаслідок фізичного ремоделювання хроматину або індукованих пошкодженням модифікацій його компонентів може вивільнюватись з ядра у цитозоль [32, 53]. Показано, що гістон H1.2 може спричиняти вивільнення цитохрому с з мітохондрій шляхом активації білка Bak [32]. H1.2 був таким же ефективним активатором Bak, як і білок Bid, а антиапоптичний білок Bcl-xL пригнічував викликане гістоном H1.2 вивільнення цитохрому с. Незважаючи на ці факти, механізм дії H1.2 залишається незрозумілим, адже у складі гістону H1.2, на відміну від Bid, відсутній BH3-домен і безпосередню його взаємодію з білками родини Bcl-2 не доведено.

Іншим ядерним білком, який здатен впливати на проникність мітохондріальної мембрани, є p53. При значних пошкодженнях ДНК білок p53 активує експресію проапоптичних генів, у тому числі bax, Noxa, Puma, та пригнічує експресію антиапоптичних генів, наприклад генів Bcl-2 та IAP [60]. Є дані про те, що p53, незалежно від транскрипційної активності, може безпосередньо активувати Bax та вивільняти інші проапоптичні білки із комплексу з білком Bcl-XL [21], стимулюючи таким чином вихід апоптичних факторів із мітохондрій у цитозоль.

Іонізуюче випромінювання та інші пошкоджувальні фактори, які індукують структурні зміни ДНК, викликають не лише активацію транскрипційного фактора p53, але і перехід прокаспази-2, яка локалізована у ядрі, в активну форму. Активована каспаза-2 транслокується до мітохондрій, де, у свою чергу, спричиняє вивільнення цитохрому с з міжмембранного простору мітохондрій [29, 58], внаслідок чого формуються апоптосоми та активуються ефекторні каспази.

Результатом пермеабілізації зовнішньої мітохондріальної мембрани є вивільнення з міжмембранного простору мітохондрій проапоптичних білків, таких, як цитохром с, AIF (апоптозіндукуючий фактор), інгібіторів антиапоптичних регуляторних білків Smac/Diablo та Omi/HtrA2, які, потрапляючи в цитоплазму, запускають програму апоптозу клітини [45].

Мітохондріальні апоптогенні чинники.

Цитохром с. Першим білком, участь якого в апоптозі доведено експериментально, був цитохром с. Цей розчинний глобулярний білок приєднаний до зовнішньої сторони внутрішньої мембрани мітохондрій за допомогою кардіоліпіну. В нормі цитохром с не залишає міжмем-

бранного простору і є обов'язковим компонентом дихального ланцюга мітохондрій, він акцептує електрони від цитохрому с редуктази та передає їх на цитохром-оксидазу. Підвищення рівня АФК у мітохондріях може сприяти окисненню кардіоліпіну, зменшенню спорідненості кардіоліпіну до цитохрому с та послабленню зв'язку останнього з мембраною [40, 56]. Показано, що вивільнення цитохрому с у цитозоль може відбуватися внаслідок розщеплення кардіоліпіну активованим каспазою-8 апоптичним фактором tBid або транслокованою за апоптозу з ядра до мітохондрій каспазою-2 [31, 55, 58]. Окрім того, вивільнення цитохрому с з мітохондрій може безпосередньо залежати від Ca^{2+} і посилюватися в разі підвищення концентрації катіона у мітохондріальному міжмембранному просторі, оскільки Ca^{2+} здатен конкурувати з цитохромом с за місця зв'язування з кардіоліпіном [40].

Основною апоптогенною функцією цитохрому с є формування разом з АТФ та цитоплазматичним фактором APAF-1 комплексу, що активує каспазу-9, яка, у свою чергу, активує каспази-3 та 7. У такий протеолітичний каскад включаються каспази-2, 6, 8, 10. Відомо, що субстратами каспаз є білки цитоскелета – гельсольвін та фодрин, полі-(АДФ-рибозо)полімераза (PARP), антиапоптичні білки Bcl-2, проапоптичний білок Bid, а також ядерні білки (ламін А та В, NuMa (Nuclear mitotic apparatus protein), ядерний фактор Acinus, який відповідає за конденсацію хроматину) та інші регуляторні білки [39, 54], протеолітичне розщеплення яких призводить до конденсації хроматину по периферії ядра. Окрім того, каспаза-3 розщеплює інгібіторну субодиницю ДНКаз (CAD/DFF), внаслідок чого CAD/DFF активується та здійснює фрагментацію хроматину, що призводить до загибелі клітини [67].

Smac/Diablo та Omi/HtrA2. Окрім цитохрому с, впливати на активність каспаз можуть проапоптичні регуляторні білки Smac/Diablo (Second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low pI) та Omi/HtrA2 (Omi stress-regulated endopeptidase/high temperature requirement protein A2). На сьогодні недостатньо з'ясовано фізіологічні функції цих білків, але припускають, що Omi/HtrA2 запобігає розвитку оксидативного стресу в нормальних клітинах та сприяє їх виживаності [42]. Після виходу з міжмембранного простору в цитозоль Smac/Diablo та Omi/HtrA2 перешкоджають інгібуванню каспаз білками родини IAP (inhibitor of apoptosis protein) внаслідок інактивації останніх [27, 43, 71]. Так, по-

казано, що білок Smac/Diablo виконує функцію убіквітин-лігази для молекул IAP та сприяє їх протеосомній деградації, що, у свою чергу, перешкоджає інгібуванню впливу IAP на каспази. Omi/HtrA2 – серинова протеаза, яка розщеплює, а також інактивує інгібітори каспаз. Є дані, що Omi/HtrA2 може ініціювати і каспазонезалежну загибель клітин [17]. Показано, що протеаза Omi/HtrA2 розщеплює білки, які кодуються мутованим геном WT1. Як відомо, WT1 є геном-супресором пухлин, а мутації у ньому призводять до розвитку пухлини Вільямса, деяких типів лейкозу, раку грудної залози та легенів. Мішенню для білка WT1 є гени, які відіграють важливу роль у контролі апоптозу (Bcl-2, Bak, c-myc). При цитотоксичній терапії серинова протеаза Omi/HtrA2 розщеплює WT1 на фрагменти, що призводить до видалення його з ділянок зв'язування на промоторах генів, які беруть участь у регуляції апоптозу [37]. Ці та інші дослідження відкривають перспективи використання Omi/HtrA2 та Smac/Diablo як терапевтичних засобів для боротьби з раком, нейрогенеративними й аутоімунними захворюваннями [16, 28, 30].

AIF. Іншим мітохондріальним апоптогенним білком є AIF. AIF – флавопротеїд, який, подібно до цитохрому с, бере участь у нормальному функціонуванні мітохондрій в живих клітинах [35, 36]. Припускається, що завдяки своїй оксидоредуктазній активності AIF може бути “пасткою” АФК у нормальних умовах [48]. За умови виходу AIF у позамітохондріальний простір цей фактор може викликати конденсацію хроматину, фрагментацію ДНК та зниження мембранного потенціалу в мітохондріях. При додаванні флавопротеїну AIF до ізольованих ядер клітин HeLa відбуваються швидко (впродовж 1 хв) конденсація хроматину та великомасштабна фрагментація ДНК (фрагменти близько 50 тис. п. н.), але не спостерігається олігонуклеосомної фрагментації ДНК. При його додаванні до ізольованих мітохондрій гепатоцитів щурів має місце вивільнення цитохрому с та каспази-9 [63]. Введення в інтактні фібробласти щурів AIF спричиняє екстерналізацію фосфатидилсерину на зовнішній бік цитоплазматичної мембрани, зниження мембранного потенціалу мітохондрій, великомасштабну фрагментацію ДНК та конденсацію хроматину по периферії ядра. Додавання пептидного інгібітора каспаз N-бензоїлоксикарбоніл-Val-Ala-Asp-трифторметилкетону (Z-VAD.fmk), який зупиняє апоптоз, індукований додаванням цитохрому с, не викликає інгібування апоптозу, зумовленого AIF. Отже, AIF як мітохондріаль-

ний індуктор загибелі клітини діє незалежно від каспаз [33, 49, 62].

Ендонуклеаза G. Суттєвий внесок у процес деградації хроматину за апоптозу роблять ендонуклеази, які здійснюють односторонні розриви у збагачених на АТ ділянках ДНК у місцях прикріплення до ядерного матриксу, а також у лінкерних ділянках [8, 22, 38, 59]. У таких пошкоджених ділянках ДНК відбуваються конформаційні зміни та посилюється чутливість до нуклеаз, які здійснюють подальшу міжнуклеосомну фрагментацію ДНК. Одним із таких ферментів є ендонуклеаза G, яка вивільнюється з мітохондрій у відповідь на апоптогенний стимул [47, 66]. Доведено участь ендонуклеази G у апоптозі під час раннього ембріогенезу та при старінні м'язів [23, 72]. Ендонуклеаза G не специфічна до послідовності ДНК та вносить одноланцюгові розриви, внаслідок чого формуються фрагменти більше 50 тис. пар основ. Фермент є незалежним від каспаз ефектором клітинної загибелі. Можливо, ендонуклеаза G діє разом з апоптозіндукуючим фактором AIF та ДНКазою CAD/DFF40, що забезпечує ефективну деградацію ДНК за апоптозу [14, 47, 66].

На сьогодні залишається нез'ясованою послідовність вивільнення апоптогенних молекул із мітохондрій у цитозоль. Автори [12, 13] вважають, що існує певна ієрархія у вивільненні цих молекул. Показано, що спочатку з мітохондрій вивільняються цитохром с, молекули Smac/Diablo та Omi/HtrA2, а вихід флавопротеїну AIF та ендонуклеази G відбувається тільки після активації каспаз та пригнічується при додаванні неспецифічного інгібітора каспаз Z-VAD.fmk.

Таким чином, мітохондрії відіграють важливу роль в ініціації та реалізації пошкодження ДНК. Різні індуктори апоптозу прямо чи опосередковано викликають підвищення проникності мембрани цих органел, що призводить до вивільнення з мітохондрій апоптогенних молекул (цитохрому с, білків Smac/Diablo та Omi/HtrA2, фактора індукції апоптозу AIF, ендонуклеази G), та запускається каскад протеолітичних реакцій, які призводять до порушення структурної організації хроматину в ядрі, фрагментації ДНК, внаслідок чого реалізується програма загибелі клітини.

Дослідження причинно-наслідкових зв'язків та виявлення відмінних і спільних ланок у порушенні структурної організації хроматину за дії чинників різної природи є важливими для розуміння загальних закономірностей загибелі та адаптації клітин, а та-

кож відкривають перспективи впливу на клітинну загибель за допомогою фізіологічних агентів і фармакологічних препаратів та розробки нових біотехнологічних підходів діагно-

тики і лікування таких захворювань, як інфаркт міокарда, інсульт, хвороба Альцгеймера, СНІД, рак, аутоімунні, нейродегенеративні та вірусні захворювання [16, 28, 30, 49, 50, 52].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Биохимические основы патологических процессов / Под ред. Е.С. Северина. – М.: Медицина, 2000. – 304 с.
2. Винокуров М.Г., Юринская М.М. Регуляция апоптоза нейтрофилов при действии липополисахаридов // Биологические мембраны. – 2010. – **27**, № 1. – С. 18-27.
3. Владимиров Ю.А. Нарушение барьерных свойств внутренней и наружной мембран митохондрий, некроз и апоптоз // Биологические мембраны. – 2002. – **19**, № 5. – С. 356-377.
4. Гребиньук Д.М., Гринюк И.И., Матишевська О.П. Исследование кальциевого гомеостаза в тимоцитах при апоптозе. II. Аккумуляция Ca^{2+} митохондриями и эндоплазматическим ретикуломом // Укр. біохім. журн. – 2004. – **77**, № 2. – С. 63-69.
5. Гринюк І.І., Капралов О.О., Матишевська О.П. Використання безклітинної системи для дослідження участі цитозолу та митохондрий у індукції апоптозу тимоцитів // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Біологія. – 2003. – № 40. – С. 70-72.
6. Гринюк І.І., Корнійчук Г.М., Капралов О.О., Матишевська О.П. Зміни структурного стану хроматину у тимоцитах на ранньому етапі апоптозу за індукції пероксидом водню та радіацією // Укр. біохім. журн. – 2004. – № 5. – С. 90-95.
7. Потапнев М.П. Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. – 2002. – № 4. – С. 237-243.
8. Семенов Д.В., Кулигина Е.В., Аронов П.А. и др. Олигонуклеосомная фрагментация ДНК клеток MCF-7 при апоптозе, индуцированном пальмитатом Na // Биохимия. – 2003. – **68**, вып. 12. – С. 1657-1665.
9. Фільченков О.О., Стойка Р.С. Апоптоз і рак: від теорії до практики. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2006. – 523 с.
10. Ярилин А.А. Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и при патологии // Актуальные проблемы патофизиологии / Под ред. Б.Б. Мороза. – М., 2001. – С. 13-56.
11. Adams J.M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis // Genes & Dev. – 2003. – **17**. – P. 2481-2495.
12. Arnoult D., Gaume B., Karbowski M. et al. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization // EMBO J. – 2003. – **22**, № 17. – P. 4385-4399.
13. Arnoult D., Parone P., Martinou J.C. et al. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli // J. Cell. Biol. – 2002. – **159**, № 6. – P. 923-929.
14. Bajt M.L., Cover C., Lemasters J.J., Jaeschke H. Nuclear Translocation of Endonuclease G and Apoptosis-Inducing Factor during Acetaminophen-Induced Liver Cell Injury // Toxicological Sciences. – 2006. – **94**, № 1. – P. 217-225.
15. Baumgartner H.K., Gerasimenko J.V., Thorne Ch. et al. Calcium elevation in mitochondria is the main Ca^{2+} requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening // J. Biol. Chem. – 2009. – **284**. – P. 20796-20803.
16. Bhuiyan M.S., Fukunaga K. Mitochondrial serine protease HtrA2/Omi as a potential therapeutic target // Curr. Drug. Targets. – 2009. – **10**, № 4. – P. 372-383.
17. Blink E., Maiani N.A., Alnemri E.S. et al. Intramitochondrial serine protease activity of Omi/HtrA2 is required for caspase-independent cell death of human neutrophils // Cell Death and Differentiation. – 2004. – **11**. – P. 937-939.
18. Brunelle J.K., Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family // J. of Cell Science. – 2009. – **122**. – P. 437-441.
19. Cande C., Vahsen N., Garrido C., Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all // Cell Death Differ. – 2004. – **11**, № 6. – P. 591-595.
20. Chandra D., Tang D.G. Detection of apoptosis in cell-free systems // Methods Mol. Biol. – 2009. – **559**, № 1. – P. 65-75.
21. Chipuk J.E., Kuwana T., Bouchier-Hayes L. et al. Direct Activation of Bax by p53 Mediates Mitochondrial Membrane Permeabilization and Apoptosis // Science. – 2004. – **303**. – P. 1010-1014.
22. Cohen G.M., Sun X.-M., Fearnhead M. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key step of apoptosis in thymocytes // J. Immunol. – 1994. – **154**, № 507. – P. 511-516.
23. Courtney S.M., Kim J.-H., Macias B.R. et al. The effects of exercise on caspase independent endonuclease G and apoptosis inducing factor with regards to age-related apoptosis // FASEB J. – 2009. – **23**, № 618. – P. 16.
24. Crompton M. Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death // Journal of Physiology. – 2000. – **529**, № 1. – P. 11-21.
25. Deniaud A., Sharaf el dein O., Maillier E. et al. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis // Oncogene. – 2008. – **27**, № 3. – P. 285-299.

26. Dirks-Naylor A.J., Griffiths C.L. Glucocorticoid-induced apoptosis and cellular mechanisms of myopathy // *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* – 2009. – **117**, № 1-3. – P. 1-7.
27. Du C., Fang M., Li Y. et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition // *Cell.* – 2000. – **102**. – P. 33-42.
28. Endo K., Kohnoe S., Watanabe A. et al. Clinical significance of Smac/DIABLO expression in colorectal cancer // *Oncol. Rep.* – 2009. – **21**, № 2. – P. 351-355.
29. Enoksson M., Robertson J. D., Gogvadze V. et al. Caspase-2 Permeabilizes the Outer Mitochondrial Membrane and Disrupts the Binding of Cytochrome c to Anionic Phospholipids // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, № 48. – P. 49575-49578.
30. Fandy T.E., Shankar S., Srivastava R.K. Smac/DIABLO enhances the therapeutic potential of chemotherapeutic drugs and irradiation, and sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells // *Mol. Cancer.* – 2008. – **7**, № 60.
31. Fradin C., Leber B., Andrews D.W. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax // *Cell.* – 2008. – **135**. – P. 1074-1084.
32. Gillespie D.A., Vousden K.H. The secret life of Histones // *Cell.* – 2003. – **114**. – P. 655-661.
33. Gregan S.P., Dawson V.L., Slack R.S. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death // *Oncogene.* – 2004. – **23**, № 16. – P. 2785-2796.
34. Halestrap A.P., Woodfield K.-Y., Connern C.P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase // *J. Biol. Chem.* – 1997. – **272**. – P. 3346-3354.
35. Hangen E., Blomgren K., Benit P. et al. Life with or without AIF // *Trends. Biochem. Sci.* – 2010. – **35**, № 5. – P. 278-287.
36. Hangen E., Kroemer G., Modjtahedi N. Vital functions of Apoptosis Inducing Factor (AIF) // *Gastroenterology and hepatology from bed to bench.* – 2009. – **2**. – P. 66-70.
37. Hartkamp J., Carpenter B., Roberts S.G.E. The Wilms' Tumor Suppressor Protein WT1 Is Processed by the Serine Protease HtrA2/Omi // *Molecular Cell.* – 2010. – **37**, № 2. – P. 159-171.
38. He B., Lu N., Zhou Z. Cellular and nuclear degradation during apoptosis // *Curr. Opin. Cell. Biol.* – 2009. – **21**, № 6. – P. 900-912.
39. Hirsch T., Susin S.A., Marzo I. et al. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis // *Cell Biol. Toxicol.* – 1998. – **14**. – P. 141-145.
40. Iverson S.L., Orrenius S. The cardiolipin-cytochrome c interaction and the mitochondrial regulation of apoptosis // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2004. – **423**, № 1. – P. 37-46.
41. Jacotot E., Ferri K.F., El Hamel C. et al. Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2 // *Exp. Med.* – 2001. – **193**, № 4. – P. 509-519.
42. Kieper N., Holmstrom K.M., Ciceri D. et al. Modulation of mitochondrial function and morphology by interaction of Omi/HtrA2 with the mitochondrial fusion factor OPA1 // *Exp. Cell Res.* – 2010. – **316**, № 7. – P. 1213-1224.
43. Kim J., Kim D.S., Park M.J. et al. Omi/HtrA2 protease is associated with tubular cell apoptosis and fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2010. – **298**. – P. 1332-1340.
44. Kowaltowski A.J., Castilho R.F., Vercesi A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress // *FEBS Lett.* – 2001. – **495**, № 1-2. – P. 12-15.
45. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death // *Physiol. Rev.* – 2007. – **87**. – P. 99-163.
46. Kumar B., Kumar A., Pandey B.N. et al. Role of mitochondrial oxidative stress in the apoptosis induced by diospyrin diethylether in human breast carcinoma (MCF-7) cells // *Mol. Cell Biochem.* – 2009. – **320**, № 1-2. – P. 185-195.
47. Li L.Y., Luo X., Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria // *Nature.* – 2001. – **412**, № 6842. – P. 95-99.
48. Lipton S.A., Bossy-Wetzel E. Dueling activities of AIF in cell death versus survival: DNA binding and redox activity // *Cell.* – 2002. – **111**, № 2. – P. 147-150.
49. Lorenzo H.K., Susin S. A. Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death // *Drug Resist Updat.* – 2007. – **10**, № 6. – P. 235-255.
50. Maniati E., Potter P., Rogers N.J., Morley B.J. Control of apoptosis in autoimmunity // *J Pathol.* – 2008. – **214**. – P. 190-198.
51. Martinou J.-C., Green D.R. Breaking the mitochondrial barrier // *Nature Reviews Mol. Cell Biol.* – 2001. – **2**. – P. 63-67.
52. Nagarkatti M., Rieder S.A., Vakharia D. et al. Evaluation of apoptosis in immunotoxicity testing // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – **598**. – P. 241-257.
53. Okamura H., Yoshida K., Amorim B.R. et al. Histone H1.2 is translocated to mitochondria and associates with Bak in bleomycin-induced apoptotic cells // *J. Cell Biochem.* – 2008. – **103**, № 5. – P. 1488-1496.
54. Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death // *Toxicol Lett.* – 2004. – **149**. – P. 19-23.
55. Orrenius S., Zhivotovsky B., Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium – apoptosis link // *Molecular Cell Biology.* – 2003. – **4**. – P. 552-564.
56. Ott M., Zhivotovsky B., Orrenius S. Role of cardiolipin in cytochrome c release from mitochondria // *Cell Death and Differentiation.* – 2007. – **14**. – P. 1243-1247.
57. Renehan A.G., Booth C., Potten C.S. What is apoptosis, and why is it important? // *BMJ.* – 2001. – **322**. – P. 1536-1538.
58. Robertson J.D., Enoksson M., Suomela M. et al. Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**. – P. 29803-29809.
59. Roy P. New aspects of the mechanism of DNA fragmentation in apoptosis // *Biochem. Cell. Biol.* – 1997. – **75**. – P. 287-299.

60. Schuler M., Green D.R. Mechanisms of p53-dependent apoptosis // *Bioch. Soc. Trans.* – 2001. – **29**. – P. 684-688.
61. Shoshan-Barmatz V., Keinan N., Abu-Hamad S. et al. Apoptosis is regulated by the VDAC1 N-terminal region and by VDAC oligomerization: Release of cytochrome c, AIF and Smac/Diablo // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – **1797**, № 6-7. – P. 1281-1291.
62. Susin S.A., Daugas E., Ravagnan L. et al. Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis // *J. Exp. Med.* – 2000. – **192**. – P. 571-580.
63. Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N. et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor // *Nature.* – 1999. – **397**, № 6718. – P. 441-446.
64. Taneja N., Tjalkens R., Philbert M.A., Rehemtulla A. Irradiation of mitochondria initiates apoptosis in a cell free system // *Oncogene.* – 2001. – **20**. – P. 167-177.
65. Tomiyama K., Yamaguchi A., Kuriyama T., Arakawa Y. Analysis of mechanisms of cell death of T-lymphocytes induced by organotin agents // *J. Immunotoxicol.* – 2009. – **6**, № 3. – P. 184-193.
66. Widlak P., Li L.Y., Wang X., Garrard W.T. Action of Recombinant Human Apoptotic Endonuclease G on Naked DNA and Chromatin Substrates // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P. 48404-48409.
67. Widlak P., Li P., Wang X., Garrard W.T. Cleavage Preferences of the Apoptotic Endonuclease DFF40 (Caspase-activated DNase or Nuclease) on Naked DNA and Chromatin Substrates // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**. – P. 8226-8232.
68. Willis S.N., Fletcher J.I., Kaufmann T. et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science.* – 2007. – **315**. – P. 856-859.
69. Youle R.J., Strasser A. The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – **9**, № 1. – P. 47-59.
70. Zamzami N., Susin S.A., Marchetti P. et al. Mitochondrial control of nuclear apoptosis // *J. Exp. Med.* – 1996. – **183**. – P. 1533-1544.
71. Zhang C., Xie L., Cheng H. et al. TRAF3 Interacts with Smac/DIABLO and Enhances the Proapoptotic Effect of Smac/DIABLO in Cytoplasm // *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* – 2007. – **39**, № 2. – P. 108-116.
72. Zhang J., Dong M., Fan Y. et al. Endonuclease G is required for early embryogenesis and normal apoptosis in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – **100**, № 26. – P. 15782-15787.
73. Zoratti M., Szabo I. The mitochondrial permeability transition // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – **1241**, № 2. – P. 139-176.

И.И. Гринюк

КИЕВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

РОЛЬ МИТОХОНДРИЙ В ПОВРЕЖДЕНИИ ДНК ПРИ АПОПТОЗЕ

Резюме

Осуществлен анализ литературных данных относительно участия митохондрий в механизмах фрагментации ДНК при апоптозе. Вследствие повышения проницаемости мембран этих органелл под действием различных индукторов апоптоза происходит освобождение из митохондрий в цитозоль апоптогенных молекул (цитохрома c, белков Smac/Diablo и Omi/HtrA2, фактора индукции апоптоза AIF, эндонуклеазы G) и запускается каскад протеолитических реакций, которые приводят к нарушению структурной организации хроматина, фрагментации ДНК, вследствие чего реализуется программа гибели клетки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: митохондрии, фрагментация ДНК, апоптоз, цитохром c, Smac/Diablo, Omi/HtrA2, AIF, эндонуклеаза G.

I.I. Grynyuk

TARAS SHEVCHENKO KYIV NATIONAL UNIVERSITY

ROLE OF MITOCHONDRIA IN DAMAGE OF DNA IN CASE OF APOPTOSIS

Summary

The analysis of literature concerning the involvement of mitochondria in mechanisms of DNA fragmentation has been carried out during apoptosis. Owing to increase of permeability of these organelles membranes under the influence of various apoptotic inducers the release of the apoptogenic molecules (cytochrome c, proteins Smac/Diablo and Omi/HtrA2, AIF, endonuclease G) happens, and the cascade proteolytic reactions proceeds. These events lead to the alterations of chromatin structure, DNA fragmentation, and these results in apoptosis.

KEY WORDS: mitochondria, DNA fragmentation, apoptosis, cytochrome c, Smac/Diablo, Omi/HtrA2, AIF, endonuclease G.

Отримано 16.08.10

Адреса для листування: I.I. Гринюк, вул. Львівська, 14, кв. 23, Київ, 03115, Україна.

Медична хімія – т. 12, № 3, 2010

РЕТРОСПЕКТИВНИЙ ПОГЛЯД НА ЗАСТОСУВАННЯ ПОЛІОННИХ РОЗЧИНІВ

У статті наведено основні етапи розвитку інфузійної терапії та підходів до створення інфузійних розчинів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: інфузії, історія, полііонні розчини, холера, крововтрата, регідратація.

Історія розвитку інфузійної терапії сягає кінця XVIII сторіччя і показує початок застосування великих об'ємів рідини для внутрішньовенного введення. Ретроспективний погляд на виникнення будь-якого аспекту медицини та фармації завжди є актуальним і викликає великий інтерес. Історія виявляє закономірності розвитку і передбачає створення нових напрямків будь-якої галузі.

Метою даної роботи було проаналізувати літературні джерела і висвітлити деякі аспекти застосування полііонних розчинів в історичному розрізі.

28 серпня 1817 року в районі Тессоре приблизно в 60 милях від Калькутти раптово виникла епідемія так званого “злякисного розладу”. За декілька тижнів у цьому районі померло не менше 10 000 людей. Хвороба, що стала відома під назвою “індійська холера”, “злякисна холера” або “синя холера”, швидко перекинулася на Калькутту і Бензон, потім розповсюдилася по всьому Далекому Сході й до 1821 року дійшла до Персидської затоки і Росії. В Басрі за 11 днів померло 18 000 людей, приблизно одна третина всього населення, те ж саме відбулося в Багдаді й Астрахані. До 1830 року хвороба потрапила в Європу, в 1831 році вона захопила Берлін та Відень, а потім розповсюдилася на Гамбурзький порт.

Причиною смерті від холери було виснаження рідини в організмі в результаті колосальної втрати рідини й електролітів унаслідок стійкої діареї і блювання. З літературних даних того часу відомо, що втрата рідини є

причиною дьогтеподібної консистенції і синюватого кольору крові при холері. Хворі потребують регідратації для відновлення об'єму і плинності крові [6].

Одне з повідомлень в журналі “Ланцет”, зокрема доктора В.О'Шаугнессі, було названо так: “Пропозиція нового методу лікування холери шляхом введення сильнооксигенованих солей у венозну систему”. Його теорія зводилася до того, щоб протистояти посинінню крові, необхідно ввести окиснювальну речовину, бо дихання киснем не допомагало. За пропозицією доктора, введення нітрату калію або хлорату калію внутрішньовенно могло дати позитивний ефект. Ідея О'Шаугнессі зводилася до окиснення крові. В той час він не думав про повторну гідратацію, але у своєму наступному повідомленні зіслався на роботи двох російських авторів, які досліджували кров хворих на холеру і встановили, що в них мав місце дефіцит рідини й електролітів. На основі цих робіт О'Шаугнессі зробив висновок, що лікування повинно бути спрямоване перш за все на відновлення нормальної “питомої сили тяжіння”, тобто нормальної питомої ваги крові, по-друге, на відновлення недостатнього сольового вмісту. Він вважав, що слід призначати рідини і вводити їх будь-яким шляхом, зокрема внутрішньовенно [3, 6].

Вперше вливання у вену підкисленої води з метою боротьби зі згущенням крові у хворого на холеру було здійснено у 1830 році в Москві, коли там лютувала холера. Вже у “Трактаті про переливання крові...” А.М. Філомафітського можна знайти вказівки про три вливання сольового розчину хворим на холеру, які виконав лікар Орловський. У 1836 році в Англії було опубліковано результати ліку-

вання холери шляхом вливання розчину кухонної солі 150 хворим.

На початку 30-х років XIX сторіччя англійський лікар Т. Latta в журналі "Lancet" опублікував роботу, присвячену лікуванню холери шляхом внутрішньовенного вливання розчинів кухонної солі [3].

Важливим кроком на шляху використання з лікувальною метою розчину кухонної солі були дослідження Гольца (1864), який встановив, що смерть від крововтрати настає внаслідок загустіння судинної системи та зупинки серця. На основі цих спостережень він рекомендував для лікування крововтрати вводити у судинну систему рідину. В результаті було встановлено, що за допомогою такого розчину вдається зберегти життя знекровлених жаб. Проте дослідження, проведені у XX сторіччі, показали, що в судинній системі такої "сольової жаби" все ж циркулює деяка кількість еритроцитів. Ці дослідження обґрунтували використання розчинів кухонної солі для лікування гострої крововтрати.

В результаті подальших досліджень було рекомендовано для практичного використання ізотонічний 0,9 % розчин кухонної солі. 10 липня 1881 року Landerer успішно виконав вливання хворому "фізіологічного розчину кухонної солі", чим забезпечив безсмертя цьому інфузійному середовищу, з яким світова медична практика ввійшла у XX сторіччя – сторіччя становлення та розвитку інфузійної терапії.

Лікування хворих на холеру було спрямоване на відновлення об'єму циркулюючої крові, електролітного складу крові й тканин, а також на знищення збудника хвороби. З цією метою проводили масивні внутрішньовенні вливання ізотонічних розчинів, що містили необхідну кількість електролітів: натрію хлориду, калію хлориду, натрію гідрокарбонату та ін.

Перші експериментальні дослідження щодо дії сольових розчинів на організм, безпосередньо 0,85 % розчину натрію хлориду, проведені в 1869 році незалежно один від одного І.Р. Тархановим в Росії і Конгеймом в Німеччині [5]. Пізніше було запропоновано включити в цей розчин іони, що входять до складу крові. Перший фізіологічний розчин, який отримав всесвітнє застосування в медицині та використовується до нашого часу, створив англійський лікар С. Рінгер (1834-1910). До складу розчину, запропонованого Рінгером, входили хлориди натрію, калію та кальцію, а також натрію гідрокарбонат. Майже за сто років існування цей препарат не втратив

своєї актуальності та використовується і в наш час. Так, були створені розчини Рінгера і Зінгера–Локка. У 1897 році Квінтон запропонував використовувати як кровозамінний розчин морську воду. Він обґрунтував це близькістю співвідношень кількості іонів натрію, калію та кальцію в крові ссавців і морській воді. В Росії з морської води, насиченої вуглекислою, виготовляли сольовий комплексний розчин "Акумарин", запропонований О.О. Бабським [3].

В минулому сторіччі внутрішньовенні інфузії стали частіше застосовувати при госпіталізації. Лікування зневоднення, підвищення діурезу, корекція електролітної рівноваги і використання рідин при гіпервиведенні ввійшли в повсякденну лікарську практику.

Розчин натрію хлориду почали застосовувати також перорально невеликими порціями по 50 мл через кожні 20-30 хв протягом 2-3 діб.

У 1916 році виникла ідея включити до складу складних сольових кровозамінних розчинів молочнокислий натрій для корекції метаболічного ацидозу у хворих з діареєю.

Оскільки не завжди можливо задовольнити потреби у плазмі крові, вважалось доцільним для посилення лікувальної активності сольових розчинів додавати до них невелику кількість консервованої крові чи її складових частин. У роки Великої Вітчизняної війни з метою лікування крововтрати та шоку широко використовували "рідину Петрова". Цей препарат являв собою гіпертонічний розчин натрію хлориду (1,5 %), до якого додавали 10 % сумісної крові. Сольова суміш для цього розчину складалася з хлоридів натрію, кальцію та калію, її заготовляли у вигляді таблеток, які одержали назву "таблетки Петрова" [3].

На даний час на фармацевтичному ринку України знаходиться близько сотні найменувань інфузійних розчинів, які розподіляються, відповідно до класифікації АТС, на чотири терапевтичні (фармакологічні) підгрупи [1, 2, 4]:

- кров і подібні препарати;
- розчини для внутрішньовенного введення;
- засоби для перитонеального діалізу;
- додаткові розчини для внутрішньовенного введення.

На ринку України присутні інфузійні розчини 37 виробників, з них вітчизняних заводів 62 %. Однак, незважаючи на це, вітчизняні заводи виготовляють менше половини від загальної кількості найменувань. Це зумовлено тим, що велика кількість заводів виробляє одні й ті ж найменування лікарських засобів. Слід звернути увагу на те, що українські заводи виготовляють, як правило, одно- або дво-

компонентні розчини. Найбільшим вітчизняним виробником розчинів для внутрішньовенного введення є завод "Інфузія", а потім такі виробники, як "Юрія-Фарм" та "Біофарма". Серед зарубіжних виробників провідне місце займають "Nemofarm" та "B.Braun".

Ретроспективний погляд на застосування полііонних розчинів показав, що розвиток номенклатури йде від однокомпонентних до багатокомпонентних розчинів з включенням

не тільки різних іонів, але й інфузійних розчинів направленої дії.

ВИСНОВОК. Історичні дані щодо застосування і створення полііонних розчинів показали закономірність збільшення кількості компонентів в одному інфузійному розчині й дали можливість прогнозувати значне збільшення їх номенклатури з метою індивідуального підходу до лікування хворого.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Жибурт Е.Б. Трансфузиология: Учебник. – СПб.: Питер, 2002. – 736 с.
2. Козинец Г.И. Практическая трансфузиология. – М.: Триада – Х., 1997. – 442 с.
3. Коритнюк Р.С., Борисенко Т.А. Історичні аспекти застосування інфузійних розчинів // Фармацевт практик. – 2008. – № 3. – С. 62-64.

4. Румянцев А.Г., Аграненко В.А. Клиническая трансфузиология. – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – 576 с.
5. Шумило Т.В. Исследования в области приготовления длительно стойких инъекционных растворов некоторых азотсодержащих соединений: Автореф. дисс. ... канд. фармац. наук. – К., 1975. – 23 с.
6. Masson A.H.B. The early days of intravenous saline // Pharm. J. – 1976. – 18. – P. 571-574.

Р.С. Коритнюк, В.С. Гульпа, А.А. Дроздова, Л.Л. Давтян, А.Я. Коритнюк, В.В. Руденко
*НАЦИОНАЛЬНАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ИМЕНИ П.Л. ШУПИКА МОЗ УКРАИНЫ, КИЕВ*

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ ВЗГЛЯД НА ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИИОННЫХ РАСТВОРОВ

Резюме

В статье приведены основные этапы развития инфузионной терапии и подходов к созданию инфузионных растворов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: инфузии, история, полиионные растворы, холера, кровопотеря, регидратация.

R.S. Korytnuk, V.S. Hulpa, A.O. Drozdova, L.L. Davtian, O.Ya. Korytnuk, V.V. Rudenko
P.L. SHUPYK NATIONAL MEDICAL ACADEMY OF POSTGRADUATE EDUCATION OF MPH OF UKRAINE

THE RETROSPECTIVE VIEW TO THE POLYIONIC SOLUTIONS USING

Summary

The main steps of infusion therapy development and approaches to the infusion solutions creation have been presented in the article.

KEY WORDS: infusion, history, polyionic solutions, cholera, blood lost, rehydration.

Отримано 16.08.10

Адреса для листування: Р.С. Коритнюк, Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика.

НАВЧАЛЬНІ ТАБЛИЦІ ПО МЕТАБОЛІЗМУ СІРКОВМІСНИХ АМІНОКИСЛОТ

Нами проаналізовані як літературні дані, так і результати власних досліджень щодо основних шляхів обміну метіоніну, гомоцистеїну та цистеїну, а також участі цих сірковмісних амінокислот та їх метаболітів, зокрема гідроген сульфід, в регуляції фізіологічних процесів і патогенезі серцево-судинних та інших захворювань. Вважаємо, що наведені дані є важливими для медичної освіти, і тому можуть бути впроваджені у навчальний процес на кафедрах біологічної хімії медичних вузів у вигляді розроблених нами демонстраційних таблиць.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: навчальні таблиці, сірковмісні амінокислоти, гідроген сульфід.

Останні роки характеризуються бурхливим розвитком не тільки молекулярної біології та генетики, до яких, з відомих причин, найбільше прикута увага світової наукової громадськості, але і традиційних напрямків біохімії, таких, як метаболізм білків та амінокислот, вуглеводів та ліпідів. Так, з'явилися нові важливі для медичної хімії дані щодо особливостей обміну та значення сірковмісних амінокислот, які ще не ввійшли до складу підручників (Ю.І. Губського, Я.І. Гонського та ін.), що широко використовуються на кафедрах біологічної та медичної хімії медичних вузів України. Метою нашої роботи було проаналізувати відповідну наукову літературу, виділити ті дані, які вже стали загальноновизнаними, та у вигляді демонстраційних таблиць впровадити в навчальний процес на кафедрі біохімії нашого вузу.

З нових даних взято до уваги такі: 1. Накопичення в крові гомоцистеїну (ГЦ), тобто гіпергомоцистеїнемія (ГГЦ), є незалежним фактором ризику розвитку серцевих нападів поряд з гіперхолестеринемією, гіперліпідемією та гіпертонією. 2. Гомоцистеїн та цистеїн є головними попередниками при синтезі гідроген сульфід (H₂S) – нещодавно відкритого нового газового трансмітера [11], що є потужним вазодилататором, антиагрегантом та нейромодулятором. 3. Синтез білка започатковується не метіоніновою тРНК (мет-тРНК), а гомоцистеїновою тРНК (гц-тРНК), яка в подальшому

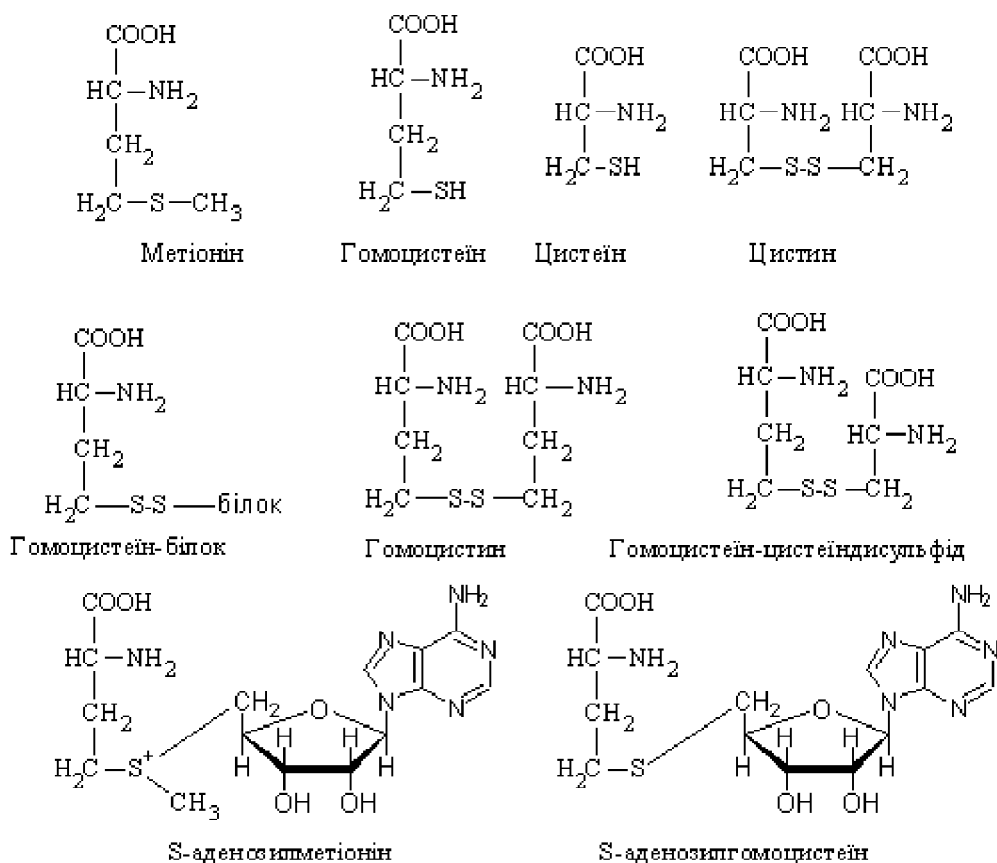
метилується до мет-тРНК. 4. За певних умов ГЦ може входити до складу білка. 5. Ключові ферменти обміну ГЦ – метіонінсинтетаза та бетаїнгомоцистеїнметилтрансфераза – є Zn-залежними металоензимами.

Метіонін (MET) та цистеїн (ЦИС) відкрито ще в позаминулому сторіччі, ГЦ – у 1932 році (De Vigneaud) як продукт деметилювання MET. Через декілька років було встановлено, що ГЦ є основним ендogenous джерелом ЦИС. ГГЦ описано в людей ще в 1962 та 1964 роках [14], але на зв'язок підвищеного рівня ГЦ з атерогенезом та тромбогенезом уперше вказав К. McCully (1969). В кінці ХХ сторіччя було не одноразово підтверджено ці дані та з'ясовано ряд механізмів патогенетичної дії ГГЦ [3, 11, 15]. На початку ХХІ сторіччя з'явилися дані про фізіологічну роль ГЦ, зокрема про участь у процесі синтезу білка [6], а також про можливість інкорпорації ГЦ до складу білків з участю оксиду азоту або тіолактону ГЦ [4, 5]. Крім того, було виявлено, що ГЦ та ЦИС є попередниками важливого газотрансмітера – гідроген сульфід [7, 12, 14], а підвищення рівня ЦИС, як і ГЦ, асоціюється з оксидативним стресом та прискореним розвитком судинної патології [1, 12].

У таблиці 1 наведено структурні формули сірковмісних амінокислот, їх дисульфідів та деяких біологічно активних похідних.

Пояснення до таблиці 1. З трьох сірковмісних амінокислот дві (ЦИС та ГЦ) мають вільні сульфгідрильні групи і тому можуть утворюва-

Таблиця 1 – Структури метіоніну, гомоцистеїну, цистеїну та їх похідних



ти дисульфіди – цистин, гомоцистин, а також змішаний гомоцистеїн-цистеїндисульфід. Біологічне значення має зв'язування ГЦ із сульфгідрильними групами білкового цистеїну, що супроводжується модифікацією структури білкової молекули та зміною її активності. MET та ГЦ мають біологічно активні похідні – S-аденозилметіонін (SAM) і S-аденозилгомоцистеїн (SAH) відповідно. Відомо, що SAM – знаний регулятор активності ферментів утилізації ГЦ, тобто інгібітором метіонінсинтази та алостеричним активатором цистатіонін-β-синтази, а також донором метильних груп в метилтрансферазних реакціях. Натомість SAH є потужним інгібітором активності метилтрансфераз [3, 8, 10].

У таблиці 2 відображено основні шляхи метаболізму MET та ГЦ.

Пояснення до таблиці 2. Спочатку MET перетворюється в активну форму, тобто S-аденозилметіонін. Метилтрансферази використовують цю сполуку як джерело метильних груп для синтезу надзвичайно важливих сполук, таких, як адреналін, креатин, холін, карнозин та ін., а також для регулювання активності нуклеїнових кислот і білків. Після трансметилування S-аденозилметіонін перетворюється в S-аденозилгомоцистеїн, який гідролізується до аденозину та ГЦ.

ГЦ метаболізується трьома основними шляхами [3, 4, 6, 8-10]:

1. Реметилуванням до метіоніну з участю метилтетрагідрофолату, що утворюється в циклі активного фолату, або бетаїну. Обидві реакції каталізуються цинкозалежними металоензимами, і це ще раз демонструє величезну роль мікроелемента цинку в процесах метаболізму.

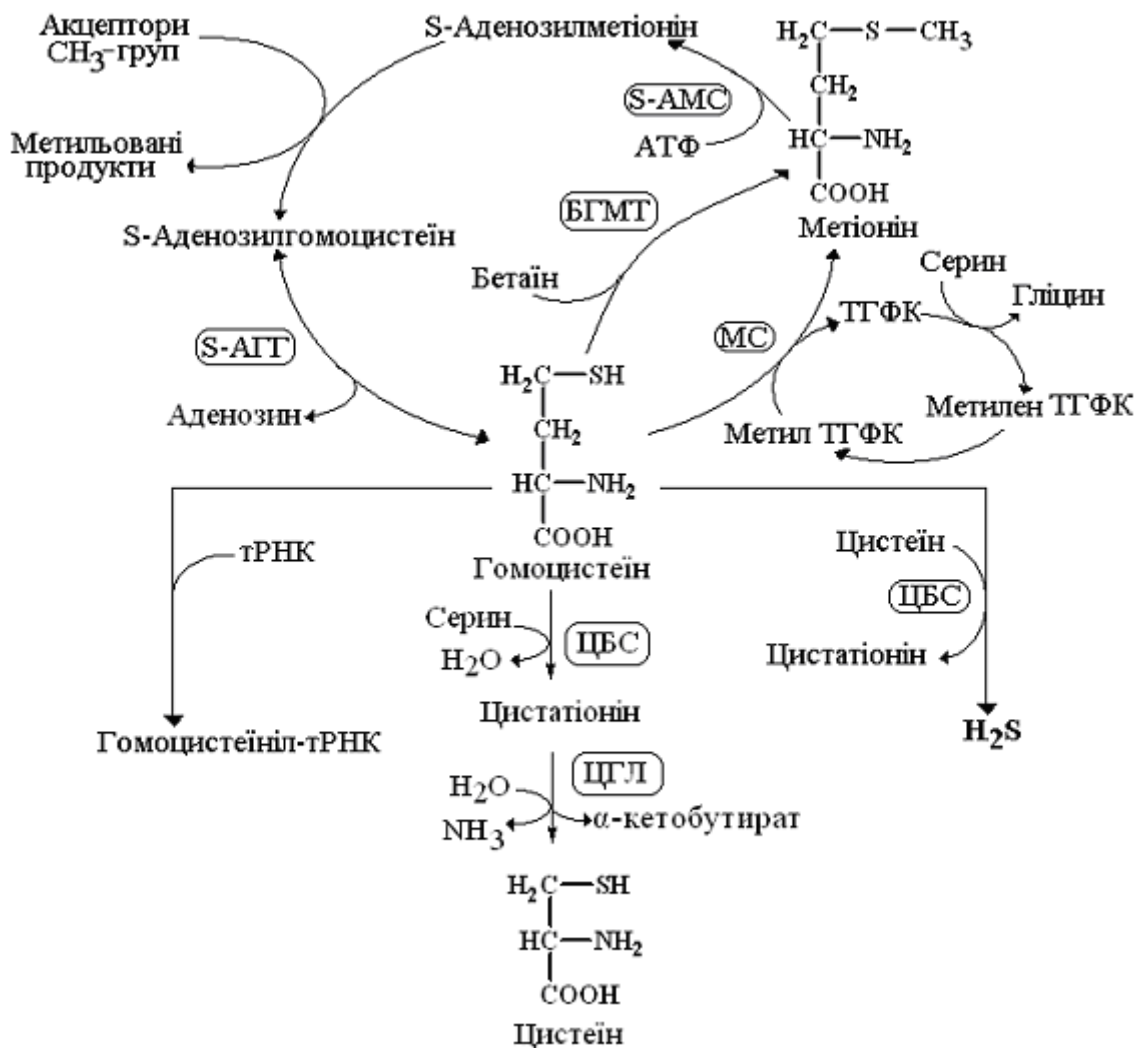
2. Транссульфуванням з утворенням цистатіоніну, цистеїну та гідроген сульфїду. Шляхом транссульфування з участю V_6 -залежних ферментів ГЦ спочатку конденсується із серином з утворенням цистатіоніну, а потім перетворюється в цистеїн. Одночасно при конденсації ГЦ із ЦИС утворюється гідроген сульфід (H_2S).

3. ГЦ також може зв'язуватись зі своєю тРНК з утворенням гомоцистеїніл-тРНК, який швидко метилується з участю S-аденозилметіонінсинтази до метіоніл-тРНК, ініціатора трансляції білків у еукариот.

У таблиці 3 наведено основні шляхи метаболізму іншої сірковмісної амінокислоти – ЦИС.

Пояснення до таблиці 3. Сірковмісна амінокислота цистеїн утилізується різноманітними шляхами [7, 12, 13]. Зокрема, одним із шляхів її катаболізму є окиснення до цистеїнсульфіату. Останній метаболізується через проміжні продукти двома шляхами: а) з утво-

Таблиця 2 – Метаболізм метіоніну та гомоцистеїну



Примітка. МС – метіонінсинтетаза (КФ 2.1.1.13); БГМТ – бетайнгомоцистеїнметилтрансфераза (КФ 2.1.1.5); S-АМС – S-аденозилметіонінсинтетаза (КФ 2.5.1.6); S-АГТ – S-аденозилгомоцистеїнгідролаза (КФ 3.3.1.1); ЦБС – цистатіонін-β-синтетаза (КФ 4.2.1.22); ЦГЛ – цистатіонін-γ-ліаза (КФ 4.4.1.1).

ренням пірувату і сульфат-аніона або б) таурину. Також цистеїн використовується для синтезу глутатіону, який, у свою чергу, кон'югує з електрофільними метаболітами ксенобіотиків та ендогенних субстратів з утворенням глутатіонових кон'югатів. Останнім часом встановлено, що цистеїн є основним джерелом для синтезу біологічно активної речовини – гідроген сульфіду, що продемонстровано в таблиці 4.

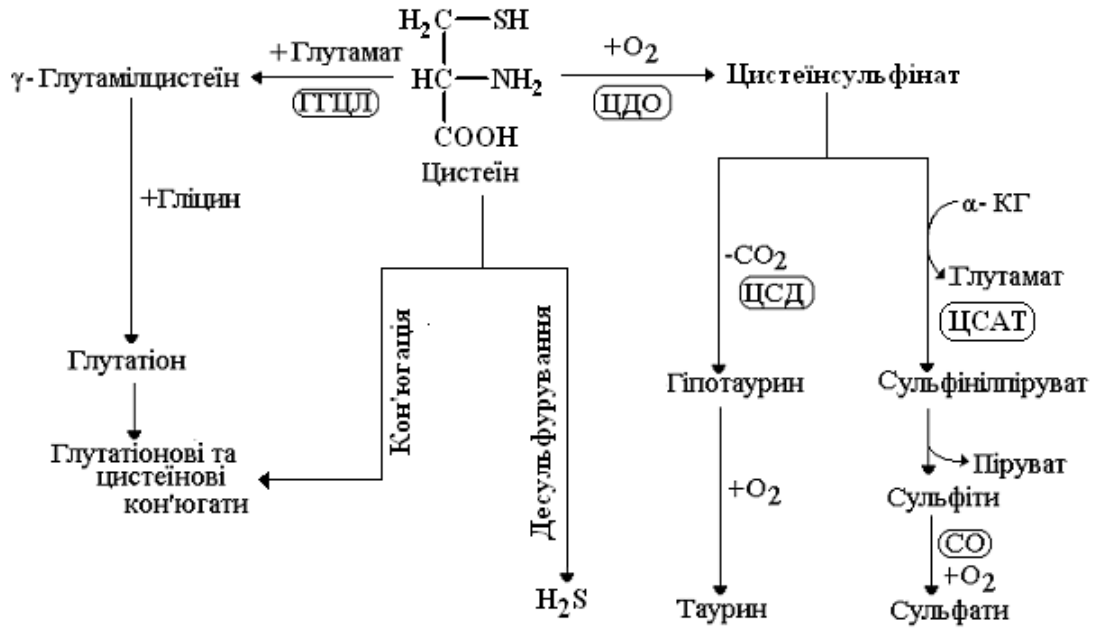
Пояснення до таблиці 4. Встановлено [2, 12-14], що H₂S утворюється переважно з цистеїну з участю цистатіонін-γ-ліази (КФ 4.4.1.1), цистатіонін-β-синтази (КФ 4.2.1.22) та цистеїнамінотрансферази (КФ 2.6.1.3). Утворений H₂S вступає в численні перетворення, зокрема зв'язується з HS-групами білків, модифікуючи їх активність, може утворювати також інші

сполуки (нітрозотіоли, сульфід- та тиосульфат-аніони та ін.). На сьогодні доведено, що H₂S проявляє властивості потужного вазодилатора, антиагреганта і нейромодулятора. Можливий механізм його дії пов'язують зі здатністю модифікувати тиольні групи редоксчутливих білків, що, зокрема, було показано для АТФ-залежних K⁺-каналів гладеньких міоцитів та нейронів, а також NMDA (N-метил-D-аспаратних) рецепторів.

У таблиці 5 наведено узагальнюючі та дещо скорочені дані щодо шляхів обміну всіх трьох сірковмісних амінокислот.

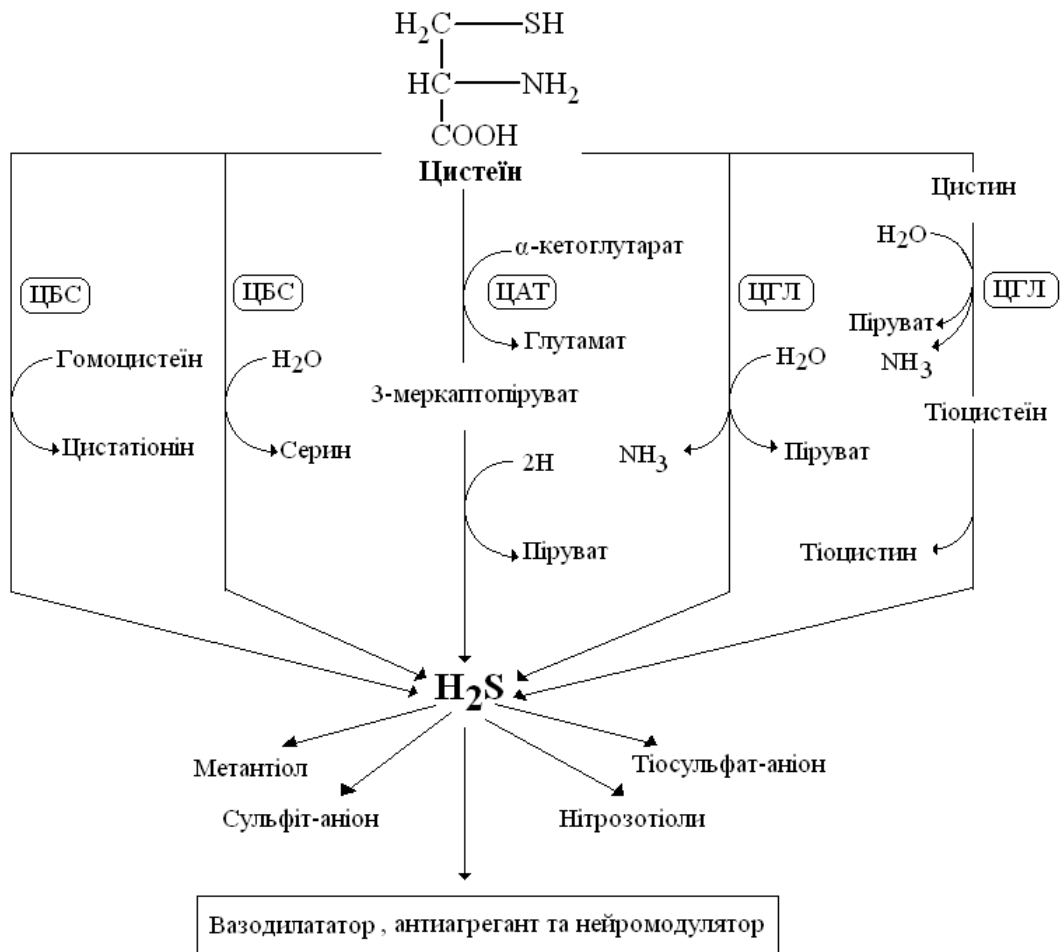
Пояснення до таблиці 5. Узагальнюючу таблицю ми використовуємо для повторення матеріалу, а при потребі – для скороченого вивчення студентами обміну сірковмісних амінокислот.

Таблиця 3 – **Метаболізм цистеїну**



Примітка. ЦДО – цистеїндіоксигеназа (КФ 1.13.11.20); ЦСД – цистеїнсульфінатдекарбоксилаза (КФ 4.1.1.29); СО – сульфітоксидаза (КФ 1.8.3.1); ЦСАТ – цистеїнсульфінатамінотрансфераза (КФ 2.6.1.75); ГГЦЛ-γ – глутаміл-цистеїнілаза (КФ 6.3.2.2).

Таблиця 4 – **Синтез, катаболізм та біологічна роль гідроген сульфіді (H₂S)**



10. Selhub J. Homocysteine metabolism // Annu. Rev. Nutr. – 1999. – **19**. – P. 217-246.

11. Souissi M., Feki M., Mourali S. et al. Homocysteinemia and coronary artery disease: a case-control study in a Tunisian population // Arch. Mal. Coeur Vaiss. – 2006. – **99**, № 9. – P. 781-785.

12. Stipanuk M.H., Dominy J.E., Lee J.I., Coloso R.M. Mammalian cysteine metabolism: new insights into regulation of cysteine metabolism // J. Nutr. – 2006. – **136**, № 6. – P. 1652-1659.

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

14. Whiteman M., Li L., Kostetski I., et al. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2006. – **343**, № 1. – P. 303-310.

15. Yang F., Tan H.V., Wang H. Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis // Acta. Physiol. Sin. – 2005. – **57**, № 2. – P. 103-114.

А.А. Пентюк, **А.В. Мельник**, **Н.В. Заичко**, **Н.Б. Луцюк**

ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.И. ПИРОГОВА

УЧЕБНЫЕ ТАБЛИЦЫ ПО МЕТАБОЛИЗМУ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТ

Резюме

Нами проанализированы как литературные данные, так и результаты собственных исследований, которые касаются основных путей обмена метионина, гомоцистеина и цистеина, а также участия этих серосодержащих аминокислот и их метаболитов, в частности, гидроген сульфида, в регуляции физиологических процессов и патогенезе сердечно-сосудистых и других заболеваний. Считаем, что приведенные данные имеют важное значение для медицинского образования, поэтому могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах биологической химии медицинских вузов в виде разработанных нами демонстрационных таблиц.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **учебные таблицы, серосодержащие аминокислоты, гидроген сульфид.**

O.O. Pentiuk, **A.V. Melnyk**, **N.V. Zaichko**, **M.B. Lutsiuk**

M.I. PYROHOV VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

EDUCATIONAL TABLES ON THE METABOLISM OF SULFUR-CONTAINING AMINO ACIDS

Summary

We have analyzed literature data and results of our investigating devoted to the main metabolic ways of methionine, homocysteine and cysteine, and contribution of these sulfur-containing amino acids and their metabolites, such as hydrogen sulfide, in the regulation of physiological processes and pathogenesis of cardiovascular and other diseases. We consider, that these data have a great value for a medical education and can be used in a study process in biological chemistry departments of medical universities in the form of the demonstration tables created by us.

KEY WORDS: **educational tables, sulfur-containing amino acids, hydrogen sulfide.**

Отримано 07.05.10

Адреса для листування: А.В. Мельник, Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56, Вінниця, 21029, Україна.