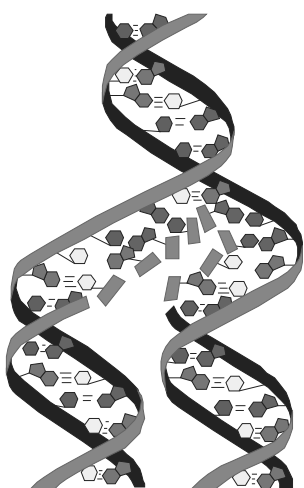


Всеукраїнська громадська наукова організація "Українська академія наук"
ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського"

МЕДИЧНА ХІМІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ



*All-Ukrainian Public Scientific Organization
"Ukrainian Academy of Sciences"
SHEI "I. Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University"*

MEDICAL CHEMISTRY

SCIENTIFIC JOURNAL

2(47) TOM 13
2011

- ❖ *Молекулярні механізми розвитку патології*
- ❖ *Біохімія у діагностиці та лікуванні*
- ❖ *Біохімія серцево-судинних хвороб*
- ❖ *Біохімічна гепатологія та нефрологія*
- ❖ *Біохімія ендокринних хвороб*
- ❖ *Патохімія спадкових хвороб*
- ❖ *Патохімія екстремальних станів*
- ❖ *Біохімія в хірургічній клініці*
- ❖ *Нейрохімія та патохімія головного мозку*
- ❖ *Імунохімія*
- ❖ *Біохімія радіаційних уражень*
- ❖ *Біохімічні аспекти моделювання патологічних процесів*
- ❖ *Ксенобіохімія*
- ❖ *Методи біохімічних досліджень*
- ❖ *Історія біохімії*
- ❖ *Проблеми і досвід викладання біологічної та медичної хімії*
- ❖ *Інформація, хроніка, ювілеї*

- ❖ *Molecular Mechanisms of Pathology Development*
- ❖ *Biochemistry in Diagnostics and Treatment*
- ❖ *Biochemistry of Cardiovascular Diseases*
- ❖ *Biochemical Hepatology and Nephrology*
- ❖ *Biochemistry of Endocrinopathy*
- ❖ *Pathochemistry of Hereditary Diseases*
- ❖ *Pathochemistry of Extremal States*
- ❖ *Biochemistry in Surgical Clinics*
- ❖ *Neurochemistry and Pathochemistry of Cerebrum*
- ❖ *Immunochemistry*
- ❖ *Biochemistry of Radiation Injuries*
- ❖ *Biochemical Aspects of Simulation of Pathologic Processes*
- ❖ *Xenobiochemistry*
- ❖ *Methods of Biochemical Investigations*
- ❖ *History of Biochemistry*
- ❖ *Problems and Experience of Biological and Medical Chemistry Teaching*
- ❖ *Information, Chronicle, Jubilees*

МЕДИЧНА ХІМІЯ

Науковий журнал

MEDICAL CHEMISTRY

Scientific Journal

ISSN 1681-2557

Виходить щоквартально
Published 4 times per year

Заснований у грудні 1999 року
Founded in December 1999

Свідоцтво про державну реєстрацію: серія KB № 3647 від 26.01.1999 р.
Certificate of state registration: series KB № 3647 from 26.01.1999

Передплатний індекс: 22869
Subscription index: 22869

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

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

Рекомендовано до видання вченою радою ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського" (протокол № 16 від 17 червня 2011 р.).

АДРЕСА РЕДАКЦІЇ:

Журнал "Медична хімія"
Видавництво "Укрмедкнига"
Майдан Волі, 1
46001, м. Тернопіль
УКРАЇНА

EDITORIAL OFFICE ADDRESS:
Journal "Medical Chemistry"
Publishing House "Ukrmedknyga"
Maidan Voli, 1
46001, Ternopil
UKRAINE

Tel.: (0352) 43-49-56
(0352) 52-80-09
Fax: (0352) 52-41-83
<http://www.tdmu.edu.te.ua>

За зміст рекламних матеріалів відповідальність несе рекламодавець.
При передруці або відтворенні повністю чи частково матеріалів журналу "Медична хімія" посилання на журнал обов'язкове.

© Науковий журнал "Медична хімія", 2011
© Scientific Journal "Medical Chemistry", 2011

Зміст

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Конопельнюк В. В., Середницька К. Р., Савчук О. М., Остапченко Л. І. (Київ) ВПЛИВ m-ХЛОРОФЕНІЛ-ПІПЕРАЗИНУ НА ВМІСТ СЕРОТОНІНУ В МОЗКУ ТА СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ

5

Бурлака А. П., Ганусевич І. І., Сидорик Є. П., Мамонтова Л. А., Кучменко О. Б., Петухов Д. М., Делеменчук Н. В., Донченко Г. В. (Київ) АКТИВНІСТЬ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕІНАЗ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ДОКСОРУБЦІНУ ТА ДІЇ КОМПЛЕКСУ ПОПЕРЕДНИКІВ І МОДУЛЯТОРІВ БІОСИНТЕЗУ УБІКІНОНУ

10

Тучак О. І., Багрій М. М., Воронич-Семченко Н. М. (Івано-Франківськ) МЕТАБОЛІЧНІ ТА МОРФО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗКУ І ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГІПОТИРЕОЗІ ТА ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ

15

Беленічев І. Ф., Соколик О. П. (Запоріжжя) СТАН ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ І ПОЄДНАНОГО З НИМ ГАМК-ШУНТА В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ТВАРИН ІЗ ХРОНІЧНОЮ АЛКОГОЛЬНОЮ ІНТОКСИКАЦІЄЮ НА ТЛІ ФАРМАКОКОРЕКЦІЇ

21

Ісак О. Д., Моспанова О. В., Науменко О. О. (Рубіжне) СИНТЕЗ І БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ 6-МЕТИЛ-2,4-ДІОКСО-1,2,3,4-ТЕТРАГІДРОПІРІМІДИН-5-СУЛЬФОНаміду ТА ЙОГО N-ПОХІДНИХ

27

Марущак М. І. (Тернопіль) РОЛЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ТА АПОПТОЗУ НЕЙТРОФІЛІВ У ЩУРІВ У ФІЗІОЛОГІЧНИХ УМОВАХ

32

Мищенко О. Я., Тихонов О. І., Гращенко С. А., Юдкевич Т. К., Горбань Є. М. (Харків, Київ) АКТОПРОТЕКТОРНА АКТИВНІСТЬ НОВОГО КОМБІНОВАНОГО ЗАСОБУ "АПІТАР"

36

Авраменко А. І., Сафонов А. А., Роман О. Б. (Запоріжжя) ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СОЛЕЙ 1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛТІОАЦЕТАТИХ КИСЛОТ

40

Котлярєнко Л. Т., Ярема О. М. (Тернопіль) ЗМІНА ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ТА МОРФОСТРУКТУРИ ТОНКОЇ КИШКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ УРАЖЕННІ ОРГАНІЗМУ АЛЮМІНІЮ ХЛОРИДОМ

44

Цубер В. Ю. (Полтава) СЛИННА АЛЬФА-АМІЛАЗА ЯК МАРКЕР РЕАКЦІЇ ОРГАНІЗМУ НА ПСИХОЕМОЦІЙНЕ НАПРУЖЕННЯ

48

Лой Т. О., Тюпка Т. І., Кононенко Н. М. (Харків) ВИВЧЕННЯ ГАСТРОТОКСИЧНОСТІ МЕТИЛОВОГО ЕСТЕРУ N-[(2-ОКСОІНДОЛІНІЛІДЕН-3)-2-ОКСІАЦЕТИЛ]-АМІНООЦТОВОЇ КИСЛОТИ

52

Івануса І. Б., Клішч І. М., Кернична І. З., Василюшин Н. А. (Тернопіль) ВПЛИВ АЦЕТАМІНОФЕНУ НА АКТИВНІСТЬ ПРОЦЕСІВ ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ І СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ СТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ-САМОК НА ТЛІ ТРИВАЛОГО ЗАСТОСУВАННЯ ПРОГЕСТИНІВ ТА ЕСТРОГЕНІВ

56

Банний І. П., Георгіянци В. А., Банна Н. І., Криський О. С., Савченко В. М. (Харків) СИНТЕЗ, ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ТА ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ γ -(R-БЕНЗОЛСУЛЬФОНИЛОКСАМІДО)-БУТАНОВИХ КИСЛОТ

63

Contents

ORIGINAL INVESTIGATIONS

Konopelnyuk V. V., Serednytska K. R., Savchuk O. M., Ostapchenko L. I. (Kyiv) THE EFFECT OF m-CHLOROPHENYLPIPERAZINE ON THE CONTENT OF SEROTONIN IN BRAIN AND BLOOD SERUM OF RATS UNDER THE CONDITIONS OF EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS OF TYPE 2

5

Burlaka A. P., Hanusevych I. I., Sydoryk Ye. P., Mamontova L. A., Kuchmenko O. B., Petukhov D. M., Dele-menchuk N. V., Donchenko H. V. (Kyiv) MATRIX METALLOPROTEINASES' ACTIVITY IN TISSUES OF RATS UNDER DOXORUBICIN EFFECT AND TREATMENT WITH COMPLEX OF PREURSORS AND MODULATORS OF UBIQUINONE BIOSYNTHESIS

10

Tuchak O. I., Bahriy M. M., Voronych-Semchenko N. M. (Ivano-Frankivsk) METABOLIC AND MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES IN STRUCTURES OF CEREBRUM AND THYROID IN EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM AND IN CONDITIONS OF CORRECTION

15

Bielenichev I. F., Sokolyk O. P. (Zaporizhzhya) STATE OF ENERGY METABOLISM AND COMBINED WITH IT GABA-SHUNT IN THE BRAIN OF ANIMALS WITH CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION ON THE BACKGROUND OF FARMACOCORRECTION

21

Isak O. D., Mospanova O. V., Naumenko O. O. (Rubizhne) SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF 6-METHYL-2,4-DIOXO-1,2,3,4-TETRAHYDROPIRIMIDINE-5-SULFONAMIDE AND ITS N-DERIVATIVES

27

Marushchak M. I. (Ternopil) ROLE OF FREE RADICAL PROCESSES AND NEUTROPHILS APOPTOSIS IN RATS IN PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

32

Mishchenko O. Ya., Tyhonov O. I., Hrashchenkova S. A., Yudkevych T. K., Horban Ye. M. (Kharkiv, Kyiv) ACTOPROTECTIVE ACTIVITY OF NEW COMBINED DRUG "APITAR"

36

Avramenko A. I., Safonov A. A., Roman O. B. (Zaporizhzhya) STUDY OF PHYSICAL AND CHEMICAL PECULIARITIES OF SALTS OF 1,2,4-TRIAZOL-3-ILTIOACETIC ACIDS

40

Kotlyarenko L. T., Yarema O. M. (Ternopil) CHANGES ON THE FUNCTIONAL STATE AND MORPHO-STRUCTURE OF SMALL INTESTINE AT THE EXPERIMENTAL DAMAGE OF ORGANISM BY ALUMINUM CHLORIDE

44

Tsuber V. Yu. (Poltava) SALIVARY ALPHA-AMYLASE AS A MARKER OF ORGANISM REACTION TO PSYCHOEMOTIONAL STRESS

48

Loy T. O., Tyupka T. I., Kononenko N. M. (Kharkiv) STUDY OF GASTROTOXICITY OF METHYL ESTER N-[(2-OXOINDOLINILIDEN-3)-2-OXIACETIL] - AMINOACETIC ACID

52

Ivanusa I. B., Klishch I. M., Kernychna I. Z., Vasylyshyn N. A. (Ternopil) EFFECT OF ACETAMINOPHEN ON THE ACTIVITY OF LIPID PEROXIDATION PROCESSES AND THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF RAT-PUBERTAL FEMALES ON THE BACKGROUND OF PROLONGED USE OF PROGESTIN AND ESTROGEN

56

Bannyi I. P., Heorhiyants V. A., Banna N. I., Kryskiv O. S., Savchenko V. M. (Kharkiv) SYNTHESIS, PHARMACOLOGICAL PROPERTIES AND ACUTE TOXICITY OF THE γ -(R-PHENYLSULFONYLOXAMIDO)-BUTANOIC ACIDS

63

<i>Крижна С. І.</i> (Харків) СТАН ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ І АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ПОРУШЕННЯМ ПОРФІРИНОВОГО ОБМІНУ	68	<i>Kryzhna S. I.</i> (Kharkiv) THE STATE OF THE PEROXIDE OXIDATION OF LIPIDS AND ANTIOXIDANT SYSTEM IN RATS DURING THE EXPERIMENTAL DISTURBANCE OF THE PORPHYRIN EXCHANGE	
<i>Фаді Ал Зедан, Гладисhev В. В., Бурлака Б. С., Кечин І. Л.</i> (Запоріжжя) РОЗРОБКА Й БІОФАРМАЦЕВТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ СУПОЗИТОРІЇВ З АМЛОДИПІНОМ	72	<i>Fadi Al Zedan, Hladyshv V. V., Burlaka B. S., Kechyn I. L.</i> (Zaporizhzhya) DEVELOPMENT AND BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH OF SUPPOSITORIES WITH AMLODIPINE	
<i>Торянік Е. Л.</i> (Харків) ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НИРОК ЗА УМОВ ГІПЕРГІДРАТАЦІЇ ОРГАНІЗМУ У ВАГІТНИХ ЩУРІВ-САМОК	76	<i>Toryanik E. L.</i> (Kharkiv) FUNCTIONAL STATE OF THE KIDNEYS DURING HYPERHYDRATION OF PREGNANT FEMALE RATS ORGANISMS	
<i>Перехода Л. О., Северіна Г. І., Георгіянц В. А., Гриненко В. В.</i> (Харків) ФАРМАКОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНИХ ТРИАЗОЛОПІРИМІДИНУ ТА КІЛЬКІСНІ СПІВВІДНОШЕННЯ "СТРУКТУРА-ПРОТИСУДОМНА АКТИВНІСТЬ"	79	<i>Perekhoda L. O., Severina H. I., Heorhiyants V. A., Hrynenko V. V.</i> (Kharkiv) PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF DERIVATIVES TRYAZOLOPIRYMIDYNS AND QUANTITATIVE RATIO "STRUCTURE-ANTICONVULSANT ACTIVITY"	
<i>Парченко В. В.</i> (Запоріжжя) ГІСТОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ М'ЯКИХ ТКАНИН ОВЕЦЬ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНИМ ПРОЦЕСОМ НА ФОНІ ВИКОРИСТАННЯ ПОХІДНИХ 5-(ФУРАН-2-ІЛ)-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТІОНІВ	84	<i>Parchenko V. V.</i> (Zaporizhzhya) HISTOLOGICAL EXAMINATIONS OF SHEEP SOFT TISSUE WITH EXPERIMENTAL PURULENT-INFLAMMATORY PROCESS ON THE BACKGROUND OF THE USE OF DERIVATIVES OF 5-(FURAN-2-YL)-1,2,4-TRIAZOL-3-TIONS	
<i>Загайко А. Л., Филимоненко В. П., Красильнікова О. А., Кравченко Г. Б., Шишкіна Н. В.</i> (Харків) ВПЛИВ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ ЕКСТРАКТІВ З НАСІННЯ ВИНОГРАДУ НА ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНІ ПОКАЗНИКИ ТКАНИН ЩУРІВ В УМОВАХ СТРЕСУ	90	<i>Zahayko A. L., Fylymonenko V. P., Krasilnikova O. A., Kravchenko H. B., Shyshkina N. V.</i> (Kharkiv) THE INFLUENCE OF POLYPHENOLIC EXTRACTS FROM GRAPE'S SEEDS ON PROOXIDANT-ANTIOXIDANT PARAMETERS IN RAT TISSUES UNDER STRESS	
<i>Білай І. М., Остапенко А. О., Романенко М. І.</i> (Запоріжжя) ВИВЧЕННЯ АНТИАГРЕГАНТНОЇ ТА АНТИКОАГУЛЯНТНОЇ АКТИВНОСТІ 7-(2'-ГІДРОКСИ-3'-ІЗОПРОПОКСИ)ПРОПІЛ-3-МЕТИЛ-8-(4'-ФЕНІЛПІПЕРАЗИН-1'-ІЛ)-КСАНТИНУ В ЩУРІВ НА ФОНІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІПЕРЛІПІДЕМІЇ	95	<i>Bilay I. M., Ostapenko A. O., Romanenko M. I.</i> (Zaporizhzhya) STUDY OF THE ANTIADGESION AND ANTICOAGULATION ACTIVITY OF 7-(2'-HYDROXY-3'-ISOPROPOXY) PROPYL-3-METHYL-8-(4'-FENILPIPERAZIN-1'-YL)-XANTHINE IN RATS ON THE BACKGROUND OF THE EXPERIMENTAL HYPERLIPIDEMY	
<i>Алексєєва М. О., Березнякова А. І.</i> (Харків) ОЦІНКА МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ УРОКСАЛІНУ В КУЛЬТУРІ ЛІМФОЦИТІВ ЛЮДИНИ	99	<i>Aleksieyeva M. O., Bereznyakova A. I.</i> (Kharkiv) EVALUATION OF MUTAGENIC ACTIVITY OF UROKSA-LIN IN CULTURE OF HUMAN LYMPHOCYTES	
<i>Герашченко І. І., Маркіна А. І., Туров В. В.</i> (Київ) СТРУКТУРА ЗВ'ЯЗНОЇ ВОДИ В СКЛОПОДІБНОМУ ТІЛІ ЗА ДАНИМИ ¹ H ЯМР-СПЕКТРОСКОПІЇ	102	<i>Herashchenko I. I., Markina A. I., Turov V. V.</i> (Kyiv) STRUCTURE OF BOUND WATER IN VITREOUS BODY BY ¹ H NMR SPECTROSCOPY	
<i>Макаренко О. А.</i> (Одеса) ДЕСТРУКТИВНА РОЛЬ ЕЛАСТАЗИ В ПАТОГЕНЕЗІ ОСТЕОПОРОЗУ ТА ІНГІБІЦІЯ ЇЇ АКТИВНОСТІ ФЛАВОНОЇДАМИ	107	<i>Makarenko O. A.</i> (Odessa) THE DESTRUCTIVE ROLE OF ELASTASE IN PATHOGENESIS OF OSTEOPOROSIS AND INHIBITION OF ITS ACTIVITY WITH FLAVONOIDS	
<i>Козак Д. В.</i> (Тернопіль) ДИНАМІКА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В РАНЬОМУ ПЕРІОДІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТЯЖКОЇ ТРАВМИ	112	<i>Kozak D. V.</i> (Ternopil) THE DYNAMICS OF ANTIOXIDANT DEFENSE IN THE EARLY STAGE OF EXPERIMENTAL SEVERE INJURY	
МЕТОДИ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ		METHODS OF BIOCHEMICAL INVESTIGATIONS	
<i>Левачкова Ю. В., Здорик О. А.</i> (Харків) РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МЕТРОНІДАЗОЛУ В ПЕСАРІЯХ	115	<i>Levachkova Yu. V., Zdoryk O. A.</i> (Kharkiv) DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METRONIDAZOLE QUANTITATIVE DETERMINATION METHOD IN PESSARIES	
<i>Іванчук І. М., Болотов В. В., Клименко Л. Ю., Шовкова З. В.</i> (Харків) РОЗРОБКА МЕТОДИК ІЗОЛЮВАННЯ ДОНОРМІЛУ З БІОЛОГІЧНИХ РІДИН ОРГАНІЗМУ	121	<i>Ivanchuk I. M., Bolotov V. V., Klymenko L. Yu., Shovkova Z. V.</i> (Kharkiv) DEVELOPMENT OF DONORMIL ISOLATION METHODS FROM ORGANISM BIOLOGICAL LIQUIDS	
ОГЛЯД		REVIEW	
<i>Береговий С. М., Толстанова Г. М.</i> (Київ) EGR-1 – ФАКТОР ТРАНСКРИПЦІЇ ПРИ ПАТОЛОГІЯХ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ	125	<i>Berehovyi S. M., Tolstanova H. M.</i> (Kyiv) EGR-1 – TRANSCRIPTION FACTOR IN PATHOGENESIS OF GASTROINTESTINAL TRACT	

В. В. Конопельнюк, К. Р. Середницька, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ВПЛИВ m-ХЛОРОФЕНІЛПІПЕРАЗИНУ НА ВМІСТ СЕРОТОНІНУ В МОЗКУ ТА СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2 ТИПУ

Досліджено вплив m-хлорофенілпіперазину (mCPP) на вміст серотоніну в мозку та сироватці крові щурів за умов експериментального цукрового діабету (ЦД) 2 типу. При введенні mCPP, на фоні зростання вмісту серотоніну в мозку, встановлено значне зниження вмісту глюкози в крові. Отримані результати свідчать про можливу нормалізацію вуглеводного обміну в щурів з ЦД 2 типу та прямий вплив серотонінергічної системи на інсулярний апарат.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: серотонін, глюкоза, m-хлорофенілпіперазин, цукровий діабет 2 типу.

ВСТУП. Серотонін – біологічно активна речовина, яка характеризується широким діапазоном впливу на організм [15, 18]. Виконуючи функції нейротрансмітера і тканинного гормону, серотонін залучений до процесів звуження судин, скорочення гладкої мускулатури, формування больових відчуттів, контролю сну; відіграє важливу роль у регуляції емоційної, статевої і харчової поведінки. Відомо, що серотонін бере участь у діяльності центральної нервової системи, залучений до енергетичного обміну та підвищує рівень глюкози [9, 10]. Тому викликає певний інтерес аналіз вмісту серотоніну в мозку та крові щурів за розвитку експериментального цукрового діабету 2 типу, оскільки одним з основних порушень при даному патологічному стані є збільшення вмісту глюкози в крові хворих.

Цукровий діабет (ЦД) 2 типу – хронічне ендокринне захворювання, основними патогенетичними факторами якого є гіперглікемія, зниження чутливості периферичних тканин до інсуліну та порушення функціонування β-клітин підшлункової залози. Даний патологічний стан характеризується насамперед збільшенням вмісту глюкози і вільних жирних кислот у периферичній крові хворих та супроводжується появою інших метаболічних порушень, таких, як ожиріння, дисліпідемія, збільшення в плазмі кількості маркерів запалення, гіперкоагуляція з пригніченою фібринолітичною активністю, судинні пошкодження, гіпертензія. Актуальність проблеми ЦД 2 типу зумовлена значною поширеністю захворювання, а також

© В. В. Конопельнюк, К. Р. Середницька, О. М. Савчук, Л. І. Остапченко, 2011.

тим, що він є базою для розвитку складних супутніх захворювань та ускладнень, ранньої інвалідності та смертності. Сьогодні відбувається пошук нових антидіабетичних препаратів, серед яких не останнє місце можуть зайняти модулятори функціонування серотонінергічної системи.

Мета-хлорофенілпіперазин (mCPP) – хімічна сполука, похідне тразодону та нефазодону, що впливає на регуляцію функціонування центральної нервової системи, яка пов'язана із серотоніном [14]. Мета-хлорофенілпіперазин як агоніст серотонінергічних 5-HT₁, 5-HT_{1A}, 5-HT₂ та 5-HT_{2C}, антагоніст 5HT_{2B}, 5-HT₃ рецепторів широко використовують у дослідженнях нервових розладів, пов'язаних з порушеннями серотонінергічної системи організму [4, 6, 8, 13]. Також він підвищує вивільнення серотоніну, залежного від транспортера серотоніну [2, 5, 11, 12].

Метою роботи було дослідити зміни вмісту серотоніну в мозку та сироватці крові щурів з ЦД 2 типу при введенні m-хлорофенілпіперазину протягом 14 діб.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на білих нелінійних щурах обох статей. Експериментальний ЦД 2 типу викликали згідно з методом [7]. Для підтвердження розвитку стану інсулінорезистентності у дослідних тварин визначали чутливість периферичних тканин до інсуліну за допомогою інсуліно-глюкозотолерантного тесту [17], проведеного з власними модифікаціями.

Розчин mCPP вводили інтраперитонеально з розрахунку 1,25 мг на 1 кг маси тіла про-

тягом 7 та 14 днів. Контрольну групу складали щури, яким протягом 7 та 14 днів інтраперитонеально в тому ж об'ємі вводили 0,9 % розчин хлориду натрію, який використовували для розведення mCPP. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію. Масу тіла щурів та кількість спожитої ними їжі визначали щоденно протягом 7 та 14 днів у той самий час.

Тварин забивали шляхом декапітації. Мозок щура видаляли з основи черепа і поміщали у 0,9 % розчин хлориду натрію, після чого заморожували при температурі мінус 80 °С.

Головний мозок розморожували при кімнатній температурі, після чого зважували та гомогенізували в 0,4 М HClO_4 у співвідношенні 1:5. Гомогенат витримували 60 хв при 4 °С, потім центрифугували 5 хв при 800 g при 0 °С. Тканинний екстракт наносили на колонку з КМ-сефарозою, попередньо урівноважену 0,01 М Na-фосфатним буфером, рН 6,2. Елюцію проводили при кімнатній температурі 0,03 М Na-фосфатним буфером, рН 6,2. До 1 мл елюату додавали 0,3 мл 12 н HCl . Одразу після додавання визначали вміст серотоніну на спектрофотофлуориметрі (хвиля збудження – 295 нм, хвиля люмінесценції – 550 нм) [1]. Контрольна проба містила 1 мл дистильованої води та 0,3 мл 12 н HCl . Вміст серотоніну в мозку перераховували на 1 г тканини, в крові – на 1 мг білка. Концентрацію білка в зразках визначали за методом Бредфорд [3].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерних програм "MS Excel XP" та "OriginPro 7,5".

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Розвиток ЦД 2 типу супроводжується тривалими порушеннями вуглеводного, ліпідного та білкового обмінів, що призводить до патологічних змін у функціонуванні різних органів і систем. Оскільки одним з основних порушень при ЦД 2 типу є збільшення вмісту глюкози в крові хворих, а серотонін підвищує рівень глюкози та бере участь у регуляції харчової поведінки, цікаво було простежити за зміною маси тіла тварин та кількістю спожитої ними їжі.

В результаті проведених досліджень нами встановлено, що маса тіла щурів контрольної групи і тварин з експериментальним ЦД 2 типу не змінювалась протягом 14 днів (рис. 1). Проте при введенні mCPP на 7 добу вона знижувалась до $(85 \pm 1,11) \%$ ($p < 0,05$ порівняно з 1-ю добою) від початкових значень, повертаючись до норми на 14 добу.

Кількість корму, яку тварини з'їдали щоденно, не змінювалась протягом 14 днів у контрольній групі та групі щурів з експерименталь-

ним ЦД 2 типу. Спостерігалось підвищення кількості спожитої їжі у контрольній групі та групі щурів з експериментальним ЦД 2 типу в період з 2 до 10 доби введення препарату (рис. 2). На 14 добу кількість спожитого корму поверталась до 1-ї доби. В результаті проведених досліджень встановлено зниження маси тіла та підвищення кількості спожитої їжі в щурів при введенні препарату, що може бути причиною опосередкованого впливу mCPP на енергетичні витрати організму.

У ході досліджень нами показано, що у дослідних тварин розвиток експериментального ЦД 2 типу супроводжувався появою гіперглікемії натще. У групі щурів з моделлю ЦД 2 типу вміст глюкози в крові натще на 54 % перевищував значення контрольної групи тварин. Збільшення вмісту глюкози в крові може бути викликане різними причинами, а саме: зниженням транспорту глюкози в клітини інсуліночутливих тканин, порушенням внутрішньоклітинного метаболізму глюкози, зменшенням

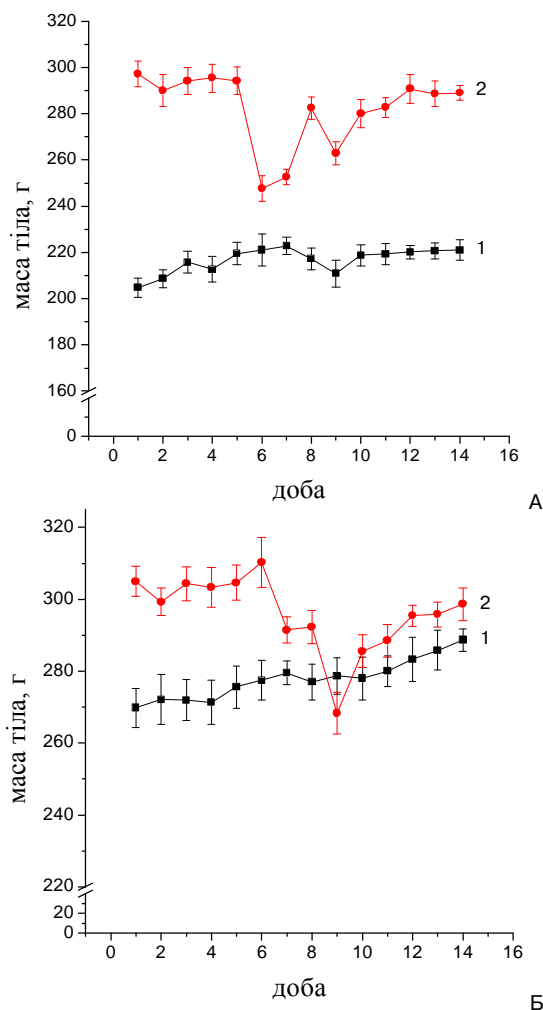


Рис. 1. Маса тіла щурів контрольної групи (А) і тварин з експериментальним ЦД 2 типу (Б): 1 – без введення m-хлорофенілпіперазину; 2 – при введенні m-хлорофенілпіперазину.

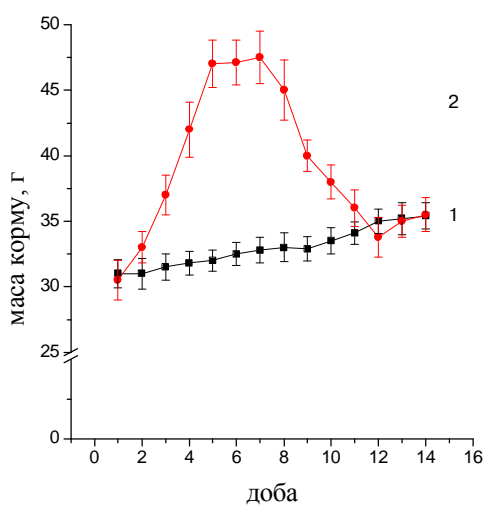
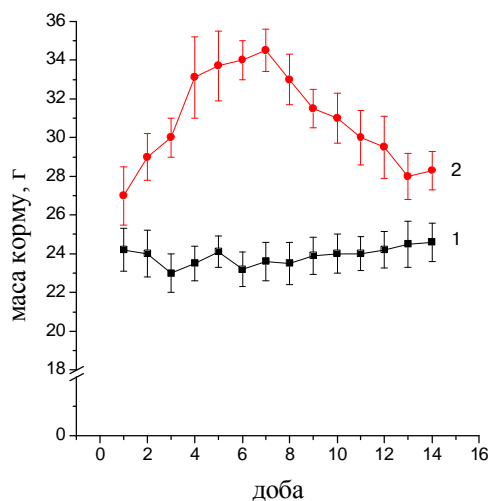


Рис. 2. Споживання їжі у контрольній групі щурів (А) та групі тварин з експериментальним ЦД 2 типу (Б): 1 – без введення *m*-хлорофенілпіперазину; 2 – при введенні *m*-хлорофенілпіперазину.

її утилізації, зниженням синтезу та підвищенням розпаду глікогену в печінці [17].

У контрольній групі тварин, яким вводили *m*СРР, вміст глюкози знижувався на 7 добу до 70 % (рис. 3, А). Фіксували значне зменшення вмісту глюкози до 62 % на 7 добу в тварин з експериментальною моделлю ЦД 2 типу (рис. 3, Б), яким вводили *m*СРР, яке майже не змінювалось на 14 добу.

Вивчення вмісту серотоніну показало різнонаправлені його зміни в тканинах мозку та сироватці крові експериментальних тварин порівняно з контрольною групою (рис. 4). Встановлено підвищення вмісту серотоніну в сироватці крові щурів з експериментальним ЦД 2 типу в 1,6 раза порівняно з показниками контрольної групи. При введенні *m*СРР вміст серотоніну в сироватці крові збільшувався в 1,4 раза на 7 добу. В групі тварин з ЦД 2 типу не спостерігалось достовірних змін вмісту се-

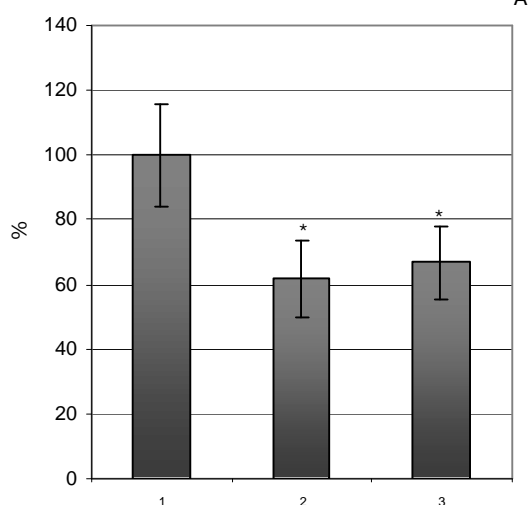
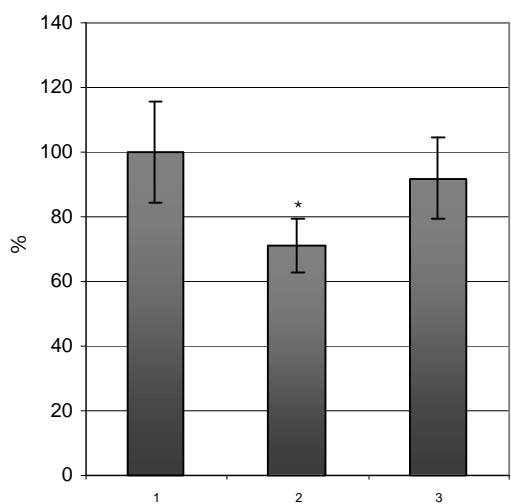


Рис. 3. Зміни глюкози в крові натще (контроль – 100 %) у контрольній групі тварин (А) та групі щурів з експериментальною моделлю ЦД 2 типу (Б): 1 – до введення *m*СРР; 2 – після 7 днів введення *m*СРР; 3 – після 14 днів введення *m*СРР.

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з даними контрольної групи.

ротоніну в сироватці крові протягом усього дослідження.

Встановлено зниження вмісту серотоніну в тканині мозку діабетичних тварин у 2 рази порівняно з контрольною групою. Введення *m*СРР щурам з експериментальним ЦД 2 типу призводило до підвищення досліджуваного показника в 1,7 раза на 7 добу.

Можливою причиною такого дисбалансу може бути порушення функціонування ентохромафінних клітин шлунково-кишкового тракту (ШКТ), які вивільняють серотонін у відповідь на надходження їжі до порожнини шлунка. У діабетичних щурів показано морфологічні зміни ентохромафінних клітин ШКТ, зокрема виникнення великих серотонінпозитивних клітин у місцях слизової, чого не спо-

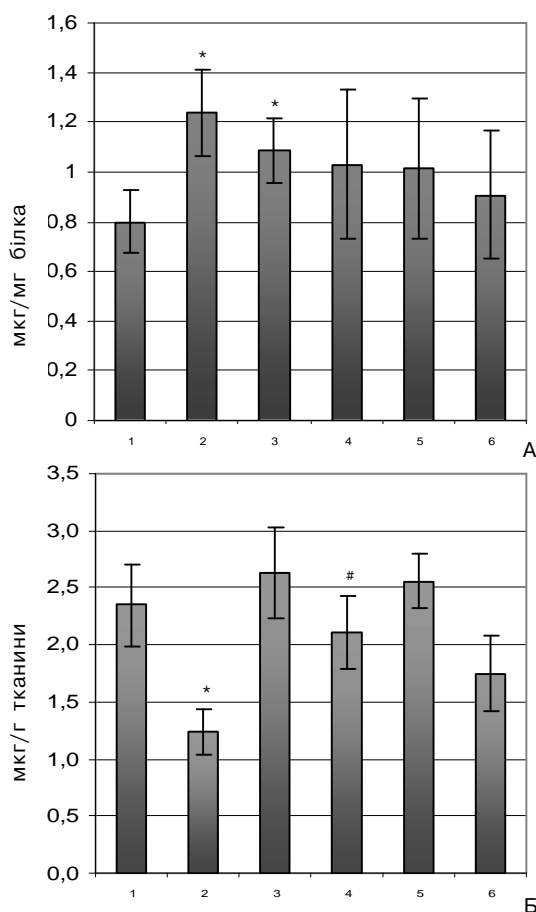


Рис. 4. Вміст серотоніну в сироватці крові (А) та мозку (Б): 1 – у контрольній групі тварин; 2 – у щурів з ЦД 2 типу; 3 – у контрольній групі тварин після 7 днів введення mCPP; 4 – у групі щурів з ЦД 2 типу після 7 днів введення mCPP; 5 – у контрольній групі тварин після 14 днів введення mCPP; 6 – у групі щурів з ЦД 2 типу після 14 днів введення mCPP.

Примітка. * – $p \leq 0,05$ порівняно з даними контрольної групи; # – $p \leq 0,05$ порівняно з даними групи тварин з ЦД 2 типу.

стерігали у тварин контрольної групи. Крім того, відомо, що діабетичні тварини мають значно більший вміст серотоніну в ШКТ [16].

Таким чином, підвищення вмісту периферичного серотоніну в щурів з ЦД 2 типу може

бути викликане гіперфункцією ентерохроматинних клітин ШКТ у діабетичних тварин та/або порушенням функціонування судинно-тромбоцитарної ланки системи гемостазу. Дисбаланс у системі гемостазу пов'язаний з гіперфункцією тромбоцитів, що зумовлена патогенетичними особливостями перебігу ЦД 2 типу. Зважаючи на те, що тромбоцити є місцем зберігання і транспортування периферичного серотоніну, це може бути причиною підвищення його вмісту в сироватці крові.

Зниження синтезу серотоніну, посилення його зв'язування з рецепторами й підвищення ефективності його зворотного захоплення, імовірно, є причинами зниження вмісту серотоніну в тканинах мозку при ЦД 2 типу. Збільшення вмісту серотоніну в мозку тварин після введення mCPP можна пояснити взаємодією препарату із серотоніновими транспортерами, що стимулює викид серотоніну із цитоплазми нейрона в синаптичну щілину.

Результати проведених нами досліджень свідчать про вплив m-хлорофенілпіперазину на вміст серотоніну в мозку щурів з експериментальним ЦД 2 типу. Даний препарат посилює вивільнення серотоніну через транспортери, пригнічує зворотне захоплення серотоніну, що покращує серотонінергічну передачу імпульсів до центрів гіпоталамуса. Це призводить до зміни харчової поведінки й змушує тварин споживати більшу кількість їжі, виходячи не з потреб основного обміну, а з необхідності стимулювати серотонінергічну систему ЦНС.

ВИСНОВОК. Показана нормалізація вмісту глюкози після введення mCPP підтверджує взаємозв'язок між функціонуванням серотонінергічної системи та вмістом глюкози в крові. Зважаючи на це, перспективними є більш поглиблені дослідження причинно-наслідкових зв'язків серотонінергічної системи та вуглеводного обміну при ЦД 2 типу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Максименко Е. Г. Уровень триптофана и серотонина в условиях судорожной активности головного мозга / Е. Г. Максименко, В. Н. Савченко // Вісник Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. Медицина. – 2000. – **1**, № 494. – С. 40–43.
2. Baumann M. H. Auerbach Intravenous administration of the serotonin agonist m-chlorophenylpiperazine (mCPP) increases extracellular serotonin in the diencephalon of awake rats / M. H. Baumann, J. J. Rutter // *Neuropharmacology*. – 1993. – **32**, № 12. – P. 1381–1386.

3. Bradford M. M. // *Analyt. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248–254.
4. m-Chlorophenylpiperazine (mCPP) is an antagonist at the cloned human 5-HT_{2B} receptor / D. R. Thomas, T. L. Gager, V. Holland [et al.] // *Neuroreport*. – 1996. – **7**. – P. 1457–1460.
5. Effects of mCPP on the extracellular concentrations of serotonin and dopamine in rat brain / E. Eriksson, G. Engberg, O. Bing, H. Nissbrandt // *Neuropsychopharmacology*. – 1999. – **20**. – P. 287–296.
6. Hamik A. 1-(m-chlorophenyl)piperazine (mCPP) interactions with neurotransmitter receptors in the human

brain / A. Hamik, S. J. Peroutka // Biol. Psychiatry. – 1989. – **25**. – P. 569–575.

7. Hemmings S. J. Neonatal STZ model of type II diabetes mellitus in the Fischer 344 rat: characteristics and assessment of the status of the hepatic adrenergic receptors / S. J. Hemmings, D. Spafford // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2000. – **32**. – P. 905–919.

8. Kahn R. S. m-Chlorophenylpiperazine as a probe of serotonin function / R. S. Kahn, S. Wetzler // Biol. Psychiatry. – 1991. – **30**, № 11. – P. 1139.

9. Kang Y. M. Serotonin modulates hypothalamic neuronal activity // Int. J. Neurosci. – 2004. – **114**, № 3. – P. 299–319.

10. Lam D. D. Serotonin and energy balance: molecular mechanisms and implications for type 2 diabetes / D. D. Lam, L. L. Heisler // Cambridge University Press. – 2007. – **9**. – P. 5.

11. Lucki I. Effect of 1-(m-chlorophenyl)piperazine and 1-(m-trifluoromethylphenyl) piperazine on locomotor activity / I. Lucki, H. R. Ward, A. Frazer // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1989. – **249**, № 1. – P. 155–164.

12. Pettibone D. J. Serotonin-releasing effects of substituted piperazines in vitro / D. J. Pettibone, M. Williams // Biochem. Pharmacol. – 1984. – **33**, № 9. – P. 1531–1535.

13. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of oral and intravenous meta-chlorophenylpiperazine in healthy volunteers / H. J. Gijssman, J. M. Van Gerven, M. C. Tieleman [et al.] // J. Clin. Psychopharmacology. – 1998. – **18**. – P. 289–295.

14. p-Methylthioamphetamine and 1-(m-chlorophenyl)piperazine, two non-neurotoxic 5-HT releasers in vivo, differ from neurotoxic amphetamines derivatives in their mode of action at 5-HT nerve endings in vitro / M. Gobbi, M. Moia, L. Pirroni [et al.] // J. Neurochem. – 2002. – **82**. – P. 1435–1443.

15. Sakowski S. A. Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies / S. A. Sakowski // Brain Res. – 2006. – **1085** (1) – P.11–18.

16. Serotonin-producing enterochromaffin (EC) cells of gastrointestinal mucosa in dexamethasone-treated rats / R. Glisic, V. Koko, V. Todorovic [et al.] // Regul. Pept. – 2006. – P. 30–39.

17. The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolism characters / F. Zhang, C. Ye, G. Li [et al.] // Exp. Anim. – 2003. – **52**, № 5. – P. 401–407.

18. Walther D. J. Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform / D. J. Walther // Science. – 2003. – P. 76.

В. В. Конопельнюк, К. Р. Середницька, А. Н. Савчук, Л. І. Остапченко
КИЄВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

ВЛИЯНИЕ m-ХЛОРОФЕНИЛПИПЕРАЗИНА НА СОДЕРЖАНИЕ СЕРТОНИНА В МОЗГЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 2 ТИПА

Резюме

Исследовано влияние m-хлорофенилпиперазина (mCPP) на содержание серотонина в мозге и сыворотке крови крыс в условиях экспериментального сахарного диабета (СД) 2 типа. При введении mCPP, на фоне роста содержания серотонина в мозге, установлено значительное снижение содержания глюкозы в крови. Полученные результаты свидетельствуют о возможной нормализации углеводного обмена у крыс с СД 2 типа и прямом влиянии серотонинэргической системы на инсулярный аппарат.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: серотонин, глюкоза, m-хлорофенилпиперазин, сахарный диабет 2 типа.

V. V. Konopelnyuk, K. R. Serednytska, O. M. Savchuk, L. I. Ostapchenko
TARAS SHEVCHENKO KYIV NATIONAL UNIVERSITY

THE EFFECT OF m-CHLOROPHENYLPIPERAZINE ON THE CONTENT OF SEROTONIN IN BRAIN AND BLOOD SERUM OF RATS UNDER THE CONDITIONS OF EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS OF TYPE 2

Summary

The effect of meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) on the content of serotonin was examined in brain and blood serum of rats under the conditions of experimental diabetes mellitus (DM) of type 2. The present study showed significant decrease of glucose content in serum and increasing of serotonin content in brain during mCPP introduction in rats. The results testify to the normalization of metabolism of carbohydrates in rats with diabetes mellitus of type 2 and the direct effect of serotonergic system on the insulin mechanism.

KEY WORDS: serotonin, glucose, meta-chlorophenylpiperazine, type 2 diabetes mellitus of type 2.

Отримано 22.03.11

Адреса для листування: В. В. Конопельнюк, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Васильківська, 94, Київ, Україна.

А. П. Бурлака², І. І. Ганусевич², Є. П. Сидорик², Л. А. Мамонтова²,
О. Б. Кучменко¹, Д. М. Петухов¹, Н. В. Делеменчук¹, Г. В. Донченко¹

ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМЕНІ О. В. ПАЛЛАДІНА НАН УКРАЇНИ¹, КИЇВ
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ І РАДІОБІОЛОГІЇ ІМЕНІ Р. Є. КАВЕЦЬКОГО
НАН УКРАЇНИ², КИЇВ

АКТИВНІСТЬ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ У ТКАНИНАХ ЩУРІВ ЗА ВВЕДЕННЯ ДОКСОРУБЦИНУ ТА ДІЇ КОМПЛЕКСУ ПОПЕРЕДНИКІВ І МОДУЛЯТОРІВ БІОСИНТЕЗУ УБІХІНОНУ

Важливою складовою токсичного ефекту доксорубіцину є активація матриксних металопротеїназ внаслідок підвищення рівня $O_2^{\cdot-}$ та NO, що спричиняє посилення деструкції міжклітинного матриксу.

Застосування разом із доксорубіцином комплексу попередників і модуляторів убіхінону достовірно значно знижує рівні генерування супероксидних радикалів, оксиду азоту та активності матриксних металопротеїназ у тканинах, що призводить до зменшення деструкції міжклітинного матриксу і, таким чином, суттєво нівелює токсичну дію доксорубіцину.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: убіхінон, матриксні металопротеїнази, супероксидний аніон-радикал, оксид азоту.

ВСТУП. Доксорубіцин є антибіотиком антрациклінового ряду, який досить широко використовують як антинеопластичний агент. Проте його дозозалежний протипухлинний ефект прямо корелює з дозозалежним проявом токсичності відносно печінки, серця та інших органів [3, 14]. Однією з причин пошкоджувального впливу доксорубіцину є активування процесів вільнорадикального окиснення і розвиток окисного стресу [10, 19].

Регуляція сталості й деградації міжклітинного матриксу необхідна для нормального перебігу багатьох фізіологічних процесів. Розвиток низки патологічних процесів, зокрема серцево-судинних, онкологічних, аутоімунних захворювань тощо, пов'язаний з порушенням регуляції деградації міжклітинного матриксу. Важливу роль у цьому процесі, крім інших ферментів, відіграють ферменти родини матриксних металопротеїназ (ММП), які здатні руйнувати білки міжклітинного матриксу та базальних мембран: колагени, протеоглікани, еластин, ламінін, фібронектин та ін. [2, 12, 21, 22, 24, 25]. Порушення регуляції активності ММП та їх надмірну активацію розглядають на сьогодні як один із ранніх механізмів ініціації та розвитку серцевої недостатності [22].

© А. П. Бурлака, І. І. Ганусевич, Є. П. Сидорик, Л. А. Мамонтова, О. Б. Кучменко, Д. М. Петухов, Н. В. Делеменчук, Г. В. Донченко, 2011.

ММП належать до родини Zn-залежних ендопептидаз. За первинною структурою, субстратною специфічністю та клітинною локалізацією ці ферменти можна поділити на чотири основні підгрупи: колагенази, желатинази, стромелізини та мембранозв'язані ММП [26].

ММП-2 і ММП-9, які ми вивчали, належать до підродини желатиназ. Ці ферменти можуть руйнувати колагени типів IV, V, еластин у складі базальних мембран та денатурований колаген (желатин), чим вони доповнюють функції колагеназ у процесах деградації фібрилярних колагенів [26].

Убіхінон (CoQ) відіграє центральну роль у мітохондріальних біоенергетичних процесах, є важливим жиророзчинним антиоксидантом. Проблема забезпечення організму людини та тварин CoQ за рахунок його ендogenous синтезу завжди є актуальною у зв'язку з тим, що це досить складний багатостадійний процес, який залежить від багатьох причин, включає дуже тонкі механізми його регуляції, що часто порушуються як у здоровому організмі (за умов недостатнього, нераціонального харчування, нестачі вітамінів, екологічних порушень), так і при різноманітних захворюваннях, що супроводжуються порушенням енергетичного обміну загалом та гальмуванням біосинтезу CoQ зокрема [4, 11, 20].

Сьогодні препарати CoQ набули широко застосування при дерматологічних проблемах, зокрема в косметології, причому одним з вагомих факторів протекторного впливу CoQ визнано зменшення експресії та активності ММП [9, 18]. Також є досвід застосування препаратів CoQ при серцево-судинних, онкологічних та інших захворюваннях [13, 16]. В патогенезі цих захворювань важливу роль відіграє стан міжклітинного матриксу. Так, ефект CoQ на ММП на сьогодні продемонстровано в дослідженнях на пухлинних клітинах MCF-7, де спостерігали зменшення активності ММП-2 [15].

Тому метою даної роботи було дослідити активність ММП-2 і ММП-9 та швидкість генерування супероксидних аніон-радикалів і оксиду азоту в тканинах печінки, серця, нирок і мозку щурів за умов введення доксорубіцину та дії комплексу попередників і модуляторів біосинтезу CoQ.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В досліді використовували щурів-самців масою 180–220 г. Тварин було поділено на 3 групи: 1-ша – контрольні (інтактні) тварини; 2-га – тварини, яким вводили доксорубіцин (Д); 3-тя – тварини, яким на фоні введення доксорубіцину вводили α -токоферилацетат, ПОБК і М (комплекс ЕПМ) [7].

Доксорубіцин (Доксорубіцин-КМП, доксорубіцину гідрохлорид, ВАТ “Київмедпрепарат”, Україна) вводили внутрішньочеревно в дозі 2,2 мг/кг маси тіла щоденно протягом 8 днів [8, 23]. Контрольна група щурів отримувала фізіологічний розчин у такому ж об’ємі. Біологічно активні сполуки тварини одержували перорально протягом 8 днів паралельно із введенням доксорубіцину.

Щурів декапітували з урахуванням вимог Міжнародної конвенції з правил гуманного поводження з дослідними тваринами.

Ступінь генерування супероксидних аніон-радикалів та оксиду азоту оцінювали методом ЕПР на комп’ютеризованому спектрометрі PE-1307. Для визначення рівнів генерування NO NO-синтазами використовували спіновий уловлювач – діетилдитіокарбамат, а реєстрацію проводили при температурі рідкого азоту (77 K). Швидкість генерування супероксидних радикалів визначали із застосуванням спінового уловлювача – 4-гідрокси-2,2,6,6-тетраметилпіперидин-1-оксил за умов кімнатної температури [1].

Концентрації активних форм ММП-2 і ММП-9 оцінювали методом зимографії в 12 % поліакриламідному гелі з додецилсульфатом на-

трію та 0,1 % желатином як субстратом [17]. Електрофорез проводили при 4 °С, 150 V протягом 4 год. Після розділення білків гель відмивали в 2,5 % розчині тритону X-100, потім інкубували в буфері з CaCl₂ (pH 7,5) протягом 18 год при 37 °С, фіксували і фарбували 0,25 % Кумасі діамантовим синім та візуалізували, як описано [17]. Протеолітичну активність оцінювали шляхом вимірювання розмірів зони лізису, використовуючи тест-системи для ММП-2 і ММП-9 (Sigma, USA). Результати оброблено з використанням стандартної програми “TotalLab1.01”.

Результати роботи оброблено за допомогою методів варіаційної статистики. Числові дані наведено у формі середньої величини з стандартною помилкою ($M \pm m$). Достовірність різниці двох середніх величин оцінювали за критерієм Стюдента (t).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати проведених досліджень показали, що за введення тваринам доксорубіцину спостерігалось зростання швидкості генерування супероксидних радикалів у тканинах печінки, серця, нирок і мозку (рис. 1). Разом із цим, у тканинах вказаних органів відзначали достовірне підвищення рівня оксиду азоту порівняно з контрольними тваринами (рис. 2).

За умов застосування комплексу попередників та медіаторів біосинтезу убіхінону ЕПМ спостерігалось достовірне зниження швидкості генерування супероксидних радикалів в тканинах печінки, серця, нирок та мозку тварин, які отримували доксорубіцин (рис. 1). Такі ж зміни відбувались і з вмістом оксиду азоту – вони наближались до величин цього показника у контрольних тварин (рис. 2).

Показано, що за введення доксорубіцину достовірно зростала активність ММП-2 і ММП-9 у всіх досліджених тканинах порівняно з кон-

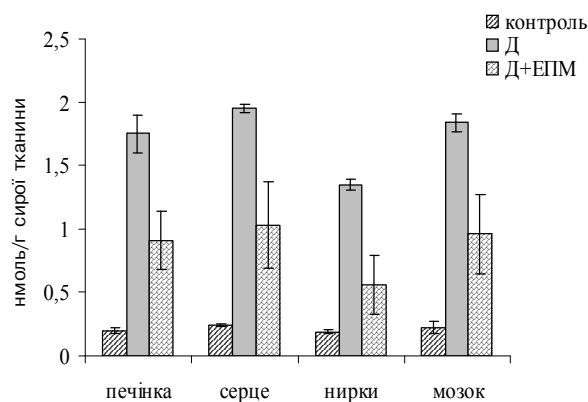


Рис. 1. Рівні швидкості генерування супероксидних радикалів в органах тварин за введення доксорубіцину та дії комплексу ЕПМ ($M \pm m$, $n=5$).

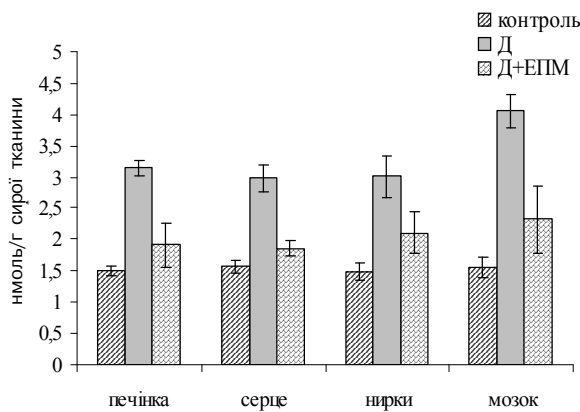


Рис. 2. Рівень оксиду азоту в органах тварин за введення доксорубіцину та дії комплексу ЕПМ ($M \pm m$, $n=5$).

трольними величинами (рис. 3, 4 відповідно). Особливо високі показники активності ферментів спостерігались у тканинах нирок.

Отримані нами результати свідчать про те, що високі рівні активних форм кисню та азоту, які утворюються за умов введення доксорубіцину, можуть регулювати активність ММП-2 і ММП-9 за спільним механізмом.

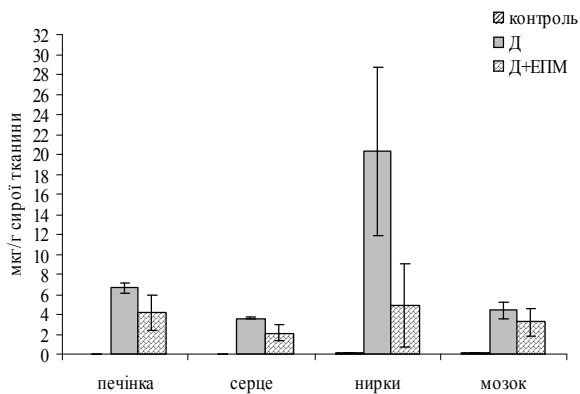


Рис. 3. Активність матричної металопротеїнази-2 (ММП-2) (концентрація активної форми ферменту) в органах тварин за введення доксорубіцину та дії комплексу ЕПМ ($M \pm m$, $n=5$).

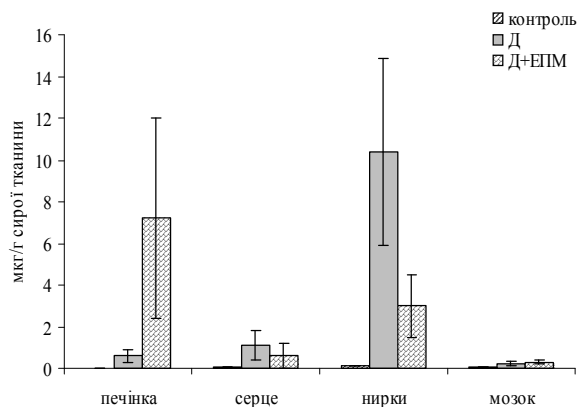


Рис. 4. Активність матричної металопротеїнази-9 (ММП-9) (концентрація активної форми ферменту) в органах тварин за введення доксорубіцину та дії комплексу ЕПМ ($M \pm m$, $n=5$).

Відомо, що активність ММП регулюється супероксидними радикалами та $NO\cdot$ на транскрипційному та посттрансляційному рівнях, тобто на рівнях експресії та активації [6].

Зокрема, латентні форми ММП-2 і ММП-9 містять продомени із консервативною послідовністю в активному центрі, до складу якої входять залишок цистеїну та Zn^{2+} . Активується профермент внаслідок дисоціації Zn^{2+} -цистеїн-з'язку за рахунок взаємодії із супероксидними радикалами та/або активними формами оксиду азоту, які є тіолмодифікуючими агентами [5].

За введення щурам разом із доксорубіцином комплексу ЕПМ спостерігалось зниження активності ММП-2 порівняно з тваринами, яким вводили доксорубіцин, у всіх досліджуваних органах, хоча ці величини залишались дещо вищими за значення у контролі. Найбільш виразні зміни (в 3,5 раза) відбувались у тканинах нирок (рис. 3).

Активність ММП-9 також зменшувалась за введення доксорубіцину разом із комплексом ЕПМ порівняно з тваринами, які отримували тільки доксорубіцин (рис. 4). Як і при визначенні активності ММП-2, за введення доксорубіцину найбільш виразні зміни (в 3 рази) активності ММП-9 спостерігались у тканинах нирок (рис. 4). Винятком є тканини печінки, де, навпаки, показник зростав.

Відомо, що ММП-9 вважають судинспецифічним ферментом, вона відіграє ключову роль в ангиогенезі. Зростання її активності в тканинах печінки майже в 10 разів за введення доксорубіцину з комплексом ЕПМ, порівняно з введенням лише доксорубіцину, свідчить про запуск процесів утворення нових судин, що може бути реакцією пристосування до хронічної дії токсичного агента.

Отже, за введення щурам доксорубіцину в усіх досліджених тканинах спостерігалась значна активація ММП-2 і ММП-9, що, як відомо, супроводжувалось пошкодженням міжклітинного матриксу та порушенням перебігу різних фізіологічних процесів. За умов застосування доксорубіцину з комплексом попередників і модуляторів біосинтезу убихінону ЕПМ спостерігалось зменшення активності ММП-2 і ММП-9, що свідчить про зменшення ступеня деструкції міжклітинного матриксу та нормалізацію фізіологічних процесів.

ВИСНОВКИ. 1. Важливою складовою токсичного ефекту доксорубіцину є активація ММП, яка зумовлена підвищенням рівня $O_2^{\cdot -}$ і NO , що спричиняє посилення деструкції міжклітинного матриксу.

2. За умов застосування разом із доксорубцином комплексу попередників і модулаторів убіхінону відбувається значне зниження рівня генерування супероксидних радикалів,

оксиду азоту та активності ММП у тканинах, що призводить до зменшення деструкції міжклітинного матриксу і, таким чином, суттєво нівелює токсичну дію доксорубцину.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бурлака А. П. Кінетичні закономірності швидкості генерування і вмісту радикалів кисню в мембранах ендоплазматичного ретикулуму при хімічному канцерогенезі печінки і молочних залоз / А. П. Бурлака, М. Й. Данко, Є. П. Сидорик // Доповіді НАН України. – 1994. – № 10. – С. 141–145.
2. Бурлака А. П. Радикальні форми кисню та оксиду азоту при пухлинному процесі / А. П. Бурлака, Є. П. Сидорик. – К. : Наукова думка, 2006. – 228 с.
3. Ватугин М. Т. Антрациклиновая кардиомиопатия / М. Т. Ватугин, Н. В. Калинин, Е. В. Кетинг. – Донецк : ДонДІШ, 2001. – 236 с.
4. Донченко Г. В. Биохимия убихинона / Г. В. Донченко. – К. : Наукова думка, 1988. – 240 с.
5. Ефекти радикальних форм кисню і оксиду азоту: формування клітинної гіпоксії та активація матриксних металопротеїназ / А. П. Бурлака, Є. П. Сидорик, І. І. Ганусевич, С. П. Осинський // Експериментальна онкологія. – 2006. – № 1. – С. 49–53.
6. Мітохондріальний редокс-контроль матриксних металопротеїназ та метастазування у хворих на рак молочної залози / А. П. Бурлака, І. І. Ганусевич, Є. В. Лук'янчук, Є. П. Сидорик // Онкологія. – 2010. – **12**, № 4 (46). – С. 377–382.
7. Пат 82639, Україна, А61К31/355. Комплексний препарат для підвищення внутрішньоклітинного енергетичного обміну в організмі / Донченко Г. В., Кузьменко І. В., Кучменко О. Б., Петухов Д. М. – заявл. 26.09.06 ; опубл. 25.04.08, Бюл. № 8.
8. Сократительная функция и энергетический метаболизм сердца на ранней стадии адриамициновой кардиомиопатии / В. И. Капелько, А. Н. Хаткевич, С. Н. Дворянцев [и др.] // Кардиология. – 1997. – № 2. – С. 31–35.
9. Anti-inflammatory effects of CoQ10 and colorless carotenoids / В. Fullek, D. Smith, A. Howerton, D. Kern // J. Cosmetic Dermatology. – 2006. – 5, № 1. – P. 30–38.
10. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity / J. L. Quiles, J. R. Huertas, M. Battino [et al.] // Toxicology. – 2002. – **180**. – № 1. – P. 79–95.
11. Bentiger M. The antioxidant role of coenzyme Q / M. Bentiger K. Brismar, G. Dallner // Mitochondrion. – 2007. – Suppl: P. 41–50.
12. Change in matrix metalloproteinases activities in normal and transformed mouse fibroblasts under of antioxidants / І. V. Voronkina, K. M. Kirpichnikova, L. V. Smagina, І. A. Gamalii // Tsitologija. – 2008. – **50**. – P. 877–881.
13. Coenzyme q10: is there a clinical role and a case for measurement? / S. L. Molyneux, J. M. Young, C. M. Florkowski [et al.] // Clin. Biochem. – 2008. – **29**, № 2. – P. 71–82.
14. Conklin K. A. Coenzyme Q10 for prevention of anthracycline-induced cardiotoxicity / K. A. Conklin // Integrative Cancer Therapies. – 2005. – **4** (2). – P. 110–130.
15. Exogenous coenzyme Q10 modulates MMP-2 activity in MCF-7 cell line as a breast cancer cellular model / M. Bahar, S. Khaghani, P. Pasalar [et al.] // Nutrition J. – 2010. – **9**. – P. 62–69.
16. Hertz N. Improved survival in patients with end-stage cancer treated with coenzyme Q10 and other antioxidants: a pilot study / N. Hertz, R. E. Lister // J. Intern. Med. Res. – 2009. – **37**, № 6. – P. 1961–1971.
17. Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases / Y. A. De Clerck, N. Perez, H. Shimada [et al.] // Cancer Res. – 1992. – **52**. – P. 701–708.
18. Inni M. Mechanisms of inhibitory effects of CoQ10 on UVB-induced wrinkle formation in vitro and in vivo / M. Inni, M. Ooe, K. Fujii // Biofactors. – 2009. – **35**, № 5. – P. 435–441.
19. Li T. Adriamycin-induced early changes in myocardial antioxidant enzymes and their modulation by probucol / T. Li, P. K. Singal // Circulation. – 2000. – **102**, № 17. – P. 2105–2110.
20. Littarru G.-P. Clinical aspects of coenzyme Q10: an update / G.-P. Littarru, L. Tiano // Nutrition. – 2010. – **26**. – P. 250–254.
21. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment / K. Kessenbrock, V. Plaks, Z. Werb, R. Bicknell // Cell. – 2010. – **141**. – P. 52–67.
22. Matrix metalloproteinase-2 and -9 are induced differently by doxorubicin in H9c2 cells: The role of MAP kinases and NAD(P)H oxidase / P. Spallarossa, P. Altieri, S. Garibaldi [et al.] // Cardiovascular Research. – 2006. – **69**. – P. 736–745.
23. Muhammed H. Influence of ubiquinone on the inhibitory effect of adriamycin on mitochondrial oxidative phosphorylation / H. Muhammed, C.K.R. Kupur // Biochem. J. – 1984. – **214**. – P. 493–498.
24. Nelson K. K. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases / K. K. Nelson, J. A. Melendez // Free Radic. Biol. Med. – 2004. – **37**. – P. 768–784.
25. Serum level of matrix metalloproteinases-1, -2, -3 and -9 in thoracic aortic diseases and acute myocardial ischemia / G. T. Karapanagiotidis, P. Antonitsis, N. Charokopos [et al.] // J. Cardiothoracic Surgery. – 2009. – **4**. – P. 59–64.
26. Visse R. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry / R. Visse, H. Nagase // Circulation Res. – 2003. – **92**, № 8. – P. 827–839.

А. П. Бурлака², И. И. Ганусевич², Е. П. Сидорик², Л. А. Мамонтова²,
Е. Б. Кучменко¹, Д. Н. Петухов¹, Н. В. Делеменчук¹, Г. В. Донченко¹
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ А. В. ПАЛЛАДИНА НАН УКРАИНЫ¹, КИЕВ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ, ОНКОЛОГИИ И РАДИОБИОЛОГИИ
ИМЕНИ Р. Е. КАВЕЦКОГО НАН УКРАИНЫ², КИЕВ

АКТИВНОСТЬ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ДОКСОРУБИЦИНА И ДЕЙСТВИИ КОМПЛЕКСА ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ И МОДУЛЯТОРОВ БИОСИНТЕЗА УБИХИНОНА

Резюме

Важной составляющей токсического эффекта доксорубицина является активация матриксных металлопротеиназ, обусловленная повышением уровня O_2^- и NO, что является причиной усиления деструкции межклеточного матрикса.

Применение совместно с доксорубицином комплекса предшественников и модуляторов убихинона достоверно значительно снижает уровни генерирования супероксидных радикалов, оксида азота и активности матриксных металлопротеиназ в тканях и, таким образом, существенно нивелирует токсическое действие доксорубицина.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: убихинон, матриксные металлопротеиназы, супероксидный радикал, оксид азота.

A. P. Burlaka², I. I. Hanusevych², Ye. P. Sydoryk², L. A. Mamontova²,
O. B. Kuchmenko¹, D. M. Petukhov¹, N. V. Delemenchuk¹, H. V. Donchenko¹
O. V. PALLADIN INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE¹, KYIV
R. YE. KAVETSKYI INSTITUTE OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY, ONCOLOGY AND RADIOBIOLOGY
OF NAS OF UKRAINE², KYIV

MATRIX METALLOPROTEINASES' ACTIVITY IN TISSUES OF RATS UNDER DOXORUBICIN EFFECT AND TREATMENT WITH COMPLEX OF PRECURSORS AND MODULATORS OF UBIQUINONE BIOSYNTHESIS

Summary

The important part of doxorubicin toxicity is an activation of MMPs, caused by increase of O_2^- and NO-level, which leads to increased destruction of extracellular matrix.

The treatment by complex of precursors of modulators of ubiquinone biosynthesis in parallel to doxorubicin leads to significant decrease in tissue MMPs activities, which leads to decrease in destruction of extracellular matrix and thus to notable reduction of doxorubicin toxicity.

KEY WORDS: ubiquinone, matrix metalloproteinases, superoxide anion radical, nitric oxide.

Отримано 13.05.11

Адреса для листування: О. Б. Кучменко, аб. скр. 148, Київ, 02100, Україна.

**МЕТАБОЛІЧНІ ТА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ В СТРУКТУРАХ
ГОЛОВНОГО МОЗКУ І ЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ
ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ГІПОТИРЕОЗІ ТА ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ**

В експериментах на лабораторних щурах вивчали морфологічні та метаболічні зміни в структурах тиреоїдної системи за умов гіпотиреозу. В результаті дослідження виявлено маніфестацію киснезалежних процесів та формування структурних змін у тканинах головного мозку і щитоподібної залози. При корекції йодидом калію спостерігали зниження активності вільнорадикального окиснення та відновлення будови всіх ланок гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдної осі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: щитоподібна залоза, гіпоталамо-гіпофізарна система, гіпотиреоз, вільнорадикальне окиснення ліпідів.

ВСТУП. Серед різноманітних проявів гіпотиреозу важливе місце займає ураження центральної нервової системи (ЦНС), що припускає модуляцію інтегративної функції мозку в організмі й, тим самим, сприяє порушенню функціонування інших внутрішніх органів і фізіологічних систем [2, 5, 8]. Як відомо, одним із ключових регуляторних механізмів інтегративної діяльності ЦНС є гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдна система. Тиреоїдні гормони впливають на реакції мозку при змінах нейрометаболічного гомеостазу на нейрофізіологічному, нейробіохімічному та молекулярному рівнях [1, 6]. Відповідно до сучасних уявлень, роль неспецифічної ланки розвитку численних патологічних процесів відіграє оксидативний дисбаланс [3, 11]. Разом із тим, відомості про стан вільнорадикальних процесів у головному мозку та щитоподібній залозі при гіпотиреозі суперечливі, що спонукає до подальшого вивчення механізмів розвитку патологічних змін, які супроводжують дане захворювання [4, 9, 11–13]. Науковий інтерес викликають також з'ясування особливостей структури компонентів гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдної осі за умов гіпофункції щитоподібної залози, дослідження співвідношення між рівнем ліпопероксидації та морфологічними змінами досліджуваних тканин.

Метою дослідження було вивчити морфофункціональні та окисно-відновні зміни у структурах тиреоїдної системи при гіпофункції щитоподібної залози та за умов корекції йодидом калію.

© О. І. Тучак, М. М. Багрій, Н. М. Воронич-Семченко, 2011.

топодібної залози та за умов корекції йодидом калію.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для дослідження було відібрано статевозрілих щурів-самців масою 150–180 г, яких поділили на такі групи: 1-ша дослідна група (n=25) – тварини з експериментальним гіпотиреозом, який моделювали шляхом додавання до корму мерказолілу (10 мг/100 г маси тіла) протягом 30 днів [10]; 2-га дослідна група (n=25) – тварини, в яких гіпотиреоз коректували йодидом калію (по 50 мг препарату "Йодид-100" додавали до корму щурів 1 раз на добу протягом 30 днів) [14]. Контрольну групу склали 20 інтактних тварин.

Утримання, вигодовування та евтаназія відповідали державним і міжнародним вимогам щодо гуманного ставлення до тварин. Евтаназію здійснювали шляхом декапітації під кетаміновим наркозом (щурам внутрішньочеревно вводили кетамін із розрахунку 100 мг/кг маси тіла).

Функціональний стан щитоподібної залози у тварин усіх дослідних груп оцінювали за рівнем тиреоїдних гормонів у сироватці крові: трийодтироніну – T_3 , тироксину – T_4 , тиреотропного гормону аденогіпофіза (ТТГ) з наступним обчисленням індексів T_3/T_4 та $ТТГ/T_4$ [8]. Рівень процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) аналізували за вмістом дієнових кон'югатів (ДК) та малонового діальдегіду (МДА) в сироватці крові, тканинах головного мозку і щитоподібної залози [7].

Стан йодного забезпечення тварин оцінювали за вмістом йоду в сечі [15].

Структуру гіпоталамуса, гіпофіза та щитоподібної залози в експериментальних тварин вивчали за допомогою оптичної мікроскопії.

Статистичний аналіз результатів здійснено за допомогою сучасних комп'ютерних програм із використанням методів варіаційної статистики. Визначали середньоарифметичне значення (M), стандартну похибку (m), критерій Стьюдента (t), коефіцієнт вірогідності (p). За вірогідні брали значення $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У результаті експерименту було виявлено значне зниження вмісту йодованих гормонів у сироватці крові щурів 1-ї дослідної групи (табл. 1). Зокрема, вміст T_3 у сироватці крові піддослідних тварин зменшився на 75,23 % ($p < 0,05$), T_4 – на 70,68 % ($p < 0,05$) порівняно з контролем. При цьому індекс T_3/T_4 знизився на 44,56 % ($p < 0,001$) порівняно з вихідними даними. Рівень ТТГ за даних умов зріс у 2,09 раза ($p < 0,05$) порівняно з інтактними тваринами, що вказує на позитивну реакцію центральних механізмів нейроендокринної регуляції функціональної здатності щитоподібної залози. Індекс ТТГ/ T_4 у цій групі щурів зріс у 2,95 раза ($p < 0,02$).

У сечі щурів цієї дослідної групи зафіксовано різке зниження вмісту йоду порівняно з інтактними тваринами (табл. 1).

У результаті аналізу показників вільнорадикального окиснення ліпідів встановлено різке зростання вмісту ДК та МДА у всіх досліджуваних тканинах тварин із гіпотиреозом. За даних експериментальних умов вміст ДК збільшився в сироватці крові на 27,92 % ($p < 0,05$), у тканині головного мозку – на 91,66 %, у щитоподібній залозі – у 2,45 раза ($p < 0,01$) проти аналогічних показників інтактних тварин. Рівень МДА у сироватці крові щурів перевищив контрольні результати на 81,74 %

($p < 0,05$), у тканині головного мозку зріс в 3,43 раза ($p < 0,05$), а у щитоподібній залозі знизився на 50,76 % ($p < 0,05$).

У тварин з експериментальним гіпотиреозом виявлено структурні зміни окремих ланок гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдної осі різного ступеня вираження. При цьому в гіпоталамусі щурів 1-ї дослідної групи (рис. 1) мали місце поліморфні зміни перикарионів нейроцитів. Відмічали набряк окремих нейронів, нечіткість контурів клітин. У нейроплазмі визначались множинні дрібні вакуолі. У деяких перикарионах спостерігалась периферійна конденсація базофільної речовини у вигляді тонких смужок або дрібних грудок. Ядра округлої, овальної або неправильної форми. У частини нейронів спостерігали вогнищевий лізис каріолеми. Хроматин, у вигляді дрібних грудок або пілоподібної зернистості, був рівномірно розподілений у каріоплазмі. У цитоплазмі поодиноких помірно деформованих нейроцитів хроматофільна субстанція мала вигляд гомогенної маси. У деяких нейроцитах були наявні більш виражені дистрофічні зміни. Такі нейрони набували сплющеної або веретеноподіб-

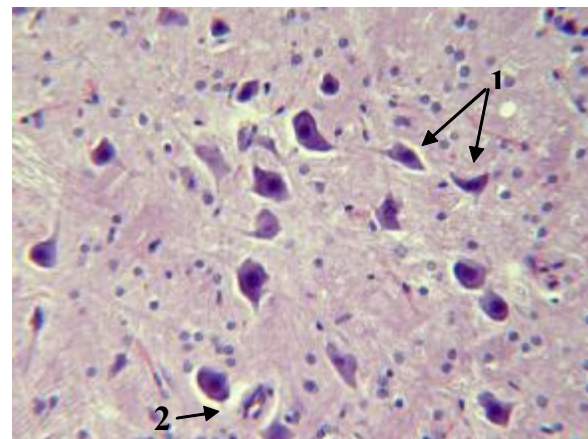


Рис. 1. Нейрони гіпоталамуса щура з експериментальним гіпотиреозом: 1 – виражені дистрофічні зміни перикарионів; 2 – перичелюлярний набряк. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. 40, ок. 10.

Таблиця 1 – Показники тиреоїдного статусу щурів з експериментальним гіпотиреозом та за умов корекції йодидом калію ($M \pm m$)

Дослідна група	T_3 , мкмоль/мл	T_4 , мкмоль/мл	T_3/T_4	ТТГ, мкМО/мл	ТТГ/ T_4	Йод у сечі, мкг/л
Інтактні тварини (n=20)	2,22±0,22	19,54±0,24	0,101±0,002	16,07±2,20	1,24±0,23	100,31±8,12
1-ша – тварини, яким вводили мерказоліл (n=25)	0,55±0,17*	5,73±1,17*	0,056±0,002*	33,66±7,37*	3,66±0,69*	1,50±0,02*
2-га – тварини, яким вводили мерказоліл та йодид калію (n=25)	5,33±0,83* $p_{1-2} < 0,001$	67,14±13,20* $p_{1-2} < 0,001$	0,094±0,003 $p_{1-2} < 0,001$	1,50±0,02* $p_{1-2} < 0,001$	0,07±0,002* $p_{1-2} < 0,001$	52,58±7,31* $p_{1-2} < 0,001$

Примітка. Тут і в наступній таблиці: p – вірогідна різниця порівняно з аналогічними показниками в інтактних тварин ($p < 0,05$); p з арабськими цифрами – вірогідна різниця між дослідними групами.

ної форми. Хроматофільна речовина мала вигляд однорідної гомогенної різко базофільної маси. Ядра гіперхромні, з чіткими контурами. В окремих нейронах спостерігався каріопікноз. У деяких ділянках візуалізувались виражений перицелюлярний набряк та значна деформація перикаріонів.

У даній групі піддослідних тварин виникали значні порушення структури аденогіпофіза (рис. 2). Відмічали виражений перицелюлярний набряк, деформацію нейроцитів та глибокі дистрофічні зміни їх перикаріонів. Контури клітин були нечіткими, цитоплазма містила вакуолі різного розміру та форми, які в окремих клітинах зливались, зумовлюючи балонну дистрофію. Форма ядер більшості клітин була неправильною, межі – нечіткими, хроматин мав дрібногранулярний або пілоподібний вигляд.

У паренхімі щитоподібної залози тварин із гіпотиреозом виявили значну кількість великих фолікулів, спостерігали сплюснення тиреоїдного епітелію. Ядра більшості тироцитів мали еліпсоподібну форму (рис. 3). У структурі залози спостерігали посилену проліферацію екстрафолікулярного епітелію, фокальне потовщення стінок фолікулів, появу фестончастих фолікулів, що свідчить про розвиток гіперплазії епітеліального компонента.

У результаті проведеної корекції гіпотиреозу йодидом калію (2-га дослідна група тварин) рівень тиреоїдних гормонів у сироватці крові підвищився (табл. 1). Зокрема, вміст T_3 у сироватці крові щурів 2-ї дослідної групи збільшився у 9,69 раза ($p_{1,2} < 0,05$) порівняно з аналогічними показниками у тварин 1-ї дослідної групи. Рівень T_4 у сироватці крові щурів цієї ж дослідної групи зріс в 11,71 раза ($p_{1,2} < 0,05$) відносно аналогічних показників 1-ї дослідної групи.

Високий вміст тиреоїдних гормонів у сироватці крові тварин 2-ї дослідної групи поєднувався з виражено низьким вмістом ТТГ на тлі різкого зменшення індексу $ТТГ/T_4$. Вміст ТТГ у сироватці крові щурів 2-ї дослідної групи був меншим, ніж у тварин 1-ї дослідної групи, та залишався нижчим від аналогічного показника в інтактних щурів.

За даних експериментальних умов спостерігали зростання індексу T_3/T_4 в 1,68 раза ($p < 0,05$) та відновлення його до рівня інтактних тварин. Аналогічна тенденція спостерігалась і стосовно індексу $ТТГ/T_4$, але його результати так і не досягли рівня контрольних показників. У цілому такі результати можуть характеризувати відновлення балансу в системі тиреоїдних гормонів.

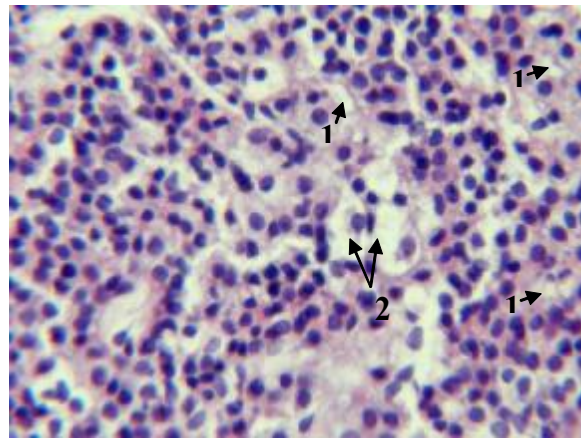


Рис. 2. Аденоцити гіпофіза щура з експериментальним гіпотиреозом: 1 – вакуолізація цитоплазми нейросекреторних клітин; 2 – балонна дистрофія аденоцитів. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. 40, ок. 100.

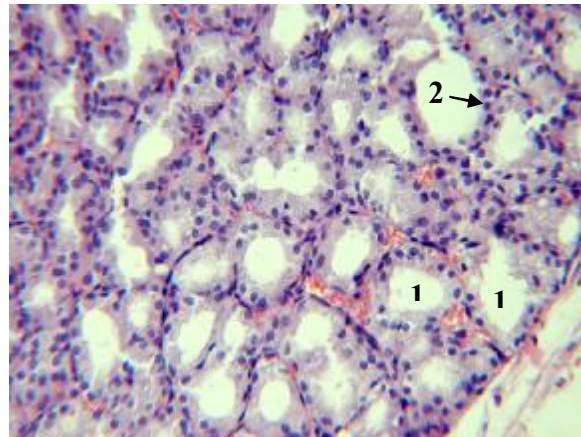


Рис. 3. Тиреоцити щитоподібної залози щура з експериментальним гіпотиреозом: 1 – збільшені у розмірах фолікули; 2 – сплюснення тиреоїдного епітелію. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. 10, ок. 20.

Про позитивний ефект від корекції йододефіциту у тварин 2-ї дослідної групи свідчить і вміст йоду в їх сечі (табл. 1). Необхідно зазначити, що концентрація йоду в сечі цих щурів зросла до 52,58 мкг/л проти 1,50 мкг/л у 1-й дослідній групі. Разом із тим, рівень йоду в сечі піддослідних тварин залишався нижчим від аналогічного показника в інтактних щурів.

За умов корекції гіпотиреозу йодидом калію показники активності вільнорадикального окиснення ліпідів змінювались інертно (табл. 2). Зокрема, вміст ДК у сироватці крові знизився на 9,65 % ($p_{1,2} < 0,05$) порівняно з аналогічним показником у тварин 1-ї дослідної групи, тоді як вміст проміжного продукту ПОЛ у сироватці крові перевищував на 15,58 % ($p < 0,05$) цей же показник в інтактних тварин. У мозковій тканині тварин цієї ж дослідної групи рівень ДК знизився на 21,74 % ($p_{1,2} < 0,05$) відносно аналогічного показника в щурів до

Таблиця 2 – Зміни вмісту ДК та МДА у сироватці крові та тканинах головного мозку і щитоподібної залози щурів з експериментальним гіпотиреозом та за умов корекції йодидом калію ($M \pm m$)

Дослідна група	ДК, E_{233} /мл/г			МДА, мкмоль/мл		
	сироватка крові	головний мозок	щитоподібна залоза	сироватка крові	головний мозок	щитоподібна залоза
Інтактні тварини (n=20)	1,54±0,05	0,36±0,05	0,29±0,0	3,67±0,11	0,58±0,07	3,39±0,07
1-ша – тварини, яким вводили мерказоліл (n=25)	1,97±0,06*	0,69±0,03*	0,71±0,09*	6,67±0,41*	1,99±0,06*	1,67±0,05*
2-га – тварини, яким вводили мерказоліл та йодид калію (n=25)	1,78±0,03* $p_{1-2} < 0,05$	0,54±0,04* $p_{1-2} < 0,05$	0,57±0,03* $p_{1-2} < 0,05$	5,87±0,16* $p_{1-2} < 0,05$	1,68±0,09* $p_{1-2} < 0,05$	1,97±0,06*

корекції, але ще перевищував контрольні дані на 50,1 % ($p < 0,05$). Однонапрявлена тенденція спостерігалась і стосовно зміни проміжного продукту вільнорадикального окиснення ліпідів у тканині щитоподібної залози: зменшення на 19,72 % ($p_{1-2} < 0,05$) проти даних 1-ї дослідної групи та перевищення рівня ДК на тлі корекції майже у 2 рази проти вихідного рівня.

Рівень МДА (табл. 2) у сироватці крові тварин із гіпофункцією щитоподібної залози на тлі корекції йодидом калію вірогідно зменшився на 11,99 % ($p_{1-2} < 0,05$) порівняно із щурами 1-ї дослідної групи, проте ще залишався вищим на 59,94 % ($p < 0,05$), ніж в інтактних тварин. Вміст кінцевого продукту ПОЛ у тканині головного мозку щурів цієї дослідної групи зменшився на 15,58 % ($p_{1-2} < 0,05$), проте залишався вищим від аналогічного показника в інтактних тварин у 1,5 рази ($p < 0,001$). Рівень МДА у тканині щитоподібної залози тварин на тлі корекції гіпотиреозу йодидом калію мав тенденцію до зниження, проте ці зміни не були вірогідними, тоді як вміст МДА у тиреоїдній тканині щурів 2-ї дослідної групи залишався нижчим від аналогічного показника контролю на 41,89 % ($p < 0,05$).

При застосуванні для корекції експериментального гіпотиреозу йодиду калію вираження дистрофічних змін нейронів гіпоталамуса значно знижувалося (рис. 4). Більшість клітин гіпоталамуса набувала звичайної форми, хроматофільна субстанція мала вигляд інтенсивно забарвлених грудок, які були рівномірно розподілені в цитоплазмі. Форма ядер переважно округла, хроматин рівномірно розподілений у каріоплазмі, ядерця локалізовані переважно в центральній частині ядра. Водночас в окремих нейронах зберігалися вакуолі округлої або видовженої форми, заповнені дрібнозернистим вмістом, локалізовані на периферії клітини або в центральній частині. В

окремих ділянках зберігався перичелюлярний та периваскулярний набряк, який супроводжувався незначною деформацією нейроцитів.

За умов корекції гіпотиреозу йодидом калію визначалася нормалізація структури більшості нейроцитів гіпофіза, зменшувався або зникав перичелюлярний набряк, перикаріони набували округлої форми, характерної для групи контролю (рис. 5). Хроматофільна речовина була рівномірно розподілена в цитоплазмі, контури ядер чіткі, еухроматин рівномірно розподілений у каріоплазмі.

При морфологічному аналізі щитоподібної залози спостерігали відновлення її структури. Проте ще мали місце залишкові явища: окремі фолікули були збільшені в розмірах, а їх фолікулярний епітелій зменшений за висотою (рис. 6).

ВИСНОВКИ. 1. За умов експериментального гіпотиреозу на тлі вираженої активації ліпопероксидації у тканинах головного мозку та щитоподібної залози у структурах гіпоталамо-

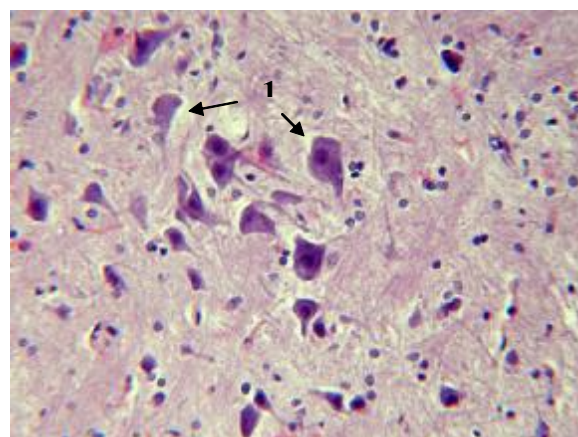


Рис. 4. Нейрони гіпоталамуса щура з експериментальним гіпотиреозом, якому вводили йодид калію: 1 – перичелюлярний набряк. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. 40, ок. 10.

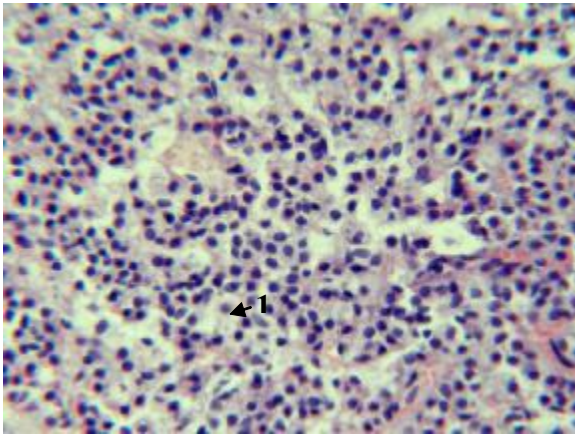


Рис. 5. Аденоцити гіпофіза щура з експериментальним гіпотиреозом, якому вводили йодид калію: 1 – перичелюлярний набряк. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. 40, ок. 10.

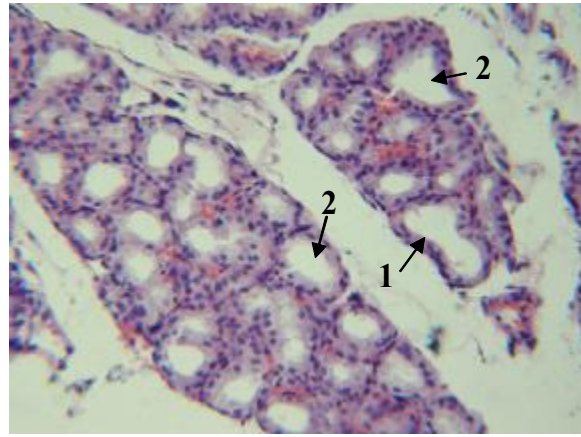


Рис. 6. Тиреоцити щитоподібної залози щура з експериментальним гіпотиреозом, якому вводили йодид калію: 1 – зменшений фолікулярний епітелій; 2 – збільшені фолікули. Забарвлення: гематоксилін-еозин. Збільшення: об. 40, ок. 10.

гіпофізарної системи виникають поліморфні дистрофічні порушення: зміна форми нейронів, перичелюлярний та периваскулярний набряк, вакуолізація нейросекреторних клітин, вогнищевий набряк аденоцитів. Виявлені морфологічні зміни узгоджуються із ступенем порушення тиреоїдного та метаболічного статусу і характеризують розлади центральних механізмів регуляції функціональної здатності щитоподібної залози.

2. Корекція гіпотиреоїдного стану лабораторних тварин йодидом калію позитивно вплинула на функціональний стан щитоподібної залози. За таких умов відмічають стабілізацію метаболічних процесів. Проте слід відзначити, що показники вільнорадикального окис-

нення не досягнули контрольного рівня у досліджуваних тканинах.

3. Після введення тваринам йодиду калію значною мірою відновлюється гістоструктура щитоподібної залози, гіпоталамуса та гіпофіза. Поруч зі змінами компенсаторного характеру структурні параметри свідчать про недостатню активацію процесів репаративної регенерації.

Отримані результати можуть послужити основою для проведення подальших експериментальних досліджень на предмет пошуку фармакологічних засобів з метою досягнення повної корекції структурних та метаболічних розладів у тканині щитоподібної залози та центральних ланках її нейроендокринної регуляції.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Білокінь Ю. М. Вплив тимостимуліну і тироксину на перекисне окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ферментів за експериментального гіпотиреозу у тварин / Ю. М. Білокінь, Г. Д. Бендюг, Я. Б. Раєцька // Укр. біохім. журн. – 2002. – **74**, № 6. – С. 108–113.
2. Галкина О. В. Действие изомеров тироксина на процессы свободнорадикального окисления в субклеточных фракциях коры головного мозга крыс / О. В. Галкина, В. М. Прокопенко, Ф. Е. Путилина // Проблемы эндокринологии. – 2000. – **46**, № 4. – С. 32–34.
3. Гжегоцький М. Р. Особливості кисеньзалежних процесів у крові та міокарді щурів при гіпотиреозі / М. Р. Гжегоцький, О. І. Чупашко // Архив клин. и эксперим. мед. – 2003. – **12**, № 1. – С. 32–33.
4. Григорова І. А. Інтенсивність процесів вільнорадикального окислювання у хворих з дисметаболічною енцефалопатією на тлі гіпотиреозу / І. А. Гри-

горова, О. Л. Товажнянська // Ліки України. – 2004. – № 1. – С. 24–27.

5. Гузь Л. В. Інтегративна діяльність центральної нервової системи за умов дисфункції щитоподібної залози / Л. В. Гузь, П. О. Неруш, О. М. Демченко // Вісник проблем біології і медицини. – 2004. – Вип. 3. – С. 9–17.

6. Демченко О. М. Порівняльна характеристика жирнокислотного складу ліпідів головного мозку щурів у процесі онтогенезу / О. М. Демченко, Л. В. Гузь // Вісник Луганського національного педагогічного університету ім. Т. Шевченка. – 2005. – № 6 (86). – С. 48–50.

7. Коробейникова Е. Н. Модифікація визначення продуктів перекисного окиснення ліпідів у реакції з тіобарбітуровою кислотою / Е. Н. Коробейникова // Лаб. дело. – 1989. – № 7. – С. 8–10.

8. Методы изучения йододефицитных заболеваний и мониторинг их устранения : руководство

для менеджеров программ. – 2-е изд. – М., 2003. – 430 с.

9. Нейрофизиологические паттерны при заболеваниях щитовидной железы / Е. Л. Союстова, А. А. Турна, Л. Л. Клименко [и др.] // Национальные дни лабораторной медицины России, Москва, 2–6 окт. 2002 г. : тез. докл. // Клин. лаб. диагност. – 2002. – № 11. – С. 18.

10. Панасюк М. Т. Зміни біохімічних показників крові у хворих на гіпо- та гіпертиреоз / М. Т. Панасюк, Е. О. Макеєва, М. Ф. Тимочко // Клін. фізіол. і біохім. – 1998. – № 4. – С. 61–65.

11. Панішина Н. Г. Стан ліпідної пероксидації при експериментальному гіпотиреозі / Н. Г. Панішина, Н. М. Юрженко, Т. С. Брюзгіна // Буковин. мед. вісник. – 2008. – 12, № 1. – С. 102–105.

12. Товажнянская Е. Л. Метаболические аспек-

ты формирования неврологических осложнений при первичном гипотиреозе / Е. Л. Товажнянская // Междунар. мед. журн. – 2008. – 14, № 3 (55). – С. 13–17.

13. Хаддад А. А. Вікові особливості зміни процесів вільнорадикального окиснення в мозку щурів з гіпотиреозом / А. А. Хаддад Аіхам Алі, В. В. Давидов // Укр. біохім. журн. – 2007. – 79, № 6. – С. 74–80.

14. Черенько С. М. Ефективність застосування калію йодиду для усунення лабораторного йододефіциту та лікування йододефіцитних захворювань щитоподібної залози / С. М. Черенько // Клін. ендокринологія та ендокринна хірургія. – 2003. – № 1. – С. 49–53.

15. Dunn J. Two simple methods for measuring iodine in urine / J. Dunn, H. Grutchfield, R. Gutekunst // Thyroid. – 1993. – 3. – P. 119–123.

О. И. Тучак, Н. Н. Багрий, Н. Н. Воронич-Семченко
ИВАНО-ФРАНКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ И MORFO-FУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА И ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПОТИРЕОЗЕ И В УСЛОВИЯХ КОРРЕКЦИИ

Резюме

В экспериментах на лабораторных крысах изучали морфологические и метаболические изменения в структурах тиреоидной системы в условиях гипотиреоза. В результате исследования выявлено манифестацию кислородзависимых процессов и формирование структурных изменений в тканях головного мозга и щитовидной железы. При коррекции йодидом калия наблюдали снижение активности свободнорадикального окисления и возобновление строения всех звеньев гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: щитовидная железа, гипоталамо-гипофизарная система, гипотиреоз, свободнорадикальное окисление липидов.

O. I. Tuchak, M. M. Bahriy, N. M. Voronych-Semchenko
IVANO-FRANKIVSK NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

METABOLIC AND MORPHO-FUNCTIONAL CHANGES IN STRUCTURES OF CEREBRUM AND THYROID IN EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM AND IN CONDITIONS OF CORRECTION

Summary

In experiments on laboratory rats, the morphological and metabolic changes in the structures of thyroid system have been studied in the conditions of hypothyroidism. As a result of reseach it has been revealed the manifestation of oxygen-dependant processes and formation structural changes in the tissues of cerebrum and thyroid gland. In case of correction by Potassium iodide there has been observed the decrease of activity of free radical oxidation and restoring of the morphology of all parts of hypothalamo-pituitary-thyroid axis.

KEY WORDS: thyroid gland, hypothalamo-pituitary system, hypothyroidism, free radical oxidation of lipids.

Отримано 06.06.11

Адреса для листування: Н. М. Воронич-Семченко, вул. Галицька, 2, Івано-Франківськ, 76000, Україна.

**СТАН ЕНЕРГЕТИЧНОГО МЕТАБОЛІЗМУ І ПОЄДНАНОГО З НИМ
ГАМК-ШУНТА В ГОЛОВНОМУ МОЗКУ ТВАРИН ІЗ ХРОНІЧНОЮ
АЛКОГОЛЬНОЮ ІНТОКСИКАЦІЄЮ НА ТЛІ ФАРМАКОКОРЕКЦІЇ**

У статті описано формування в щурів алкогольної енцефалопатії на тлі хронічної алкогольної інтоксикації протягом 30 днів. Курсове 14-денне призначення тваринам з алкогольною інтоксикацією нейропептидних церебропротекторів (церебралізін, кортексин і цереброкурин) зменшувало ступінь вираження енергодефіциту за рахунок інтенсифікації енергетично вигіднішого окиснення в циклі Кребса; знижувало активність анаеробного гліколізу і розвиток лактат-ацидозу; підвищувало концентрацію гальмівних амінокислот; знижувало "витрачання" інтермедіатів ГАМК-шунта в енергообміні. Найбільш терапевтично ефективним препаратом виявився цереброкурин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: алкоголізація, нейропротекція, цереброкурин, ГАМК, гліцин.

ВСТУП. Щороку в Україні від зловживання алкоголем помирає близько сорока тисяч чоловік [18]. Летальні алкогольні отруєння, що пов'язані з вживанням спиртних напоїв підпільного виготовлення, становлять приблизно 25 % випадків. Серцеві напади, причиною яких стало непомірне приймання алкоголю, також складають 25 %. На інші захворювання та нещасні випадки, які сталися через вживання алкоголю, припадає 50 % [1]. Встановлено, що під дією алкоголю в тканинах головного мозку відзначаються виражена гіперемія, розширення дрібних капілярів, дистрофічні зміни гліозних клітин в корі, амоніювому розі, підкіркових утворах, загибель клітин мозочка [16]. На тлі алкогольного пошкодження мозку відбуваються комплексні функціонально-метаболічні порушення, при яких знижується рівень макроергів – аденозинтрифосфату та креатинфосфату. Поряд із пригніченням синтезу АТФ при алкогольній інтоксикації порушуються його транспорт і утилізація. Енергодефіцит є причиною пригнічення відновних синтетичних процесів [8]. У тканинах мозку інтенсивно перебігають метаболічні перетворення амінокислот, такі, як окисне дезамінування, трансамінування, модифікація бічного ланцюга та ін. Особливо важливою для нормального функціонування головного мозку є реакція декарбоксилування, в результаті якої утворюються γ -аміномасляна кислота (γ -амі-

нобутират) (ГАМК, GABA) (попередник – глутамат) і біогенні аміни. Біосинтез і деградацію глутамату можна розглядати як побічний шлях цитратного циклу (ГАМК-шунт), який, на відміну від основного циклу, не призводить до синтезу гуанозин-5'-трифосфату. ГАМК-шунт характерний для клітин центральної нервової системи, але не відіграє суттєвої ролі в інших тканинах [24]. Феномен швидкого окиснення бурштинової кислоти сукцинатдегідрогеназою, що супроводжується АТФ-залежним відновленням пулу піримідинових динуклеотидів, отримав назву "монополізація дихального ланцюга", біологічне значення якого полягає у швидкому ресинтезі АТФ. У процесі амінобутиратного шунта значна кількість глутамінової кислоти перетворюється в ГАМК, яка окиснюється в головному мозку безкисневим шляхом з виділенням великої кількості енергії. Цей процес нормалізує вміст гістаміну і серотоніну в мозку, підвищує мікроциркуляцію в його тканинах, не впливаючи на артеріальний тиск та показники роботи серця [22, 35].

На фоні хронічної алкогольної інтоксикації також спостерігається підвищена експресія білків HSP, які захищають нейрони, стабілізуючи денатуровані або неправильно згорнуті пептиди. Накопичуючись при різних шкідливих впливах, білки теплового шоку допомагають клітині підтримувати гомеостаз в умовах стресу. Генетичні та біохімічні дані показали, що гідроліз АТФ є істотним елементом активності

© І. Ф. Беленічев, О. П. Соколик, 2011.

шаперонів HSP70. Білки цього сімейства зв'язуються з проміжними пептидами за рахунок циклів зв'язування і гідролізу АТФ, а подальший обмін АДФ/АТФ супроводжується вивільненням пептидів. Молекули HSP70 містять дві консервативні ділянки – N-кінцеву АТФ-зв'язуючу (45 кДа) і C-кінцеву (15 кДа), що зв'язує гідрофобні пептиди. Між ними перебуває більш варіабельна ділянка альфа-спіральної “кришки”. АТФ-зв'язаний HSP70 вільно взаємодіє з незрілими або неправильно згорнутими пептидами, викликаючи конформаційні зміни, які призводять до активації АТФ-ази і підсилюють асоціацію з ко-шапероном HSP40, що сприяє переходу до АДФ-зв'язаної форми. Для ефективного сполучення гідролізу АТФ зі скріпленням і подальшим вивільненням пептидних субстратів істотне значення мають ко-шаперони сімейства JDP (J-domain proteins) [28, 31–33].

Білки HSP70 можуть інгібувати вивільнення цитохрому c (cyt c) з мітохондрій і транслокації фактора AIF, що індукує апоптоз, в ядро, зменшуючи пошкодження мозку, а також інгібувати вивільнення проапоптозного білка Smac/DIABLO з мітохондрій. Експресія HSP72 в астроцитах призводить до зниження утворення реактивних видів кисню (ROS) і підтримки мембранного потенціалу мітохондрій, а також рівня глутатіону та зростання активності супероксиддисмутази при алкогольному пошкодженні клітин мозку. Підвищена експресія HSP72 здатна зменшувати апоптоз через збільшення рівня Bcl-2 і за допомогою інгібування транслокації проапоптичного фактора Bax. Показано, що білки класу HSP70 інгібують дефосфорилування кінази JNK (c-Jun N-terminal kinase), яка відіграє істотну роль в адаптаційному апоптозі та є однією з мішеней для терапії енцефалопатій. Крім того, білки HSP взаємодіють з топоізомеразою 1 (регулятором апоптозу) і є ефекторами важливої антиапоптозної кінази Akt/PKB. Значна активація білками теплового шоку глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази – суттєвий елемент у механізмі захисної дії HSP при пошкодженні нейронів [27, 29, 30, 34].

Механізми, що лежать в основі порушень енергетичного гомеостазу та пов'язаного з ним ГАМК-шунта при формуванні хронічної алкогольної інтоксикації, недостатньо вивчено, хоча їх зв'язування може мати важливе значення для розробки патогенетично обґрунтованої терапії алкоголізму. Дані обставини визначають особливу актуальність подальшого дослідження біохімічних, молекулярних аспектів патогенезу алкоголізму, а також пошук нових високоефективних церебропротектив-

них лікарських препаратів для комплексного лікування алкоголізму [4].

Метою даного дослідження було встановлення особливостей і ступеня вираження дії цереброкуруину, кортексину і церебралізіну на стан енергетичного метаболізму та пов'язаного з ним ГАМК-шунта нейронів головного мозку щурів при експериментальній алкогольній інтоксикації.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В досліджах використовували 50 білих безпородних щурів-самців масою 180–220 г і віком 4,5 місяця, яких утримували у віварії при вільному доступі до їжі (стандартний гранульований корм) та води, при природній зміні дня і ночі. Тварин було отримано з розплідника ДУ “Інститут фармакології і токсикології НАМН України”. Всі експериментальні процедури здійснювали відповідно до Положення про використання тварин в біомедичних дослідженнях [15, 23].

Хронічну алкогольну інтоксикацію викликали щоденним внутрішньошлунковим введенням: перші 10 днів – 15 % розчину етанолу в дозі 4 г/кг, наступні 10 днів – 15 % розчину етанолу в дозі 6 г/кг і наступні 10 днів – 25 % розчину етанолу в дозі 4 г/кг. З 30 доби припиняли алкоголізацію, проводили експериментальну терапію досліджуваними препаратами і продовжували спостереження протягом 14 днів. Усіх щурів поділили на 5 груп по 10 тварин у кожній групі: 1-ша група отримувала протягом 30 днів етанол і з 31 по 44 добу – цереброкуруин в дозі 0,6 мг/кг; 2-га група одержувала протягом 30 днів етанол і з 31 по 44 добу – церебралізін в дозі 4 мг/кг; 3-тя група отримувала протягом 30 днів етанол і з 31 по 44 добу – кортексин у дозі 5 мг/кг; 4-та група одержувала протягом 30 днів етанол (контроль); 5-та група – інтакт (замість етанолу – фізіологічний розчин) [7, 12].

Вміст γ -аміноасляної кислоти, глутамату і гліцину визначали методом тонкошарової хроматографії [2].

Кількість лактату і малату визначали в гомогенаті головного мозку щурів спектрофотометрично, піруват – за методом Цохаломпрехта [21], аденілові нуклеотиди – хроматографічно за допомогою пластини “Силуфол” [9].

Порівняння груп проводили за допомогою критерію U – Уїтні-Манна. Результати дослідження оброблено із застосуванням статистичного пакета ліцензійної програми “STATISTICA for Windows 6.1” (StatSoft Inc., № AXX R712D833214SAN5), а також “SPSS 16.0”, “Microsoft Excel 2003”.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Хронічна алкоголізація щурів призвела до стійких порушень енергетичного обміну в головному мозку: зменшення вмісту АТФ, АДФ та підвищення АМФ на тлі гіперпродукції лактату і зниження малату й пірувату. Однак анаеробний гліколіз не компенсував потреби клітин в макроергах, замикаючи коло енергетичного дефіциту. Надмірне утворення протонів відбувалося внаслідок накопичення недоокиснених продуктів вуглеводного і ліпідного обміну, гідролізу АТФ та інших макроергічних сполук в результаті накопичення відновлених піримідинових нуклеотидів і продуктів гліколізу, призводячи до розвитку некомпенсованого метаболічного ацидозу.

Курсове призначення на фоні алкогольної інтоксикації церебраліну призвело до зниження рівня лактату на 21,5 % відносно групи нелікованих тварин ($p < 0,05$), при паралельному зростанні рівня малату – на 5,4 % і пірувату – на 13,3 %, що свідчить про нормалізацію циклу трикарбонових кислот та обмежену активності анаеробного гліколізу (табл. 1).

Курсове призначення кортексину призвело до подібних за спрямованістю змін показників енергетичного обміну, але більш виражених за дією: вміст лактату знизився на 32,5 % ($p < 0,05$) відносно показників контролю, вміст малату підвищився на 13,5 %, пірувату – на 25,0 % відповідно.

Найбільш ефективним було призначення цереброкуруну, при введенні якого реєстрували зменшення вмісту лактату на 50,6 %

($p < 0,05$), підвищення вмісту малату на 27,0 %, пірувату – на 38,3 % відповідно.

Інтенсифікація аеробних процесів під дією нейропептидних препаратів у мозку тварин, які протягом тривалого терміну отримували алкоголь, призводила до збільшення продукції макроергічних фосфатів. Так, призначення церебраліну збільшувало рівень АТФ на 21,8 %, АДФ – на 5,7 % при зниженні рівня АМФ на 8,0 % (табл. 2). У групі щурів, які одержували кортексин, ці показники були вищими і становили: АТФ – на 49,1 %, АДФ – на 11,4 %, а АМФ – на 20,0 % відповідно. Застосування цереброкуруну призвело до найбільш значного підвищення енергопродукції: АТФ – на 80,1 %, АДФ – на 20,0 % і зниження АМФ на 28,0 %. Механізм енергомодуючої дії цереброкуруну зумовлений його здатністю обмежувати розвиток мітохондріальної дисфункції, підвищувати експресію генів раннього реагування і, тим самим, активувати компенсаторні шунти продукції енергії.

На тлі хронічної алкогольної інтоксикації в гомогенаті мозку щурів контрольної групи було виявлено значну активацію ГАМК-ергічної системи, що проявлялась підвищенням рівня ГДК і ГАМК-Т, а також зниження глутамату, ГАМК та гліцину (табл. 3). У результаті проведеного курсу лікування в групі тварин, які отримували церебраліну, відмічали підвищення рівнів ГАМК, глутамату і гліцину на 96,12, 35,27 та 19,57 % відповідно відносно контролю й зниження ГДК і ГАМК-Т на 8,48 та 13,14 % відносно контролю. У групі щурів, які одержували

Таблиця 1 – Показники енергетичного метаболізму в головному мозку щурів з алкогольною інтоксикацією

Група тварин	Лактат, мкмоль/г тканини	Малат, мкмоль/г тканини	Піруват, мкмоль/г тканини
Інтакт (n=10)	2,10±0,06	0,48±0,03	0,85±0,04
Контроль (n=10)	4,70±0,16	0,37±0,02	0,60±0,03
Церебраліну (n=10)	3,69±0,10*	0,39±0,02	0,68±0,03
Кортексин (n=10)	3,17±0,16*	0,42±0,02	0,75±0,03*
Цереброкурун (n=10)	2,32±0,16*	0,47±0,03	0,83±0,04*

Примітка. Тут і в наступних таблицях: * – $p < 0,05$ відносно контролю.

Таблиця 2 – Показники аденілових нуклеотидів у головному мозку щурів з алкогольною інтоксикацією

Група тварин	АТФ, мкмоль/г тканини	АДФ, мкмоль/г тканини	АМФ, мкмоль/г тканини
Інтакт (n=10)	3,24±0,08	0,43±0,04	0,16±0,02
Контроль (n=10)	1,61±0,05	0,35±0,03	0,25±0,02
Церебраліну (n=10)	1,96±0,09*	0,37±0,03	0,23±0,02
Кортексин (n=10)	2,4±0,07*	0,39±0,04	0,20±0,02
Цереброкурун (n=10)	2,90±0,14*	0,42±0,04	0,18±0,02*

Таблиця 3 – Показники системи гальмівних нейромедіаторів у головному мозку щурів з алкогольною інтоксикацією

Група тварин	ГАМК, мкмоль/г тканини	Глутамат, мкмоль/г тканини	Гліцин, мкмоль/г тканини	ГДК, мкмоль/г тканини/год	ГАМК-Т, мкмоль/г тканини/год
Інтакт (n=10)	2,89±0,51	14,47±3,42	3,58±0,73	13,1±2,64	13,14±2,57
Контроль (n=10)	1,03±0,19	6,01±1,03	2,35±0,47	16,4±3,19	21,31±4,25
Церебrolізін (n=10)	2,02±0,33*	8,13±1,8	2,81±0,5	15,01±3,5	18,51±4,04
Кортексин (n=10)	2,18±0,39*	10,68±1,86	3,07±0,5	14,74±2,44	16,09±3,22
Цереброкурин (n=10)	2,64±0,51*	12,78±2,63	3,53±0,86	13,5±2,69	14,42±3,04

кортексин, відзначали підвищення рівнів ГАМК, глутамату і гліцину на 111,65, 77,7 і 30,64 % відповідно відносно контролю та зниження ГДК і ГАМК-Т на 10,12 і 24,5 % відносно контролю. Найвищі показники продемонструвала група тварин, які отримували цереброкурин: зростання рівнів ГАМК, глутамату і гліцину на 156,31, 112,65 і 50,21 % відповідно відносно контролю та зниження ГДК і ГАМК-Т на 17,68 і 32,33 % відносно контролю.

Такі зміни стану ГАМК-ергічної системи при хронічній алкогольній інтоксикації розцінюють як компенсаторну активацію додаткового шунта утворення енергії за умов гальмування циклу Кребса. Так, гальмування окиснення α -кетоглутарату призводить до активації ГДК і перетворення глутамату в ГАМК, а потім при активації ГАМК-Т – в бурштиновий напівальдегід, який, перетворюючись у сукцинат, окиснюється в циклі Кребса [19, 25, 26].

При алкоголізації спостерігаються гальмування окисної продукції енергії, активація компенсаторних шляхів утворення АТФ-гліколізу і шунта Робертса, які, однак, не забезпечують повністю потребу мозку в енергії і викликають розвиток лактат-ацидозу і дефіцит гальмівних амінокислот – ГАМК і гліцину [6].

При формуванні хронічної алкогольної інтоксикації виникають патобіохімічні реакції вільнорадикального окиснення, енергодефіцит, дефіцит інтермедіатів ГАМК-ергічної системи і гальмівних амінокислот, які становлять потенційну мішень для фармакокорекції. Корекція вільнорадикального окиснення призводить до гальмування окисної модифікації та інактивації білкових макромолекул – ключових ферментів біоенергетичних процесів нейрона, гіперполяризації мембран мітохондрій, порушення тіолдисульфідної системи механізмів red-ox-регуляції, окисної модифі-

кації нуклеїнових кислот, тим самим запобігаючи гальмуванню експресії генів, відповідальних за синтез ряду ферментів окисного метаболізму [5, 6, 10, 11, 13, 14, 17, 19, 20, 25, 26].

Корекція порушень окисного метаболізму нейропептидними церебропротекторами на тлі хронічної алкогольної інтоксикації підвищує активність власних біоенергетичних процесів за рахунок використання додаткових шунтів енергопродукції (малат-аспартатний, шунт Робертса, α -гліцерофосфатний), інтенсифікації аеробних реакцій окиснення субстрату [3, 11, 26].

ВИСНОВКИ. 1. Хронічна алкогольна інтоксикація викликала стійкі порушення окисного метаболізму мозкової тканини: енергодефіцит, гальмування циклу Кребса, активацію гліколізу, активацію ГАМК-ергічної системи і виснаження її інтермедіатів та гальмівних амінокислот.

2. Курсове призначення тваринам з алкогольною інтоксикацією нейропептидних церебропротекторів зменшувало ступінь вираження енергодефіциту за рахунок інтенсифікації енергетично вигіднішого окиснення в циклі Кребса; знижувало активність анаеробного гліколізу і розвиток лактат-ацидозу; підвищувало концентрацію гальмівних амінокислот; знижувало “витрачання” інтермедіатів ГАМК-шунта в енергообміні.

3. Найбільш ефективним препаратом виявився цереброкурин, який продемонстрував значно кращі показники корекції енергодефіциту та підвищення рівня гальмівних амінокислот. Менш ефективними були кортексин і церебrolізін, які опинилися на другому і третьому місцях відповідно за силою корекції енергодефіциту та рівнем гальмівних нейромедіаторів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Альтшулер В. Б. Клініка алкоголізму : посібник з наркології / В. Б. Альтшулер ; під ред. Н. І. Іванця. – М. : Медпрактики, 2002. – Т. 1. – С. 203–233.
2. Асатіані В. С. Ферментні методи аналізу / В. С. Асатіані. – М. : Наука, 1969. – 739 с.
3. Беленічев І. Ф. Рациональна нейропротекція / І. Ф. Беленічев, В. І. Черній, Ю. М. Колесник. – Донецьк : видавець Заславський А. Ю., 2009. – 262 с.
4. Беленічев І. Ф. Сучасні підходи до терапії гострого порушення мозкового кровообігу, основні стратегії нейропротекції / І. Ф. Беленічев, Н. В. Бухтіярова, Д. А. Середа // Новини медицини і фармації. – № 5 (237). – Березень 2008. – С. 1–7.
5. Галенко-Ярошевський П. А. Нариси фармакологічних засобів метаболічної терапії / П. А. Галенко-Ярошевський, І. С. Чекман, Н. О. Горчакова. – М. : Медицина, 2001. – 240 с.
6. Гусев Є. І. Ішемія головного мозку / Є. І. Гусев, В. І. Скворцова. – М. : Медицина, 2001. – 328 с.
7. Експериментальна фармакокорекція порушень поведінки нейропептидними ноотропами в умовах 30-денної алкоголізації / І. Ф. Беленічев, О. П. Соколик // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – № 1–2. – С. 11–16.
8. Ентін Г. М. Клініка і терапія алкогольних захворювань / Г. М. Ентін, О. М. Крилов. – М. : МНП психіатрії, 1994. – Т. 1. – 229 с.
9. Захарова Н. В., Рибін В. І. // Лаб. дело. – 1980. – № 12. – С. 735–738.
10. Каплан А. Я. Антиішемічні властивості нейропептиду семаксу / А. Я. Каплан, А. А. Каменський, І. П. Ашмарин. – М. : Медицина, 1999. – 278 с.
11. Ковальов Г. В. Фармакологія та клінічне застосування нейроактивних амінокислот // Праці Волгоградського мед. ін-ту / Г. В. Ковальов. – Волгоград, 1995. – 37 (5). – С. 295–300.
12. Корекція енергетичного метаболізму нейропептидами в умовах хронічної алкогольної інтоксикації / І. Ф. Беленічев, О. П. Соколик // Патологія. – 2010. – 7, № 2. – С. 50–53.
13. Меерсон Ф. З. Патогенез і попередження стресорних та ішемічних ушкоджень серця / Ф. З. Меерсон. – М. : Медицина, 1984. – 272 с.
14. Меерсон Ф. З. Фізіологія адаптаційних процесів / Ф. З. Меерсон. – М. : Наука, 1986. – 670 с.
15. Науково-практичні рекомендації по утриманню лабораторних тварин і роботі з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. – К., 2002. – С. 13–25.
16. Півень Б. М. Екзогенно-органічні захворювання головного мозку / Б. М. Півень. – М. : Медицина, 1998. – 144 с.
17. Пікамилон – новий цереброваскулярний і ноотропний препарат / під ред. Р. С. Мірзояна. – М. : ВНИСЕНТІ, 1989. – Ч. 1. – 154 с.
18. Потрібний В. П. Механізми та клінічні прояви токсичної дії алкоголю : посібник з наркології / В. П. Потрібний ; під ред. Н. І. Іванця. – М. : Медпрактики, 2002. – Т. 1. – С. 74–94.
19. Розанов В. А. Вплив піридоксальфосфату і похідних пантотену на γ -амінобутиратний шунт в голвному мозку мишей / В. А. Розанов // Вопр. мед. химии. – 1988. – № 1. – С. 42–46.
20. Ситинський І. А. Гама-аміномасляна кислота в діяльності центральної нервової системи / І. А. Ситинський – М. : Наука, 1992. – 271 с.
21. Сучасні методи біохімічних досліджень (ліпідний та енергетичний обмін) / під ред. М. І. Прохорової. – Л. : Вид-во Ленінградського ун-ту, 1982. – 272 с.
22. Тарасова Н. Н. Значення нейромедіаторів ГАМК в центральній регуляції дихання : дис. канд. біол. наук : 14.00.16, 03.00.13 / Тарасова Н. Н. – М., 2005. – 149 с. РГБ ОД, 61:06-3/173.
23. Хабриев Р. У. Рекомендації по експериментальному (доклінічному) изучению новых фармакологических веществ / Р. У. Хабриев. – М., 2005. – С. 308–319.
24. Шабанов П. Д. Наркологія : практичний посібник для лікарів / П. Д. Шабанов. – М. : GEOTAR-MED, 2003. – 560 с.
25. Шашунова М. Тонкошарова хроматографія у фармації та клінічній біохімії. – М. : Світ, 1980. – Т. 2. – 295 с.
26. Якушев В. С. Принципи метаболічної корекції та регуляції енергетичного обміну мозку / В. С. Якушев. – Запоріжжя, 1987. – 29 с.
27. Anti-cancer therapeutic approaches based on intracellular and extracellular heat shock proteins / C. Didelot, D. Lanneau, M. Brunet [et al.] // Curr. Med. Chem. – 2007. – № 14 (27). – P. 39–47.
28. Cupp-Vickery J. R. Crystal structure of Hsc20, a J-type Co-chaperone from Escherichia coli / J. R. Cupp-Vickery, L. E. Vickery // J. Mol. Biol. – 2000. – № 304. – P. 35–45.
29. Kampinga H.H. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins / H. H. Kampinga, J. Hageman, M. J. Vos // Cell Stress and Chaperones. – 2009. – № 14 (1). – P. 105–111.
30. Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis / C. Dai, L. Whitesell, A. B. Rogers, S. Lindquist // Cell. – 2007. – № 130 (6). – P. 5–18.
31. Human heat shock protein 70 enhances tumor antigen presentation through complex formation and intracellular antigen delivery without innate immune signaling / H. Bendz, S. C. Ruhland, M. J. Pandya [et al.] // J. Biol. Chem. – 2007. – № 282 (43). – P. 688–702.
32. Schlesinger M. J. Heat shock proteins / M. J. Schlesinger // THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. – 1990. – № 265 (21). – P. 121–124.
33. Structure of human J-type co-chaperone HscB reveals a tetracysteine metal-binding domain / E. Bitto, C. A. Bingman, L. Bittova [et al.] // J. Biol. Chem. – 2008. – № 283. – P. 84–92.
34. Vinocur Altman B. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations / B. Vinocur Altman // Current opinion in biotechnology. – 2005. – № 16 (2). – P. 23–32.
35. Voeikov V. Reactive Oxygen Species, Water, Photons, and Life, Rivista di Biologia / V. Voeikov / Biology Forum, 2001. – № 94. – P. 193.

СОСТОЯНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА И СОПРЯЖЕННОГО С НИМ ГАМК-ШУНТА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ЖИВОТНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ НА ФОНЕ ФАРМАКОКОРРЕКЦИИ

Резюме

В статье описано формирование у крыс алкогольной энцефалопатии на фоне хронической алкогольной интоксикации в течение 30 дней. Курсовое 14-дневное назначение животным с алкогольной интоксикацией нейропептидных церебропротекторов (церебролизин, кортексин и цереброкурин) уменьшало степень выраженности энергодифицита за счет интенсификации энергетически более выгодного окисления в цикле Кребса; снижало активность анаэробного гликолиза и развитие лактат-ацидоза; повышало концентрацию тормозных аминокислот; снижало "расход" интермедиатов ГАМК-шунта в энергообмене. Наиболее терапевтически эффективным препаратом оказался цереброкурин.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **алкоголизация, нейропротекция, цереброкурин, ГАМК, глицин.**

I. F. Bielenichev, O. P. Sokolyk
ZAPORIZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

STATE OF ENERGY METABOLISM AND COMBINED WITH IT GABA-SHUNT IN THE BRAIN OF ANIMALS WITH CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION ON THE BACKGROUND OF FARMACOCORRECTION

Summary

The article adduces the formation in rats of alcohol encephalopathy on the background of chronic alcohol intoxication during 30 days. Course 14-days prescribing for animals with alcohol intoxication of neuropeptide cerebroprotectors (cerebrolisin, cortexin, cerebrocurin) reduced a degree of energy deficiency expressiveness due to intensification of energetic more favourable oxidation in cycle Crebs; reduced activity anaerobe glycolysis and progress lactate-acidosis, raised concentration of amino acids; reduced "expenditure" of intermediates GABA-shunt in energy metabolism. Most therapeutically effective had appeared cerebrocurin.

KEY WORDS: **alcoholisation, neuroprotection, Cerebrocurin, GABA, glycine.**

Отримано 05.04.11

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

СИНТЕЗ І БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ 6-МЕТИЛ-2,4-ДІОКСО-1,2,3,4-ТЕТРАГІДРОПРИМІДИН-5-СУЛЬФОАМІДУ ТА ЙОГО N-ПОХІДНИХ

Синтезовано N-заміщені сульфонаміди на основі метилурацилсульфохлориду та вивчено біологічну активність отриманих сполук відносно збудників кишкових інфекцій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: метилурацил, метилурацилсульфохлорид, метилурацилсульфаміди, біологічна активність.

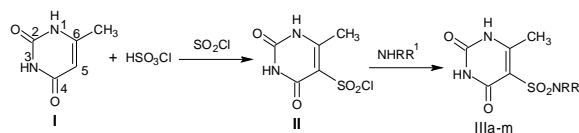
ВСТУП. Сульфонаміди, особливо на основі гетероциклічних сполук, широко використовують у медицині як ефективні антибактеріальні препарати, особливо після відкриття бактеріологічних властивостей сульфопіразину [1, 2] та деяких його похідних. Серед різних властивостей хімічних сполук біологічна активність займає особливе місце, оскільки її наявність може стати підставою для медичного застосування цих сполук. З іншого боку, наявність у сполук побічних і токсичних ефектів є перешкодою для використання хімічних сполук на практиці.

Добре відома біологічна активність сульфонамідних препаратів [3]. Біологічна цінність похідних піримідину зумовлена значним інтересом до їх синтезу. Це пов'язано з тим, що піримідиновий фрагмент входить до складу ряду природних сполук (нуклеїнові кислоти, деякі вітаміни), синтетичних лікарських препаратів (барбітурати, хіміотерапевтичні препарати – фторурацил, трифлуридин, ізофорон) [10]. Серед лікарських препаратів практично відсутні сульфонаміди на основі гетероциклічних сульфонамідів [3, 7], хоча не виключена можливість, що саме серед таких сульфонамідів можуть знайтися сполуки, які відповідатимуть основним вимогам до медичних препаратів – проявлятимуть високу антибактеріальну активність і низьку токсичність. Такими сполуками можуть бути сульфонаміди на основі 6-метилурацил-5-сульфохлориду (II) [4].

Метою дослідження були синтез вихідного 6-метилурацилсульфохлориду та отримання на його основі сульфонамідів, що містять

різні алкілзамісники при атомі азоту сульфонамідної групи. На відміну від існуючих сульфонамідних препаратів ароматичного характеру, цикл урацилу є складовою частиною нуклеїнових кислот і не токсичний. Як показали попередні дослідження, більшість отриманих сульфонамідів не проявляє токсичних властивостей, тому їх використання у медичній практиці є цілком можливим.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. До наших досліджень метилурацилсульфохлорид (I) отримували з виходом, що не перевищував 22–28 % [9, 11]. При взаємодії попередньо висушеного метилурацилу зі свіжоперегнаною хлорсульфоновою кислотою за присутності хлористого тіонілу з подальшим виливанням реакційної маси на суміш льоду з оцтовою кислотою вихід (I) складає понад 82 % [8, 13], що зробило 6-метилурацил-5-сульфохлорид легкодоступною сполукою. Це дає нові перспективи у синтезі та пошуку нових біологічно активних сполук на основі метилурацилу [8, 12]:

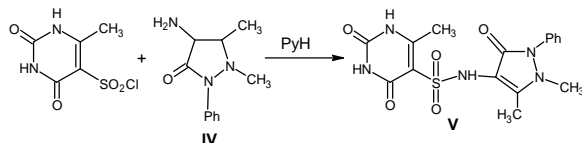


(не вказані R=H); R¹=H(**a**), R¹=Me(**b**),
R=R¹=Me(**c**), R¹=Et(**d**),
R¹=C₂H₄OH(**e**),
R¹=CH₂CO₂H(**f**), R=R¹=C₂H₅(**g**);
R=R¹=C₂H₄OH(**h**), R=R¹=C₂H₄Cl(**i**),
R¹=(CH₂)₃OMe(**j**), R¹=(CH₂)₃NEt₂(**k**),
R¹=CH₂CH₂CO₂H (**l**);
R¹=CH(CO₂H)CH₂CO₂H(**m**)

Метилурацилсульфохлорид легко реагує з водними розчинами аміаку, метиламіну, диметиламіну й етиламіну, утворюючи (III **a,b,c,d**). Взаємодія (II) з таким же успіхом проходить і в органічних розчинниках (піридин, бензол, діоксан, ацетон та ін.), особливо з амінами, що погано розчиняються у воді. При цьому отримано сульфонаміди (III **i-m**) з високими виходами (більшість з них одержано вперше), тому вони можуть викликати інтерес у багатьох біохіміків.

Отримані сульфонаміди являють собою безбарвні кристалічні сполуки, більшість з яких добре розчиняється у воді, що значною мірою спрощує їх використання на практиці. Попередні дослідження показали, що більшість з одержаних сульфонамідів не токсичні, що дає можливість досліджувати їх у подальшому як біологічно активні сполуки.

При взаємодії (II) і 4-аміноантипірину (IV) отримано сполуку N-(антипірин-5-іл)-6-метилурацил-5-сульфонамід (V) будови:



Сполука (V) практично повністю припиняє ріст стафілококів і кишкової палички [8].

Для зв'язування хлороводню, що виділяється під час взаємодії сульфохлаориду з амінами, використовують основи, наприклад гідроксид калію або натрію, поташ, ацетат натрію, кальциновану соду, піридин та ін. Основи додають в еквівалентній кількості до реакційної маси тільки після зникнення вихідного сульфохлаориду. Такий порядок введення реагентів (з метою уникнення гідролізу сульфохлаориду) збільшує вихід цільового продукту в 2–3 рази.

Кінець реакції контролюють за допомогою тонкошарової хроматографії на силуфолі в системах: етилацетат, етанол, хлороформ:метанол – 10:1 або за зникненням з реакційної маси вихідного сульфохлаориду.

Після закінчення реакції масу розбавляють 2–3-кратною кількістю води (у разі використання розчинників, що змішуються з водою, таких, як ацетон, діоксан, ДМСО, ДМФА, N-метилпіролідон, піридин, оцтова кислота). При застосуванні органічних розчинників, що не змішуються з водою (дихлоретан, хлороформ, бензол, толуол, хлорбензол, о-дихлорбензол), після закінчення реакції масу підкислюють соляною або оцтовою кислотою до рН 5–6 і розчинник відганяють з водяною парою. Не розчинні у воді сульфонаміди відділяють шля-

хом фільтрування, а розчинені сульфонаміди – часткового випаровування водного розчину, що утворився після відгонки органічного розчинника з водяною парою.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА. Вихідний метилурацилсульфохлорид отримували за методикою [5, 6], аміни очищали шляхом перегонки або кристалізації з підходящого розчинника до отримання хімічно чистих препаратів. Чистоту одержаних сульфонамідів перевіряли хроматографічно на пластинках Silufol-254. Будову отриманих сульфонамідів підтверджували за допомогою елементного аналізу, ПМР- та ІЧ-спектроскопії.

6-Метил-2,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-сульфонамід (IIIa). У 3-горлій колбі з мішалкою, зворотним холодильником і контактним термометром в 40 мл води розчинили 3,5 мл 20 % розчину аміаку (0,038 моль). До отриманого розчину аміаку при розмішуванні протягом 1 год невеликими порціями додали 4,71 г (0,021 моль) метилурацилсульфохлаориду (II), підтримуючи температуру реакційної маси 10 °С. Після витримки протягом 1 год реакційну масу залишили на ніч. До реакційної маси додали активоване вугілля, нагріли до 80 °С і гарячим відфільтрували. Фільтрат випарували на водяній бані досуха. Отриманий безбарвний осад перекристалізували з 15 мл гарячої води. Виділено 4,17 г (96,7 % від теоретичного), Т. пл. 292–293 °С.

ПМР (м.д.): $\delta(\text{SO}_2\text{NH}_2)$ 6,28 (2H, м); $\delta(\text{CH}_3)$ 2,38 (3H, м) $\delta(\text{NH})$ 92, 9,94.

В аналогічних умовах із метиламіну отримали *N*,6-диметил-2,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-сульфонамід (IIIb).

ПМР (м.д.): $\delta(\text{SO}_2\text{NHCH}_3)$ 7,74 (NH, м); $\delta(\text{NCH}_3)$ 2,78 (3H, м).

ІЧ (см⁻¹): 555 – маятникові коливання SO₂; 565 – деформаційні коливання SO₂; 845 – $\nu(\text{S-N})$; 1060 – $\nu(\text{CH}_3)$; 1165 – $\nu_s(\text{SO}_2)$; 1320 – $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$.

З диметиламіну (CH₃)₂NH отримали *N,N*,6-триметил-2,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-сульфонамід (IIIc).

ІЧ (см⁻¹): 550 – деформаційні коливання SO₂; 990 – $\nu(\text{S-N}(\text{CH}_3)_2)$; 1145, 1195, 1260 – $\nu(\text{N}(\text{CH}_3)_2)$; 1165 – $\nu_s(\text{SO}_2)$; 1335 – $\nu_{\text{as}}(\text{SO}_2)$.

N-Етил-6-Метил-2,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-сульфонамід (IIIc). У 25 мл води розчинили 2,5 мл (0,043 моль) етиламіну й 1,0 г безводного ацетату натрію. До отриманого розчину при розмішуванні невеликими порціями додали 2,24 г (0,01 моль) сульфохлаориду (II). Одержану реакційну масу розмішували при кімнатній температурі протягом 3–5 год (до

Таблиця 1 – Фізико-хімічні властивості 6-метилурацил-(N-алкіл)сульфонамідів

Сполука	R, R ₁	Вихід, %	Т. пл., °C	Знайдено, %				Формула	Вирахувано, %			
				C	H	N	S		C	H	N	S
IIIa	H,	96,7	292–293	29,17	3,41	20,58	15,73	C ₅ H ₇ N ₃ O ₄ S	29,27	3,44	20,48	15,62
	H			29,31	3,37	20,42	17,91					
IIIb	H,	94,5	238–239	33,08	4,19	19,11	14,69	C ₆ H ₉ N ₃ O ₄ S	32,87	4,14	19,17	14,62
	CH ₃			33,97	4,08	19,03	14,78					
IIIc	CH ₃ ,	90,1	316–318	36,15	4,70	18,00	13,87	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₄ S	36,05	4,75	18,01	13,74
	CH ₃			35,94	4,66	18,21	13,64					
IIId	H,	89,4	289–290	36,12	4,71	18,10	13,88	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₄ S	36,05	4,75	18,01	13,74
	CH ₂ CH ₃			36,00	4,82	17,92	13,67					
IIIe	H,		>320	33,78	4,51	16,89	13,00	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₅ S	33,73	4,45		13,08
	CH ₂ CH ₂ OH			33,84	4,42		13,24					
IIIff	H,	88,5	209–210,5	34,56	4,09	15,19	11,65	C ₈ H ₉ N ₃ O ₆ S	31,94	3,45	15,96	12,18
	CH ₂ CO ₂ H			34,71	3,94	15,27	11,74					
IIIgg	C ₂ H ₅ ,		325–326	41,31	5,86	16,00	12,42	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₄ S	41,37	5,78	16,08	12,27
	C ₂ H ₅			41,46	5,80	15,92	12,31					
IIIhh	CH ₂ CH ₂ OH	84,6	> 310	36,96	5,05	14,44	11,09	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₆ S	36,86	5,15	14,33	10,93
	CH ₂ CH ₂ OH			7,00	5,11	14,23	11,22					
IIIii	CH ₂ CH ₂ Cl	86,8	278–279	32,65	3,99	12,70	6,88	C ₉ H ₁₃ C ₁₂ N ₃ O	32,74	3,97	12,72	6,71
	CH ₂ CH ₂ Cl			32,84	4,04	12,83	6,67					
IIIjj	H	84,7	288–290	39,49	4,90	13,76	10,67	C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₆ S	39,34	4,95	13,76	10,50
	-(CH ₂) ₃ OCH ₃			39,27	4,97	13,84	10,44					
IIIkk	H,	78,0	255–256	45,19	6,94	17,56	10,01	C ₁₂ H ₂₂ N ₄ O ₄ S	45,27	6,96	17,60	10,07
	-(CH ₂) ₃ N(C ₂ H ₅) ₂			45,14	7,02	17,50	10,19					
IIIll	H,	91,0	315–316,5	33,69	3,42	13,00	10,09	C ₉ H ₁₁ N ₃ O ₈ S	33,65	3,45	13,08	9,98
	-(CH ₂) ₃ CO ₂ H			3,49	13,21	10,24						
IIIlm	H,	94,6	309–310,5	32,09	3,41	15,89	12,28	C ₇ H ₉ N ₃ O ₆ S	34,66	4,00	15,16	11,56
	-CH(CO ₂ H)CH ₂ CO ₂ H			32,14	3,47	16,09	12,34					
V		92,8	291–292	49,18	4,43	17,81	8,28	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₅ S	49,03	4,38	17,87	8,18
				49,00	4,47	17,96	8,11					

зникнення сульфохлориду по хроматограмі). Наступного дня до розчину додали активоване вугілля, нагріли до 80 °С і гарячим відфільтрували. Фільтрат випарували на 1/2 об'єму. Отримано 4,1 г (89,4 %), Т. пл. 289–290 °С.

ПМР (м.д.): $\delta(\text{SO}_2\text{NH})$ 7,48 (1H, м); $\delta(\text{CH}_2)$ 2,86 (2H) $\delta(\text{CH}_3)$ 2,30, 1,14.

В аналогічних умовах із моноетаноламіну $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ отримали *N*-(2-гідроксиетил)-6-метил-2,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-сульфонамід (IIIe). ПМР (м.д.): $\delta(\text{SO}_2\text{NH})$ 7,55 (1H); $\delta(\text{CH}_2)$ 2,96 (2H); $\delta(\text{CH}_2)$ 3,50; $\delta(\text{CH}_3)$ 2,34 (3H); $\delta(\text{CH}_2)$ 2,30; $\delta(\text{OH})$ 3,62 (1H).

З діетиламіну одержали *N,N*-діетил-6-метил-2,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-сульфонамід (IIIg); із діетаноламіну отримали *N,N*-bis(2-гідроксиетил)-6-метил-2,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-сульфонамід (IIIg); із bis(2-хлоретил)аміну $\text{HN}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl})_2$ [12] одержали *N,N*-bis(2-хлоретил)-6-метил-2,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-сульфонамід (IIIh), $R_f = 0,38$ (BuOH:PrOH:H₂O:NH₄OH – 10:5:4:1).

{[(6-Метил-2,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-іл)сульфоніл]аміно} оцтова кислота (III*). У 15 мл піридину розчинили 0,9 г гліцину і 0,9 г ацетату натрію. До отриманого розчину при розмішуванні додали 2,24 г (0,01 моль) 6-метилурацил-5-сульфохлориду в 10 мл діоксану. Одержану суспензію розмішували 4 год (до відсутності сульфохлориду). Наступного дня реакційну масу нагріли до повного розчинення осаду і випарували до об'єму 5 мл. Після охолодження осад відфільтрували, промили невеликою кількістю води і спиртом. Отримано 1,95 г (74,0 %) (IIIf), Т. пл. 208,5–210 °С, $R_f = 0,54$ (BuOH:PrOH:H₂O:NH₄OH – 10:5:4:1).

Аналогічно з β -амінопропіонової кислоти $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ одержали 3-{[(6-метил-2,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-іл)сульфоніл]аміно} пропіонову кислоту (III). Вихід 82,3 %, Т. пл. 316–316,5 °С (із льодяної оцтової кислоти); з аспарагінової кислоти $\text{HOCCNH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ отримали 2-{[(6-метил-2,4-діоксо-1,2,3,4-тетрагідропіримідин-5-іл)сульфоніл]аміно}бутандіову кислоту (IIIm). Вихід 86,5 %, Т. пл. 310–311,5 °С (AcOH).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Драч Б. С. Синтез азотсодержащих гетероциклических соединений на основе амидоалкилирующих агентов / Б. С. Драч, В. С. Броварец, О. Б. Смолий. – К. : Наукова думка, 1992. – 260 с.
2. Кудрин А. Н. Фармакология с основами патофизиологии / А. Н. Кудрин. – М. : Медицина, 1977. – 550 с.
3. Машковский А. Д. Лекарственные препараты : справочник / А. Д. Машковский. – Харьков, Тор

N-5-(1,5-Диметил-3-оксо-2-феніл-2,3-дигідрол-1Н-4-піразоліл)-6-метилурацил-5-сульфонамід (V). У 45 мл ДМФА розчинили 5,75 г (0,025 моль) 4-аміноантипірину і 2,75 г поташу. До отриманого розчину при розмішуванні по краплях додали 5,90 г (0,026 моль) 4-аміноантипірину в 35 мл діоксану. Реакційну масу протягом 2–2,5 год нагрівали при 75–80 °С (до відсутності сульфохлориду по хроматограмі). Гарячим розбавили гарячою водою до помутніння розчину і залишили для охолодження. Після охолодження осад, що випав, відфільтрували, промили водою, спиртом і висушили. Отримано 8,3 г (84,8 %), Т. пл. 288–289 °С (з AcOH).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. З метою вивчення біологічної активності отриманих сульфонамідів вибірково досліджували їх вплив на розмноження збудників кишкової групи інфекцій. Так, наприклад, сульфонамід (V) практично повністю припиняє ріст стафілококів і кишкової палички. Протимікробну активність вивчали *in vivo* методом “серійних розведень” і оцінювали за мінімальною бактеріостатичною активністю сполуки, яка виражається в мкг/мл [2]. Для цього на живильне середовище робили посів збудників кишкової групи інфекцій з розведенням 10^6 концентрації, наприклад *Escherichia Coli-055* – збудника гастроентероколіту, *Salmonella typhsurnsum* – збудника сальмонельозу, а також *Shigella flexeri* – збудника дизентерії. Більшість із запропонованих сульфонамідів показали себе як перспективні інгібітори збудників інфекцій.

ВИСНОВКИ. 1. Вивчено синтез *N*-заміщених сульфонамідів на основі метилурацил-сульфохлориду.

2. Показано, що більшість отриманих сульфонамідів не токсичні та є біологічно активними.

3. Будову одержаних сполук підтверджено даними елементного аналізу, ІЧ- та ПМР-спектроскопії.

син, 1998. – Т. 1. – 560 с.

4. Пат. 75516 Україна С07D 239/69. Похідні 6-метил-2,4-дигідроксипіримідин-5-сульфонамідів і спосіб їх одержання / Погорелова І. П., Ісак О. Д., Потапенко Е. В. ; опубл. 17.04.06, Бюл. № 4.

5. Пат. 2087471 РФ, МКИ С07D239/54. Спосіб получения 6-метилурацил-5-сульфохлорида / Макаров В. В., Широкогорлова Е. А., Дробышева Н. Е. и др. ; опубл. 20.08.97.

6. Погорелова И. П. Синтез 6-метилурацил-5-сульфохлорида / И. П. Погорелова, В. Д. Орлов, А. Д. Исак // Журн. прикл. химии. – 2006. – **79** (4). – С. 639–641.

7. Рубцов М. В. Синтетические химико-фармацевтические препараты / М. В. Рубцов, А. Г. Байчиков. – М. : Медицина, – 1971. – 330 с.

8. Синтез 6-метилурацил-5-сульфонамідів та їх біологічна активність / І. П. Погорелова, О. Д. Исак, Г. П. Єсіпова [та ін.] // Вісник фармації. – 2004. – **1** (37). – С. 20–23.

9. Хромов-Борисов Н. В. Синтез и превращение производных пириимидина. IX. Сульфопроизводные цитозина, 4-метилцитозина и урацила / Н. В. Хромов-Борисов, Р. А. Карпинская // ЖОХ. –

1957. – **27**. – С. 2518–2521.

10. Эльдерфилд Р. Гетероциклические соединения / Р. Эльдерфилд. – М. : Изд-во ИЛ, 1960. – Т. 6. – 612 с.

11. Elderfield R. E. Synthesis of potential Anticancer Agents. XI. Synthesis and Reactions of Derivatives of 6-methyluracil-5-sulfonic acid / R. E. Elderfield, R. N. Prasad // J. Org. Chem. – 1961. – **26** (10). – P. 3863–3867.

12. Nitrogen-Containing Heterocycles and Alkaloids / A. D. Isak, I. P. Pogorelova, L. A. Shemchuk, T. S. Bibik. – Moscow : Iridium Press, 2001. – **2**. – P. 105.

13. Pyrimidine sulfonamides and their derivatives; Synthesis and biological activity / A. D. Isak, I. P. Pogorelova, N. F. Tyupalo, V. A. Isak // Nitrogen-Containing Heterocycles. Moscow, ICSPF, 2006. – **1**. – P. 309–313.

А. Д. Исак, Е. В. Моспанова, О. О. Науменко
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ

ВОСТОЧНОУКРАИНСКОГО НАЦИОНАЛЬНОГО УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ В. ДАЛЯ, РУБЕЖНОЕ

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ 6-МЕТИЛ-2,4-ДИОКСО-1,2,3,4-ТЕТРАГИДРОПИРИМИДИН-5-СУЛЬФОАМИДА И ЕГО N-ПРОИЗВОДНЫХ

Резюме

Синтезированы N-замещенные сульфонамиды на основе метилурацилсульфохлорида и изучена биологическая активность полученных соединений по отношению к возбудителям кишечных инфекций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метилурацил, метилурацилсульфохлорид, метилурацилсульфонамиды, биологическая активность.

O. D. Isak, O. V. Mospanova, O. O. Naumenko
V. DAL EAST-UKRAINIAN NATIONAL UNIVERSITY
INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGIES (RUBIZHNE)

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF 6-METHYL-2,4-DIOXO-1,2,3,4-TETRAHYDROPYRIMIDINE-5-SULFONAMIDE AND ITS N-DERIVATIVES

Summary

N-substituted methyluracil-based sulfonamides have been synthesized and biological activity of the obtained compounds against causative agents of intestinal infections has been studied.

KEY WORDS: methyluracil, methyluracil sulfochloride, methyluracil sulphonamides, biological activity.

Отримано 15.03.11

Адреса для листування: О. Д. Исак, вул. Кірова, 25, кв. 6, Рубіжне, 93009, Україна.

РОЛЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ ТА АПОПТОЗУ НЕЙТРОФІЛІВ У ЩУРІВ У ФІЗІОЛОГІЧНИХ УМОВАХ

Встановлено фізіологічні межі раннього апоптозу нейтрофілів легень, печінки і крові та їх взаємозв'язок із показниками перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в статевозрілих нелінійних щурів-самців, які можна використовувати в умовах вивчення механізмів різноманітних патологічних процесів та встановлення ефективності корегувальних програм.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: апоптоз нейтрофілів, перекисне окиснення ліпідів.

ВСТУП. Апоптоз, або програмована смерть клітини, відіграє важливу роль у підтримці гомеостазу в фізіологічних умовах і при різних патологічних станах [2]. Кількість найрізноманітніших агентів і факторів, що індукують апоптоз клітин, постійно збільшується, і ця обставина посилює й без того думку про неймовірну складність даного процесу. Проте основне положення про початкові етапи індукції апоптозу внаслідок порушення мітохондріального дихання і виникнення оксидативного стресу залишається незмінним [3, 8, 9].

Кожна клітина в складі популяції є складною функціональною саморегулюючою системою, всі компоненти якої взаємозв'язані й взаємозалежні, а сигнальна система в нормі дозволяє утримувати параметри гомеостазу в контролюючих межах. При надпороговій дії адекватна пристосувальна реакція клітини може зумовити перехід на інший рівень функціонування. Запуск відповідної програми гомеостазу на рівні клітини може викликати гіпертрофію, гіперпроліферацію або стимулювати апоптоз [9, 13]. Проте основні фактори, які регулюють перехід клітини з одного стану в інший, враховуючи одночасно і потребу багатоклітинного організму як єдиного цілого, і потребу окремих елементів цього цілого, поки що не визначено. Немає даних про апоптоз нейтрофілів, а також їх взаємозв'язок з інтенсивністю перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантного захисту, які в умовах патології є одними з ключових чинників його стимуляції [3, 9, 11].

Метою роботи було з'ясувати рівень апоптозу нейтрофілів тканини печінки, легень та крові у здорових білих статевозрілих щурів та

його взаємозв'язок із показниками ПОЛ та антиоксидантного захисту.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проведено на 20 нелінійних білих щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тварин анестезували шляхом внутрішньочеревного введення тіопенталу натрію в дозі 80 мг/кг маси щура. Нейтрофіли виділяли з венозної крові методом градієнтного центрифугування [7]. Нейтрофіли виділяли на подвійному градієнті щільності стерильних розчинів фікол-тріумбразу. Щільність верхнього шару градієнта складала 1,075–1,077, а нижнього – 1,093–1,095. Через 30 хв після центрифугування при 1500 об./хв в інтерфазі між двома шарами градієнтів щільності розташовується шар гранулоцитів із чистотою 96–98 %, 2–4 % складають мононуклеари. Клітини акуратно збирали, переносили у стерильні центрифужні пробірки, тричі відмивали стерильним 0,85 % розчином хлориду натрію і розводили цим же розчином до концентрації 5×10^6 клітин/мл. Для виділення нейтрофілів органів промиті у фосфатно-сольовому буфері легень та печінку гомогенізували в магнітному подрібнювачі тканин "SilentCrusher S", гомогенат центрифугували 20 хв при 8000 об./хв. З надосадової рідини виділяли нейтрофіли на градієнті щільності фікол-тріумбразу вищевказаними методами. Для оцінки реалізації апоптозу нейтрофілів легень, печінки та крові використовували ФІТЦ-мічений анексин V, який зв'язується з фосфатидилсеринном на зовнішній поверхні плазмолемі [14], та пропідію йодид, що визначає померлі клітини, з набору реагентів

“ANNEXIN V FITC” (“Beckman Coulter”, Франція). Аналіз проб проводили на проточному цитометрі Epics XL (“Beckman Coulter”, Франція).

Визначали: у крові – церулоплазмін та SH-групи [5], в гомогенатах тканин легень та крові – вміст ТБК-активних продуктів ПОЛ [1], активність супероксиддисмугази (СОД) [4] і каталази [6].

Отриманий цифровий матеріал обробляють методом варіаційної статистики. Достовірність відмінностей визначали з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Функціональні особливості нейтрофілів зумовлюють пріоритетність комплексного підходу в оцінці стану їх популяції. Це можна пояснити відсутністю цілісної інформації про взаємозв'язок основних подій у житті цих ефекторних клітин – міграції, продукування активних форм кисню, апоптозу, що створює труднощі щодо встановлення участі та ролі нейтрофілів у різних патологічних процесах [12].

Як видно з таблиці 1, у здорових статевозрілих шурів-самців ранній апоптоз нейтрофілів у легенях перебував у межах від 0,44 до 0,58 % ($p < 0,05$), у печінці – від 0,13 до 0,35 % ($p < 0,05$), в крові – від 0,39 до 0,51 % ($p < 0,05$). При цьому ступінь раннього апоптозу нейтрофілів у печінці був статистично достовірно нижчим, ніж у легенях та крові ($p < 0,001$). Потрібно зауважити, що рівень раннього апоптозу в легенях та крові практично не відрізнявся.

Кореляційний аналіз ступеня раннього апоптозу нейтрофілів легень із досліджуваними біохімічними та імунологічними показниками показав (рис. 1) наявність позитивної кореляції слабкої сили із вмістом в гомогенаті легень СОД та середньої сили із вмістом у гомогенаті легень ТБК-активних продуктів ПОЛ і каталази та вмістом SH-груп ($p < 0,01$) і церулоплазміну в крові. У свою чергу, ранній апоптоз нейтрофілів крові негативно корелював із вмістом СОД, ТБК-активних продуктів ПОЛ,

каталази (зв'язки слабкої сили) і церулоплазміну (середній зв'язок) та позитивно корелював із вмістом SH-груп (сильний зв'язок) у крові.

У печінці ступінь раннього апоптозу нейтрофілів позитивно сильно корелював із вмістом церулоплазміну ($p < 0,01$) та слабо з рівнем SH-груп у сироватці крові, негативно слабкої сили зв'язок виявлено із вмістом в гомогенаті печінки ТБК-активних продуктів ПОЛ і СОД, встановлено негативну кореляцію середньої сили із вмістом каталази в гомогенаті печінки.

Одержані результати свідчать про те, що ранній апоптоз нейтрофілів більш притаманний легеням, а менше – печінці. Можна припустити, що у легенях нейтрофіли відіграють ключову роль у підтриманні локального імунітету і більшою мірою контактують із речовинами антигенної природи, які здатні стимулювати в них апоптоз. Тому одним з механізмів, що дозволяє контролювати запальні реакції дихальних шляхів, можна вважати рівень апоптозу нейтрофілів, який, найімовірніше, збільшується за рахунок дії проапоптичних факторів, що утворюються у вогнищі запалення.

В останні роки увагу клініцистів привертає вивчення вільнорадикального окиснення ліпідів мембран як регулятора фізіологічних процесів. Цей процес властивий нормальним тканинам і відбувається зазвичай при побудові ліпідних мембранних структур, їх оновленні, у ході біосинтезу ряду гормонів. Надмірна активація процесів ПОЛ призводить до порушення структури мембран, ліпідного обміну, проявляє токсичний вплив на тканини, сприяє посиленню лізису, окисненню сульфгідрильних груп білків і зумовлює розвиток структурних змін при захворюваннях легень та інших органів і систем організму [4, 9]. Регуляція нормальної концентрації перекису ліпідів у біологічних мембранах відбувається внаслідок збалансованої взаємодії реакцій утворення цих продуктів – реакцій оксидації та механізмів контролю, які призводять до пригнічення їх утворення, – реакцій антиоксидації.

Таблиця 1 – Ступінь апоптозозмінених нейтрофілів печінки, легень та крові в нормі ($M \pm m$)

Орган	Апоптоз ранній, % (n=20)	Апоптоз пізній, % (n=20)	Неуражені клітини, % (n=20)
Легені	0,51±0,03	0,60±0,15	97,8±0,80
p_1	<0,001	>0,05	>0,05
Печінка	0,24±0,05	0,79±0,15	98,20±0,57
p_2	<0,001	<0,001	>0,05
Кров	0,45±0,06	0,42±0,07	98,93±0,16
p_3	>0,05	<0,01	>0,05

Примітка. p_1 – достовірність відмінностей показників у печінці порівняно з легенями; p_2 – достовірність відмінностей показників у крові порівняно з печінкою; p_3 – достовірність відмінностей показників у крові порівняно з легенями.

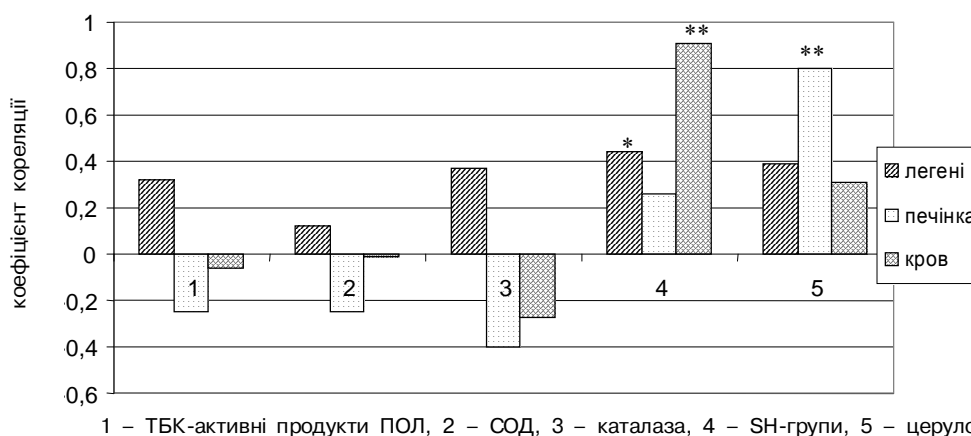


Рис. 1. Кореляція ступеня раннього апоптозу нейтрофілів легень, печінки і крові з показниками перекисного окиснення та антиоксидантного захисту в нормі.

Примітка. *,** – достовірність відмінностей коефіцієнтів кореляції (* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$).

Аналіз кореляцій показав, що ступінь раннього апоптозу нейтрофілів у легенях збільшується зі зростанням у крові вмісту продуктів ПОЛ і активності ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантного захисту. В легенях нейтрофіли найшвидше реагують на зміну оксидантно-антиоксидантного гомеостазу, зумовлюючи накопичення активованих нейтрофілів у капілярній сітці альвеол та поглиблюючи оксидативний стрес, що відповідає сучасному баченню основних механізмів стимулювання апоптозу в патологічних умовах [12]. В нормальних фізіологічних умовах деструктивна дія продуктів ПОЛ стримується багаторівневою системою антиоксидантного захисту, що показано в нашому дослідженні.

На відміну від процесів вільнорадикального окиснення в легенях, печінці та крові спостерігаються однонаправлені зміни перекисного окиснення та антиоксидантного захисту: в міру зростання апоптозу нейтрофілів у печінці й крові відбуваються зниження рівня ТБК-активних продуктів ПОЛ, СОД і каталази та зростання вмісту SH-груп та церулоплазміну. Оскільки печінка має захисні антиоксидантні системи, які визначають стійкість гепатоцитів до дії вільних радикалів у різних зонах печінкових часточок, у гомогенаті печінки відмічають найнижчий рівень раннього апоптозу нейтрофілів. Можна припустити, що в печінці ключову роль у підтриманні локального імунітету відіграють інші клітини, зокрема клітини Купфера, які є основою формування запальних реакцій шляхом продукування цитокінів та стимуляції апоптозу.

Потрібно зауважити, що рівень раннього апоптозу нейтрофілів легень, печінки і крові позитивно корелював із вмістом у крові вільних SH-груп та церулоплазміну. Відомо, що SH-групи білкових молекул, в основному віднов-

леного глутатіону, одними з перших беруть участь у нейтралізації вільних радикалів та токсинів [9]. Цей процес відбувається безперервно, що супроводжується посиленням утворенням відновленого глутатіону, який, очевидно, у фізіологічних умовах пропорційний до накопичення вільних радикалів, тому позитивно корелює зі ступенем первинного апоптозу. Щодо церулоплазміну відомо, що він синтезується переважно паренхіматозними клітинами печінки, меншою мірою – макрофагами і лімфоцитами, та захищає організм від накопичення вільних радикалів, що обґрунтовує сильний кореляційний зв'язок між ступенем раннього апоптозу нейтрофілів та вмістом церулоплазміну в гомогенаті печінки ($p < 0,01$).

ВИСНОВКИ. 1. Встановлено фізіологічні межі раннього апоптозу нейтрофілів легень, печінки і крові у статевозрілих нелінійних щурів-самців, які можна використовувати в умовах вивчення механізмів різноманітних патологічних процесів та встановлення ефективності корегувальних програм.

2. Посилення раннього апоптозу нейтрофілів гомогенату легень у фізіологічних умовах пов'язане зі збільшенням у крові продуктів ПОЛ, що активує процеси ферментативної і неферментативної ланок антиоксидантного захисту. Ранній апоптоз нейтрофілів печінки здорових щурів менш виражений за рахунок захисних властивостей ферментів антиоксидантної системи, зокрема церулоплазміну. В крові антиоксидантні властивості найбільше проявляють SH-групи, які одні з перших беруть участь у нейтралізації вільних радикалів та токсинів.

У перспективі стан раннього апоптозу нейтрофільних гранулоцитів буде досліджуватися в умовах експериментального гострого ураження легень.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. 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.
2. Барышников А. Ю. Fas/Apo-1 антиген – молекула, опосредующая апоптоз / А. Ю. Барышников, Ю. В. Шишкин // Гематология и трансфузиология. – 1995. – № 6. – С. 35–38.
3. Зенков Н. К. Окислительный стресс: биохимический и патофизиологический аспекты / Н. К. Зенков, В. З. Ланкин, Е. Б. Меньщикова. – М. : Наука “Интерпериодика”, 2001. – 343 с.
4. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 2000. – 280 с.
5. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 1982. – 311 с.
6. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
7. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика / под ред. Дж. Натвиг и др. – М. : Медицина, 1980. – 280 с.
8. Лю Б. Н. Старение, возрастные патологии и канцерогенез (кислородно-перекисная концепция) / Б. Н. Лю. – Алмата : Деуир, 2003. – 808 с.
9. Октябрьский О. Н. Редокс-регуляция клеточных функций / О. Н. Октябрьский, Г. В. Смирнова // Биохимия. – 2007. – 72, № 2. – С. 158–174.
10. Пасечник А. В. Апоптоз нейтрофилов как параметр воспалительной реакции при патологии различного генеза / А. В. Пасечник, В. А. Фролов, Н. Г. Гвоздь // Вестник РУДН, серия Медицина. – 2004. – № 1 (25). – С. 103.
11. Kam P. C. Apoptosis: mechanisms and clinical implications / P. C. Kam, N. I. Ferch // Anaesthesia. – 2000. – 55. – P. 1081–1093.
12. Kantari C. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity / C. Kantari, M. Pederzoli-Ribeil, V. Witko-Sarsat // Contrib. Microbiol. – 2008. – 15. – P. 118–146.
13. Strasser A. Apoptosis signaling / A. Strasser, L. O'Connor, V. M. Dixit // Annu. Rev. Biochem. – 2000. – № 69. – P. 217–245.
14. Van Engeland M. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure / M. Van Engeland, L. J. W. Nieland, F. C. Ramaekers // Cytometry. – 1998. – 31. – P. 1–9.

М. И. Марущак

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

РОЛЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И АПОПТОЗА НЕЙТРОФИЛОВ У КРЫС В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Резюме

Установлены физиологические пределы раннего апоптоза нейтрофилов легких, печени и крови и их взаимосвязь с показателями перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты у половозрелых неллинейных крыс-самцов, которые можно использовать в условиях изучения механизмов различных патологических процессов и установления эффективности корректирующих программ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апоптоз нейтрофилов, перекисное окисление липидов.

M. I. Marushchak

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I. YA. HORBACHEVSKY

ROLE OF FREE RADICAL PROCESSES AND NEUTROPHILS APOPTOSIS IN RATS IN PHYSIOLOGICAL CONDITIONS

Summary

Physiological levels of neutrophils early apoptosis in the lung, liver and blood and their relationship with indices of lipid peroxidation and antioxidant protection in rats are established. It can be used in studying of the mechanisms of various pathological processes and effectiveness of corrective programs.

KEY WORDS: neutrophils apoptosis, lipid peroxidation.

Отримано 18.04.11

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

О. Я. Міщенко, О. І. Тихонов, С. А. Гращенкова, Т. К. Юдкевич, Є. М. Горбань¹
 НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ
 НАЦІОНАЛЬНА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ ІМЕНІ П. Л. ШУПИКА¹, КИЇВ

АКТОПРОТЕКТОРНА АКТИВНІСТЬ НОВОГО КОМБІНОВАНОГО ЗАСОБУ “АПІТАР”

Вивчали актопротекторну активність нового комбінованого засобу “Апітар” у досліді примусового плавання щурів з навантаженням. Таблетки “Апітар” проявили актопротекторну активність на рівні 82 %, що не має достовірних відмінностей від активності препарату порівняння “Бурштинова кислота” (68 %). Встановлено, що механізмами реалізації актопротекторного ефекту таблеток “Апітар” є оптимізація енергозабезпечення за рахунок підвищення інтенсивності енергетично вигідних метаболічних процесів, збільшення вуглеводного резерву органів, посилення білоксинтетичних процесів у м’язах, виразне гальмування процесів перекисного окиснення ліпідів клітинних мембран та підвищення їх антиоксидантного захисту. Вірогідно підвищуючи і рівень відновленого глутатіону, і активність каталази, таблетки “Апітар” проявляють більш виражену захисну дію відносно фізіологічної антиоксидантної системи, ніж препарат порівняння “Бурштинова кислота”, який підвищує тільки активність каталази.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: антиоксидант, актопротектор, адаптоген.

ВСТУП. Підвищення напруженості сучасного темпу життя, збільшення стресових ситуацій, погіршення екологічних умов у зв’язку із забрудненням навколишнього середовища промисловими відходами та хімікатами, підвищення радіаційного фону – все це фактори, які знижують неспецифічну резистентність організму людини. Поряд із профілактичними гігієнічними заходами, пошук, використання та дослідження лікарських препаратів адаптогенної дії, що здатні підвищувати опірність людини до несприятливих факторів навколишнього середовища, є актуальними [7, 8, 15, 16]. Сучасна медицина має арсенал фармакологічних засобів, що стимулюють захисні сили організму, підвищуючи його працездатність та опірність до несприятливих факторів навколишнього середовища. Але найбільш фізіологічними вважають засоби, які не мають побічної дії та не викликають звикання, – природні адаптогени.

У цьому напрямку на кафедрі АТЛ НФаУ розроблено комбіновані таблетки “Апітар” (АП), до складу яких входять два продукти бджільництва – мед і квітковий пилок (КП) та бурштинова кислота.

Метою даної роботи було дослідження потенційних адаптогенних властивостей нового засобу.

© О. Я. Міщенко, О. І. Тихонов, С. А. Гращенкова, Т. К. Юдкевич, Є. М. Горбань, 2011.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Актопротекторну активність АП вивчали у досліді примусового плавання [7]. Експеримент проводили на щурах-самцях масою 190–220 г. Після визначення вихідної працездатності формували групи: 1-ша – тренований контроль (ТК, n=12); 2-га – піддавалася тренуванню, отримувала внутрішньошлунково за годину до плавання засіб АП у дозі 150 мг/кг (n=12) [6]; 3-тя – піддавалася тренуванню, отримувала препарат порівняння – таблетки “Бурштинова кислота” (БК, виробник ВАТ “Лубнифарм”) у дозі 46 мг/кг (перерахована з терапевтичної дози для людини за коефіцієнтом видової стійкості за Ю. Р. Риболовлевим, n=12) [5]; 4-та – нетренований контроль (НК, n=6), не піддавалася тренуванню, отримувала питну воду, в кінці досліді піддавалася аналогічному до тренованих тварин навантаженню плаванням; 5-та – інтактний контроль (ІК, n=6). Тварини 1–3 груп через день виконували роботу, що складала 50 % від максимальної тривалості плавання. На 14 добу в половини щурів 1–3 груп визначали тривалість плавання до повного стомлення (у хв) та розраховували актопротекторну активність за формулою: $AA = (t_{mk} - t_d) / t_{mk} \times 100 \%$, де t_{mk} – середня тривалість плавання тварин ТК; t_d – середня тривалість плавання тварин на тлі засобів. Іншій половині щурів 1–3 груп давали навантаження протягом часу, який

склав 30 % від максимального, що був визначений у першій половині щурів. Тварин декапітували під легким ефірним наркозом, збирали біологічний матеріал та визначали біохімічні показники, які характеризують стан метаболічних процесів, що забезпечують працездатність тварин: рівень глікогену [4], пірвіноградну кислоту (ПВК) та сукцинатдегідрогеназу (СДГ) [3], лактат (“Ольвекс-Діагностикум”), вміст білка [13]; ТБК-активні продукти (ТБК-АП), відновлений глутатіон (ВГ) та рівень каталази [1]. Отримані експериментальні дані обробляли методом варіаційної статистики за допомогою стандартного пакета програм “Statistica 6.0”. Прийнято рівень значущості $p < 0,05$. Утримання тварин та всі маніпуляції з ними здійснювали згідно із санітарно-гігієнічними нормами і принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, з дотриманням норм GLP (Страсбург, 1986) [10].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Під впливом засобу АП відбувалось вірогідне підвищення витривалості тварин до фізичного навантаження на 82 %, таблеток БК – на 68 %.

Аналіз біохімічних показників (табл. 1, 2) груп НК та ІК свідчить про те, що лімітувальним фактором витривалості тварин НК було підвищення рівня лактату, що призводило до роз-

витку ацидозу та порушення роботи циклу Кребса. Низький рівень активності СДГ (практично на рівні НК) вказував на недосконалість роботи циклу Кребса як джерела енергії при посиленому навантаженні у тварин ТК. Стан системи ПОЛ/АОС (табл. 2) характеризувався значним посиленням процесів ПОЛ [9, 11] щодо щурів ІК та НК, що й стало ще одним лімітувальним фактором працездатності у тренуваних тварин. Посилення біоксинтетичних процесів, що забезпечують структурну основу адаптації, не набувало досконалого рівня, оскільки вміст білка в м'язах підвищувався, проте цей процес не мав вірогідного характеру. На тлі введення досліджуваних засобів спостерігали зниження рівня лактату, вірогідне щодо НК, що вказувало на спроможність організму своєчасно його утилізувати, що можливо тільки за умов інтенсифікації аеробного шляху гліколітичних процесів. Підтвердженням активації енергетично вигідних метаболічних процесів під впливом засобів було вірогідне підвищення маркера активності циклу Кребса – СДГ в 1,8 та 1,5 раза щодо значень ТК, відповідно, для АП і БК. Інтенсифікація метаболічних процесів під впливом засобів відбувалась на тлі збільшеного вуглеводного фонду: глікогену в печінці в 1,5–1,6 раза та посилення біоксинтетичних процесів, про що свідчив вірогідно вищий вміст білка у м'язах в 1,7 та 1,3 раза щодо тварин ТК, відповідно, для

Таблиця 1 – Результати дослідження біохімічних показників у сироватці крові щурів за умов експерименту ($\bar{X} \pm S_x$)

Показник	Група тварин				
	ІК	НК	ТК	Т+АП, 150 мг/кг	Т+БК, 46 мг/кг
у сироватці крові					
Лактат, ммоль/л	5,19±0,14	14,13±1,02*	6,06±0,19**	4,75±0,65**	5,97±0,74**
ПВК, ммоль/л	0,078±0,002	0,039±0,004*	0,035±0,003**	0,028±0,001*	0,039±0,006*
у гомогенаті печінки					
Глікоген, мг%	1113±103	1147±94	1294±118	1881±82**/**/****	2038±109**/**/****
СДГ, ммоль/л	0,036±0,002	0,013±0,001	0,015±0,002*	0,027±0,002**/**/****	0,023±0,002**/**/****
у м'язах					
Білок, мг%	405,10±27,15	317,20±17,89	389,28±31,28	665,30±41,73**/**/****/****	515,86±34,43**/**/****

Примітка. Тут і в таблиці 2: * – відхилення вірогідне щодо значень групи інтактного контролю (ІК), $p < 0,05$; ** – відхилення вірогідне щодо значень групи нетренованого контролю (НК), $p < 0,05$; *** – відхилення вірогідне щодо значень групи тренуваного контролю (ТК), $p < 0,05$; **** – відхилення вірогідне щодо значень групи препарату порівняння, $p < 0,05$; n=6 – кількість тварин у кожній групі.

Таблиця 2 – Результати дослідження впливу засобів на показники ПОЛ, АОС ($\bar{X} \pm S_x$)

Показник	Група тварин				
	ІК	НК	ТК	Т+АП, 150 мг/кг	Т+БК, 46 мг/кг
у сироватці крові					
Каталаза, моль/л	26,3±10,8	17,2±8,6*	17,1±2,7*	31,3±4,9 ***	43,1±6,0 ***
у гомогенаті печінки					
ВГ, мкмоль/г	3,68±0,15	3,14±0,09	2,84±0,04	5,07±0,49 **/**/****/****	3,93±0,32
ТБК-АП, мкмоль/г	39,23±2,01	60,51±5,02*	126,92±22,36 **	64,103±7,02 **/**/****	69,49±4,50 **/**/****

АП і БК (табл. 1). Таблетки “Апітар” проявляли виразний гальмівний вплив на інтенсивність ПОЛ, знижуючи рівень ТБК-АП майже в 2 рази на тлі вірогідного зростання активності антиоксидантної системи: ВГ – в 1,8 рази, каталази – в 1,83 рази, тобто блокували лімітувальний фактор працездатності – посилення ліпопероксидації (табл. 2), засіб порівняння мав аналогічний вплив на енергозабезпечувальні процеси, проте не сприяв підвищенню ендogenous антиоксиданта ВГ.

Відомо, що КП містить цілий комплекс БАР (амінокислоти, вітаміни, фосфоліпіди, вуглеводи; макро- та мікроелементи, фенольні сполуки). Мед відомий як найцінніший енергізуючий засіб, багатий на БАР, які можуть сприяти забезпеченню його адаптогенної дії [2, 14].

Бурштинова кислота є субстратом енергоутворення, викликає ще й регуляторні зміни, зокрема підсилює продукування адреналіну і норадреналіну, тобто спричиняє гормонально-медіаторну активацію [12], що і приводить до посилення енергозабезпечення органів.

ВИСНОВКИ. 1. Таблетки “Апітар” проявляють виразну актопротекторну активність.

2. Поєднання КП, меду та БК в таблетках “Апітар” забезпечує багатофакторний ефективний механізм реалізації актопротекторної дії: оптимізацію активності енергетично вигідних метаболічних процесів, збільшення вуглеводного резерву органів, посилення білосинтетичних процесів, виразне гальмування процесів ПОЛ та підвищення антиоксидантного захисту клітин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Арутюнян А. В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / А. В. Арутюнян. – СПб. : ИКФ “Фолиант”, 2000. – 104 с.
2. Генсцикий И. П. Углеводный состав пчелиного меда и вопросы стандартизации его показателей / И. П. Генсцикий // Вопр. питания. – 1990. – № 5. – С. 57–60.
3. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – Минск : Беларусь, 2000. – Т. 2. – С. 103–104.
4. Прохорова М. И. Большой практикум по углеводному и липидному обмену / М. И. Прохорова, З. Н. Тушикова. – Л. : Изд-во Ленингр. ун-та, 1995. – С. 53–65, 260.
5. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев, Р. С. Рыболовлев // Доклады АН СССР. – 1979. – **247**, № 6. – С. 1513–1516.
6. Тихонов О. І. Дослідження фармакологічної активності таблеток “Апітар” та їх мікробіологічна чистота / О. І. Тихонов, А. Ю. Тимченко, С. А. Гращенко // Вісник фамації. – 2008. – № 3 (55). – С. 57–59.
7. Фармакологическая коррекция утомления / [Ю. Г. Бобков, В. М. Виноградов, В. Ф. Катков и др.] – М. : Медицина, 1984. – 207 с.
8. Яктон – новий перспективний вітчизняний актопротектор / Н. О. Горчакова, М. О. Лозинський, І. С. Чекман [та ін.] // Актуальні проблеми фізичної

культури і спорту. – 2003. – № 1. – С. 183–188.

9. Droge Wulf Free radicals in the physiological control of cell function / Droge Wulf // *Physiol. Rev.* – 2002. – **82**. – P. 47–95.

10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg, 1986. – № 123. – P. 52.

11. Free radical activity during concentration-induced injury to the extensor digitorum longus muscle of rats / A. McArdle, J. H. van der Meulen, M. Catapano [et al.] // *J. Physiol. (Lond.)*. – 1995. – **487**. – P. 157–158.

12. Kondrashova M. N. Succinic acid as a physiological signal molecule / M. N. Kondrashova / *Signal Molecule and Behaviour*. Manchester and NY: Manchester University Press. – 1991. – P. 295–300.

13. Lowry O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough, A. L. Fass // *J. Biol. Chem.* – 1957. – **193**, № 1. – P. 265–275.

14. Minckley R. L. Origins and ecological consequences of pollen specialization among desert bees / R. L. Minckley, J. H. Cane, L. Kervin // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* – 2000. – **267**, № 1440. – P. 265–271.

15. Panossian A. G. A historical overview and perspective / A. G. Panossian *Adaptogenes* // *Natural pharmacy*. – 2003. – **7**, № 4. – P. 3–8.

16. Panossian A. Plant adaptogens III. Earlier and more recent aspects and concepts on their mode of action / A. Panossian, G. Wikman, H. Wagner // *Phytomedicine*. – 1999. – **6**, № 4. – P. 287–300.

О. Я. Мищенко, А. И. Тихонов, С. А. Гращенко, Т. К. Юдкевич, Е. Н. Горбань¹
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ
НАЦИОНАЛЬНАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
ИМЕНИ П. Л. ШУПИКА¹, КИЕВ

АКТОПРОТЕКТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО КОМБИНИРОВАННОГО СРЕДСТВА “АПИТАР”

Резюме

Изучали актопротекторную активность нового комбинированного средства “Апитар” в опыте принудительного плавания крыс с нагрузкой. Таблетки “Апитар” проявили актопротекторную активность на уровне 82 %, что статистически не отличается от активности препарата сравнения “Янтарная кислота” (68 %). Установлено, что механизмами реализации актопротекторного эффекта таблеток “Апитар” являются оптимизация энергообеспечения за счет повышения интенсивности энергетически выгодных метаболических процессов, увеличение углеводного резерва органов, усиление белоксинтетических процессов в мышцах, выраженное угнетение процессов перекисного окисления липидов клеточных мембран и повышение их антиоксидантной защиты. Достоверно повышая и уровень восстановленного глутатиона, и активность каталазы, таблетки “Апитар” оказывают более выраженное защитное действие относительно физиологической антиоксидантной системы, чем препарат сравнения “Янтарная кислота”, под влиянием которого повышается только активность каталазы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антиоксидант, актопротектор, адаптоген.

O. Ya. Mishchenko, O. I. Tyhonov, S. A. Hrashchenkova, T. K. Yudkevych, Ye. M. Horban¹
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV
P. L. SHUPYK NATIONAL MEDICAL ACADEMY OF POST-GRADUATE EDUCATION¹, KYIV

ACTOPROTECTIVE ACTIVITY OF NEW COMBINED DRUG “APITAR”

Summary

Actoprotective activity of new combined drug “Apitar”, which consists of honey, bee pollen and succinic acid, in test of rats swimming with loading was conducted. The tablets “Apitar” had actoprotective effect on the level 82 %, which corresponds activity (68 %) of comparative drug – tablets “Succinic acid”. The mechanisms of actoprotective effect realization of drug “Apitar” are optimization of providing energy due to the increasing of energy advantageous metabolic processes intensity; increase of carbohydrate organs reserve; muscles protein synthetic processes strengthening; expressed inhibiting of lipid oxidization processes of cellular membranes and increase them antyoxydative defence. For certain promoting the level of the recovered glutathione and catalase activity, the tablets “Apitar” render more expressed antioxidative action, than comparative preparation “Succinic acid”, under influence of which activity of catalase rises only.

KEY WORDS: antioxidant, actoprotector, adaptogen.

Отримано 09.02.11

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

ДОСЛІДЖЕННЯ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ СОЛЕЙ
1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛТІОАЦЕТАТНИХ КИСЛОТ

Досліджено фізико-хімічні властивості солей 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот, такі, як: константа іонізації, величина поверхневого натягу, поверхневої активності та величина адсорбції.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: константа іонізації, поверхневий натяг, поверхнева активність, адсорбція, солі 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот.

ВСТУП. Синтетична хімія сьогодення володіє великою кількістю нових молекул, які за своєю структурою є похідними 1,2,4-тріазолу та проявляють широкий спектр фармакологічної дії [4, 6, 8]. В якості нових протигрибкових лікарських засобів, що містять у своїй структурі ядро 1,2,4-тріазолу та активно ввійшли у світову медичну практику, слід відзначити: позаконазол (Ноксафіл®), воріконазол (Віфенд®), ітраконазол (Орунгал®), флуконазол (Дифлюкан®) та ін. [7]. Прикладом солей 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот є морфоліній 5-метил-1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетат, який проявляє гепатопротекторну, кардіопротекторну, ранозагоювальну та противірусну активність.

У життєдіяльності організмів поверхневі явища мають велике значення. В організмі на поверхні розподілу фаз відбуваються процеси обміну, синтезу, адсорбції, десорбції, ферментативні реакції. Дія лікарських препаратів, токсичних сполук на організм також відбувається на поверхні розподілу фаз. Після адсорбції на поверхні розподілу фаз лікарські препарати потрапляють до біологічних мішеней шляхом пасивної дифузії. Величина, що характеризує цей процес, – ліпофільність ($\log P$), а для сполук, здатних до іонізації, – рН-залежна ліпофільність, що є похідною від $\log P$ та рКа. Знання величини константи іонізації необхідне для розуміння механізму проникнення та пролонгування дії лікарських речовин в організмі.

Отже, дослідження фізико-хімії поверхневих явищ, константи іонізації тісно пов'язане з визначенням цих важливих процесів.

Метою дослідження було потенціометричне визначення констант іонізації солей 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот, що кількісно

© А. І. Авраменко, А. А. Сафонов, О. Б. Роман, 2011.

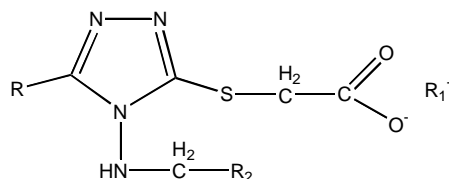
характеризують здатність тієї чи іншої молекули до приєднання або втрати протона [1], а також вивчення поверхневих явищ, які відбуваються на поверхні розподілу фаз. Для встановлення значень рКа, поверхневого натягу, поверхневої активності та величини адсорбції необхідно вирішити декілька завдань:

1. Вдосконалення препаративних методик синтезу. Знання рКа сполуки дає можливість легко розрахувати значення рН, при якому вона буде майже повністю перебувати в недисоційованому або ж, навпаки, іонному стані, що дозволяє використовувати для оптимізації способу виділення та очищення.

2. Дослідження впливу замісників на реакційну здатність сполук. Сила того чи іншого кислотного або основного центру залежить від його найближчого оточення та ефектів замісників, що впливають на перерозподіл електронної густини в молекулі.

3. Дослідження впливу замісників на величину поверхневого натягу, поверхневої активності та величину адсорбції.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктами дослідження були солі 1,2,4-тріазол-3-ілтїоацетатних кислот, які було синтезовано на кафедрі токсикологічної та неорганічної хімії Запорізького державного медичного університету (завідувач кафедри професор, доктор фармацевтичних наук О. І. Панасенко).



1. R=піридин-4-іл, $R_1=K$, $R_2=2$ -фурил;
2. R=піридин-3-іл, $R_1=Na$, $R_2=p-C_6H_4Cl$;

3. R=піридин-3-іл, R₁=NH₄, R₂=п-С₆Н₄Cl;
 4. R=піридин-4-іл, R₁=диметиламін, R₂=п-С₆Н₄Cl;
 5. R=піридин-4-іл, R₁= NH₄, R₂= п-С₆Н₄Cl.

Константи іонізації синтезованих сполук визначали методом потенціометричного титрування у водному розчині за допомогою йономіра ЭВ-74. Вимірювання проводили у чарунці, яку термостатували до стандартної (20 °С) температури, з використанням скляного (ЕСЛ6307) та хлорсрібного (ЕВЛ1193) електродів. Для визначення констант іонізації 0,01 М розчин досліджуваної сполуки титрували 0,1 М розчином хлороводневої кислоти десятима порціями по 0,25 мл кожна за допомогою піпетки-дозатора П-1 із вимірюванням значення рН після кожного додавання титранту [1, 2]. Знайдені константи розраховано за середнім значенням дослідів із відхиленнями, що не перевищували 0,05 одиниць, за формулою (1):

$$pK_a = pH + \lg ([HA] / [A^-]) \quad (1)$$

Поверхневий натяг визначали за методом Ребіндера. В пробірку наливали досліджувану рідину в такій кількості, щоб кінчик капіляра лише торкався її поверхні. За допомогою аспіратора в пробірці створювали розрідження, при якому через поверхню рідини продавлювалась бульбашка повітря. Визначали максимальний тиск по манометру як середню величину з трьох вимірювань. Вимірювання проводили з водою та розчинами досліджуваних сполук різних концентрацій у послідовності від менш до більш концентрованого [3, 5]. Поверхневий натяг розраховували за рівнянням (2):

$$\sigma_x = K \cdot P_x \quad (2)$$

де σ_x – поверхневий натяг розчинів, н/м; K – стала капіляра; P_x – максимальний тиск бульбашки повітря.

Для розрахунку поверхневої активності будували графік залежності поверхневого натягу від концентрації при даній температурі, $\sigma=f(c)$. Адсорбцію розраховували за рівнянням Гіббса (3):

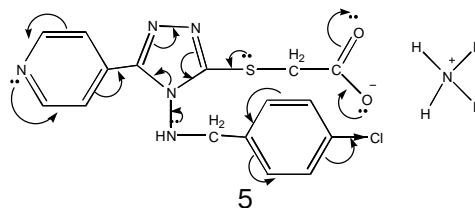
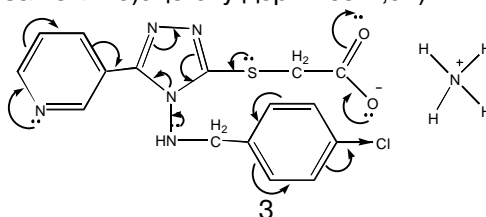
$$\Gamma = -\frac{C}{RT} \cdot \frac{d\sigma}{dc} \quad (3)$$

де Γ – величина адсорбції розчиненої речовини, моль/м²; C – загальна концентрація

розчину, моль/м³; R – газова стала; T – абсолютна температура, К; $\pm d\sigma/dc$ – поверхнева активність.

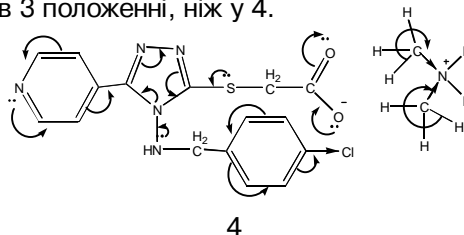
РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати досліджень наведено в таблиці 1.

Порівнюючи кислотні властивості амоній 2-(4-(4-хлорбензиламіно)-5-(піридин-3-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату(3) та натрій 2-(4-(4-хлорбензиламіно)-5-(піридин-3-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату(2), слід відзначити, що більш кислотні властивості притаманні амонійній солі рK_a=4,53. Цей факт можна пояснити тим, що катіон натрію має більш основні властивості, ніж катіон амонію (рK_a натрій 2-(4-(4-хлорбензиламіно)-5-(піридин-3-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату дорівнює 4,91).



3 – амоній 2-(4-(4-хлорбензиламіно)-5-(піридин-3-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетат; 5 – амоній 2-(4-(4-хлорбензиламіно)-5-(піридин-4-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетат.

Заміна радикала в 5 положенні тріазолового циклу амоній 2-(4-(4-хлорбензиламіно)-5-(піридин-3-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату на піридин-4-іл(5) призводить до підвищення основних властивостей рK_a=5,24. Це пояснюється меншим позитивним впливом атома азоту в 3 положенні, ніж у 4.

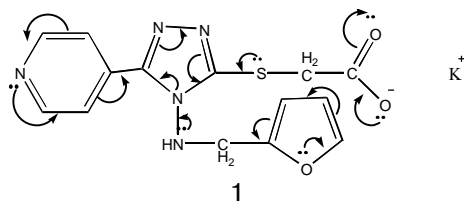


Таблиця 1 – Фізико-хімічні властивості солей 1,2,4-тріазол-3-ілтіоацетатних кислот

№ сполуки	R	R ₁	R ₂	pK _a	$\sigma \cdot 10^{-3}$	$\Gamma \cdot 10^{-6}$
1	піридин-4-іл	K	2-фурил	4,87	1,44	23,90
2	піридин-3-іл	Na	п-С ₆ Н ₄ Cl	4,91	3,12	18,20
3	піридин-3-іл	NH ₄	п-С ₆ Н ₄ Cl	4,53	4,95	10,00
4	піридин-4-іл	диметиламін	п-С ₆ Н ₄ Cl	6,31	5,40	8,40
5	піридин-4-іл	NH ₄	п-С ₆ Н ₄ Cl	5,24	5,62	7,50

4 – диметиламоній 2-(4-(4-хлорбензиламіно)-5-(піридин-4-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетат.

Заміна катіона амонію на катіон диметиламонію призводить до підвищення основних властивостей $pK_a=6,31$ за рахунок позитивного індуктивного ефекту двох метильних радикалів у молекулі диметиламонію.



1 – калій 2-(4-(фуран-2-ілметиламіно)-5-(піридин-4-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетат.

Порівнюючи кислотні властивості амоній 2-(4-(4-хлорбензиламіно)-5-(піридин-4-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату та калій 2-(4-(фуран-2-ілметиламіно)-5-(піридин-4-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату, слід відзначити, що більш кислотними властивостями володіє калій 2-(4-(фуран-2-ілметиламіно)-5-(піридин-4-іл)-4Н-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетат $pK_a=4,87$.

Це можна пояснити тим, що фурановий цикл має електронодонорний ефект менший, ніж позитивний ефект *p*-хлорбензолу.

Результати досліджень поверхневого натягу, величини адсорбції наведено на рисунках 1–2. З наведених графіків залежності поверхневого натягу та величини адсорбції від концентрації досліджуваних сполук випливає, що найменший поверхневий натяг та найбільша величина адсорбції спостерігаються для сполук 1 і 2, значно менші ці показники для сполук 3–5.

Це пояснюється будовою досліджуваних сполук та конкурентним впливом карбоксильної та амонійної груп.

ВИСНОВКИ. 1. Методом потенціометричного титрування визначено константи іонізації досліджуваних сполук. 2. Досліджено вплив замісників та перерозподілу електронної густини в молекулі на реакційну здатність сполук.

3. Досліджено вплив замісників на величину поверхневого натягу, поверхневої активності та величину адсорбції.

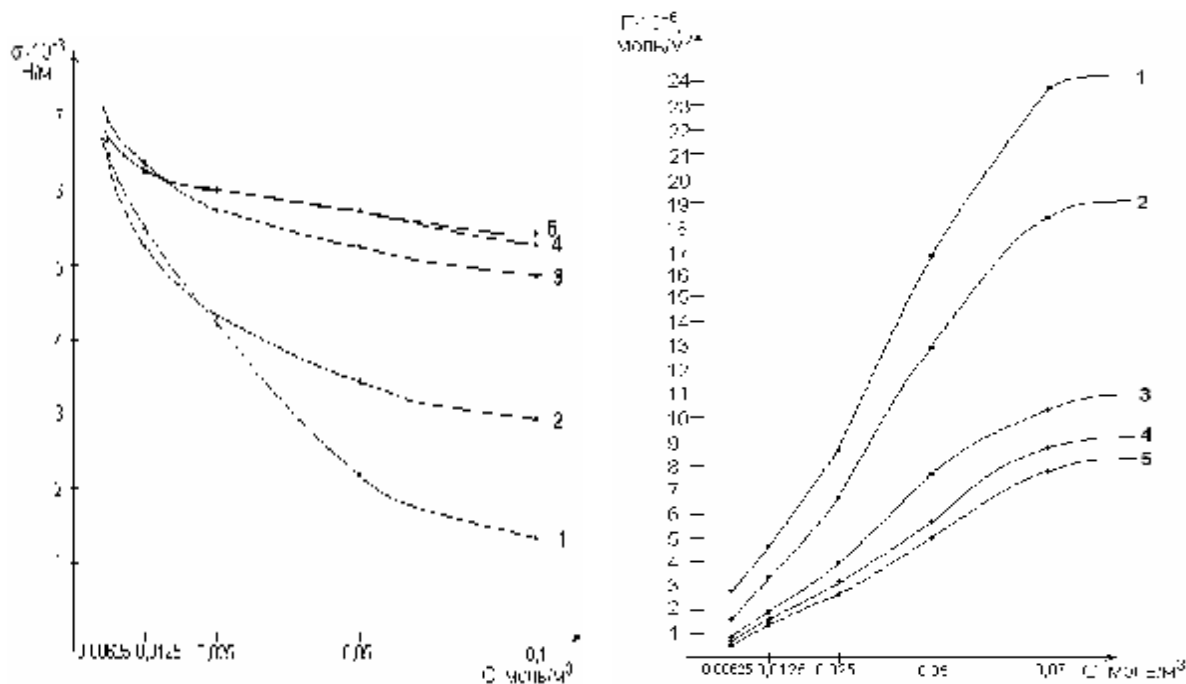


Рис. 1–2. Залежність поверхневого натягу та величини адсорбції від концентрації для сполук 1–5.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Альберт А. Константы ионизации кислот и оснований / А. Альберт, Е. Сержант ; пер. с англ. Б. А. Порай-Кошица. – М. : Химия, 1964. – 180 с.
2. Визначення констант іонізації 2-R-4(3H)хіназолінтіонів у змішаному розчиннику методом потенціометричного титрування / [А. І. Авраменко,

Т. М. Калугіна, В. О. Нікітін та ін.] // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки і практики. – Запоріжжя, 2008. – Вип. XXI. – С. 6–10.
3. Дулицкая Р. А. Практикум по физической и коллоидной химии / Р. А. Дулицкая, Р. И. Фельдман. – М. : Высшая школа, 1978. – 296 с.

4. Кныш Е. Г. Синтез, физико-химические и биологические свойства N- и S-замещенных 1,2,4-триазола : дис. ... д-ра фармац. наук / Кныш Е. Г. – Х., 1987. – 350 с.

5. Медицинская химия / [В. А. Калибачук, Л. И. Грищенко, В. И. Глинская и др.]. – К. : Медицина, 2008. – 400 с.

6. Панасенко О. І. Синтез, перетворення, фізико-хімічні та біологічні властивості аміно- і тіопохід-

них 1,2,4-триазолу : дис. ... д-ра фармац. наук / Панасенко О. І. – К., 2005. – 396 с.

7. Nickie D. Greer / Posaconazole (Noxafil): a new triazole antifungal agent / Nickie D. Greer // Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.). – 2007. – **20** (2). – P. 188–196.

8. Voriconazole compared with liposomal amphotericin B for empirical antifungal therapy in patients with neutropenia and persistent fever / T. Walsh, P. Pappas, D. Winston [et al.] // N. Engl. J. Med. – **346** (4). – P. 225–234.

А. И. Авраменко, А. А. Сафонов, О. Б. Роман
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СОЛЕЙ 1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ИЛТИОАЦЕТАТНЫХ КИСЛОТ

Резюме

Исследованы физико-химические свойства солей 1,2,4-триазол-3-илтиоацетатных кислот, такие, как: константа ионизации, величина поверхностного натяжения, поверхностной активности и величина адсорбции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: константа ионизации, поверхностное натяжение, поверхностная активность, адсорбция, соли 1,2,4-триазол-3-илтиоацетатных кислот.

A. I. Avramenko, A. A. Safonov, O. B. Roman
ZAPORIZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

STUDY OF PHYSICAL AND CHEMICAL PECULIARITIES OF SALTS OF 1,2,4-TRIAZOL-3-ILTIOACETIC ACIDS

Summary

There were studied the physico-chemical peculiarities of salts of 1,2,4-triazol-3-iltioacetic acids: ionization constant, the value of surface tension, surface activity and adsorption values.

KEY WORDS: ionization constant, surface tension, surface activity, adsorption, salt 1,2,4-triazol-3-iltioacetic acids.

Отримано 16.05.11

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

ЗМІНА ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ТА МОРФОСТРУКТУРИ ТОНКОЇ КИШКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ УРАЖЕННІ ОРГАНІЗМУ АЛЮМІНІО ХЛОРИДОМ

За умов експериментального ураження алюмінію хлоридом тонкої кишки проведено біохімічні дослідження крові та морфологічні дослідження даного органа білих щурів. Зростання антиоксидантних ферментів, а також збільшення кількості первинних і вторинних продуктів свідчать про інтенсивність перебігу вільнорадикального перекисного окиснення. Встановлено значні альтеративні та деструктивні зміни в стінці кишечника, спостерігаються інфільтративні процеси, а також виражені судинні розлади, які вказують на суттєві патоморфологічні ураження стінки тонкої кишки.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: перекисне окиснення ліпідів, білі щури, алюмінію хлорид, морфологія, тонка кишка.

ВСТУП. Протягом багатьох років дискусійним питанням для вчених було щоденне мінімальне надходження алюмінію, який адсорбується тонкою кишкою. Проблема залишається невирішеною через відсутність надійних методів дослідження. Поглинання алюмінію організмом залежить від багатьох системних і місцевих факторів. До останніх відносять кислотність шлункового соку та різні сполуки, з якими даний елемент утворює комплекси в просвіті кишечника.

На жаль, алюміній має кумулятивний ефект, тому навіть короткочасне надходження алюмінію може призвести до виникнення таких захворювань, як уремічний синдром, цукровий діабет, хвороба Альцгеймера, зменшення синтезу паратиреоїдного гормону [8–10]. Алюміній накопичується в організмі переважно в кістковій тканині, а також у головному мозку. Однак більшість металу, який надходить у кров, виділяється із сечею через декілька днів або тижнів, а кишково-шлунковий тракт забезпечує ефективний бар'єр щодо його поглинання [11].

Метою даної роботи було дослідити зміни функціонального стану і морфоструктури тонкої кишки білих щурів при експериментальному ураженні алюмінію хлоридом.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на 33 білих статевозрілих щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували в умо-

вах віварію. Усіх тварин поділили на дві групи. 1-ша (контрольна) група включала 17 практично здорових експериментальних тварин, які перебували у звичайних умовах віварію, 2-га – 16 щурів, яким вводили розчин алюмінію хлориду в розрахунку 190 мг/кг на масу тіла. Гостре отруєння моделювали шляхом внутрішньоочеревинного введення даного розчину з інтервалом через 7 днів від початку експерименту. На 14 добу від початку дослідження щурів вивели з експерименту шляхом швидкої декапітації згідно з Науково-практичними рекомендаціями з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [1, 2].

Нами було досліджено ряд біохімічних показників плазми крові експериментальних білих щурів. Інтенсивність перебігу вільнорадикального перекисного окиснення (ВРПО) в крові оцінювали за активністю антиоксидантних ферментів: супероксиддисмутази (СОД), каталази (КТ) і церулоплазмину (ЦП). Вищеперелічені ферменти захищають організм від високотоксичних кисневих радикалів, що постійно утворюються. За загальноприйнятими методиками також визначали вміст первинних продуктів (ВРПО) – дієнових кон'югатів (ДК) та вторинних – малонового діальдегіду (МДА). Керуючись даними літератури про те, що ендогенна інтоксикація організму зумовлена в основному середньомолекулярними пептидами, ми визначали коефіцієнт молекул середньої маси (K_{MCM}) як відношення (MCM_2) при

© Л. Т. Котляренко, О. М. Ярема, 2011.

довжині хвилі 280 нм до (MCM_1) при довжині хвилі 254 нм. Ступінь інтоксикації організму оцінювали за еритроцитарним індексом інтоксикації (Eli), а саме за кількістю поглинутого еритроцитарними мембранами барвника (метиленового синього).

Також проводили морфометричні виміри порожньої кишки, враховуючи при цьому висоту покривних епітеліоцитів, діаметр їх ядер, ядерно-цитоплазматичні відношення в них, відносний об'єм уражених епітеліоцитів, зовнішній і внутрішній діаметри дрібних артерій, товщину медії, індекс Вогенворта [7].

Для цього вирізані шматочки тонкої кишки, а саме в середній ділянці порожньої кишки, фіксували в 10,0 % розчині формаліну, обробленому за Ліллі при рН 7,2–7,4, а частину матеріалу – в 1,0 % розчині оцтової кислоти на 96° холодному етанолі, рідинах Карнуа, Ценкера, 96° етиловому спирті. Після зневоднення матеріал заливали в парафін. Парафінові зрізи фарбували гематоксиліном та еозином, за ван-Гізон, Маллорі, Вейгертом, реактивом Шіффа, альціановим синім, за модифікованим методом Грама, за Гримеліусом, Браше, Мак-Манусом-Хочкісом [5].

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням загальноприйнятих методів. Достовірність різниці між порівняльними величинами визначали за допомогою критерію Стюдента [3].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Біохімічні дослідження, проведені після гострого ураження тонкої кишки алюмінію хлоридом (табл. 1), показали накопичення продуктів вільнорадикального окиснення. Так, концентрація малонового діальдегіду за умов змодельованої патології зросла з ($2,75 \pm 0,05$) до ($10,49 \pm 0,78$) мкмоль/л ($p < 0,001$), тобто в 3,82 раза.

Біохімічні показники антиоксидантних ферментів у тварин контрольної та ураженої груп статистично достовірно відрізнялися ($p < 0,001$),

що вказувало на суттєвий інтенсивний розвиток патологічного процесу. Величина СОД за даних експериментальних умов зросла з ($0,111 \pm 0,004$) до ($0,184 \pm 0,009$) ум. од./мг. Ці показники суттєво відрізнялися між собою, остання кількісна величина була більшою за попередню на 65,8 %. В уражених білих щурів активність каталази підвищилась у 3,8 раза, а концентрація церулоплазміну – в 2,1 раза порівняно з цими ж показниками у тварин контрольної групи. Маркерами ендогенної інтоксикації є нагромадження молекул середньої маси та індекс еритроцитарної інтоксикації. За даних експериментальних умов показник K_{MCM} зріс із $0,950 \pm 0,003$ до $1,004 \pm 0,012$ ($p < 0,01$), а показник Eli – з ($35,6 \pm 0,6$) до ($74,6 \pm 0,9$) % ($p < 0,001$). Підвищення останнього показника було більшим ніж у 2 рази, що вказувало на значне ураження організму даним токсикантом.

Морфометричні виміри тонкої кишки (табл. 2) показали, що при отруєнні білих щурів алюмінію хлоридом у досліджуваному органі збільшувалася висота покривних епітеліоцитів з ($12,98 \pm 0,14$) до ($19,78 \pm 0,23$) мкм ($p < 0,001$). Наведені морфометричні параметри статистично достовірно відрізнялися між собою, і останній з них перевищував попередній в 1,5 раза. Збільшення розмірів вказаних структур можна пояснити гіперфункцією цих клітин, їх набряком, що виникає у відповідь на пошкодження даних досліджуваних елементів [4].

Діаметри ядер епітеліоцитів за даних умов патології зростали з ($3,84 \pm 0,05$) до ($4,49 \pm 0,08$) мкм ($p < 0,001$), тобто остання кількісна величина була більшою за попередню на 15,9 %. Виявлені диспропорційні та нерівномірні збільшення ядер і цитоплазми епітеліоцитів вказують на істотні порушення ядерно-цитоплазматичних відношень у цих клітинах. Названий показник зменшувався з $0,074 \pm 0,005$ до $0,048 \pm 0,0098$. Різниця між досліджуваними величинами виявилася суттє-

Таблиця 1 – Біохімічні показники плазми крові білих щурів у нормі та при ураженні алюмінію хлоридом ($M \pm m$)

Показник	Група тварин	
	1-ша (n=17)	2-га (n=16)
МДА, мкмоль/л	$2,75 \pm 0,05$	$10,49 \pm 0,27^{***}$
ДК, мкмоль/л	$3,11 \pm 0,11$	$3,22 \pm 0,31$
СОД, ум. од./мг	$0,111 \pm 0,004$	$0,184 \pm 0,009^{***}$
КТ, мкат л ⁻¹	$0,137 \pm 0,002$	$0,521 \pm 0,023^{***}$
ЦП, г/л	$6,35 \pm 0,22$	$13,34 \pm 0,54^{***}$
K_{MCM}	$0,951 \pm 0,003$	$1,004 \pm 0,004^{***}$
Eli, %	$35,6 \pm 0,6$	$74,6 \pm 0,9^{***}$

Примітка. * – позначено величини, що статистично достовірно відрізняються від аналогічних у групі контрольних тварин (***) – $p < 0,001$.

Таблиця 2 – Морфометричні показники тонкої кишки білих щурів при отруєнні алюмінію хлоридом ($M \pm m$)

Показник	Група тварин	
	1-ша (n=17)	2-га (n=16)
Висота покривних епітеліоцитів, мкм	12,98±0,14	19,78±0,23***
Діаметр ядер епітеліоцитів, мкм	3,84±0,05	4,49±0,08***
Ядерно-цитоплазматичні відношення	0,074±0,005	0,048±0,009*
Відносний об'єм уражених епітеліоцитів, %	1,93±0,03	43,90±3,20***
Зовнішній діаметр артерій, мкм	36,23±0,28	42,38±0,71***
Внутрішній діаметр артерій, мкм	12,50±0,12	9,80±0,32***
Індекс Вогенворта, %	840,04±10,30	1870,16±25,40***
Товщина медії, мкм	7,25±0,06	13,05±0,31***

Примітка. * – позначено величини, що статистично достовірно відрізняється від контрольних (* – $p < 0,05$; *** – $p < 0,001$).

вою ($p < 0,05$). Більшість авторів [4, 6, 9] вказує на те, що даний параметр є високоінформативною та об'єктивною ознакою порушень структурного гомеостазу на клітинному рівні. Значно збільшився у змодельованих патологічних умовах відносний об'єм уражених епітеліоцитів ((24,90±3,20) %), що перевищувало аналогічний контрольний морфометричний параметр у 22,7 раза.

Аналізуючи морфометричні виміри діаметрів артерій, нами встановлено, що при отруєнні щурів алюмінію хлоридом зовнішній та внутрішній діаметри дрібних артерій достовірно відрізнялися від відповідних показників у тварин контрольної групи. Так, зовнішній діаметр дрібних артерій зростає із (36,23±0,28) до (42,38±0,71) мкм. Різниця між наведеними величинами була значною ($p < 0,01$), і другий показник перевищував попередній на 16,97 %. Внутрішній діаметр досліджуваних судин у білих щурів, отруєних алюмінію хлоридом, зменшувався з (12,50±0,12) до (9,80±0,32) мкм ($p < 0,001$), тобто на 21,6 %. Відповідно, індекс Вогенворта в цих експериментальних тварин зріс у 2,23 раза, а товщина медії – на 80,0 %. Слід відмітити, що дані величини статистично достовірно ($p < 0,001$) відрізнялися порівняно з відповідними показниками у контрольній групі. Динаміка вищенаведених морфометричних параметрів вказувала на істотне погіршення кровопостачання стінки тонкої кишки у змодельованих патологічних умовах.

При мікроскопічному дослідженні у тонкій кишці експериментальних тварин мали місце

виражені альтеративні та деструктивні процеси, спостерігали набряк слизової оболонки, підслизової основи та м'язової оболонки на фоні розширених кровоносних судин. Виникали розлади мікрогемодинаміки у вигляді стазу, діapedезних крововиливів. Строма підслизової основи та слизової оболонки інфільтрована клітинними елементами, межі між окремими клітинами не чіткі, цитоплазма епітеліоцитів набрякла, поширені явища вогнищевої десквамації покривних епітеліоцитів.

Наведені морфологічні зміни свідчать про те, що у стінці тонкої кишки широко представлені альтеративні, інфільтративні процеси, а також виражені судинні розлади, які вказують на суттєве ураження тонкої кишки за даних умов експерименту.

ВИСНОВКИ. При гострому ураженні тонкої кишки відбуваються суттєва активізація процесів вільнорадикального окиснення, підвищене накопичення в крові токсичних продуктів перекисного окиснення ліпідів, які є показниками токсемії. Встановлені структурно-функціональні варіанти адаптаційно-компенсаторних процесів у тонкій кишці експериментальних тварин при дії алюмінію хлориду дають можливість глибше та всесторонньо розкрити закономірності патоморфогенезу тонкої кишки при дії солей алюмінію, що дозволяє об'єктивно оцінювати ступінь патологічних змін і може бути використано в практичній діяльності патогістологів, морфологів, токсикологів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Етика лікаря та права людини: положення про використання тварин у біомедичних дослідках // Експерим. та клін. фізіологія і біохімія. – 2003. – № 2 (22). – С. 108–109.
2. Кожем'якін Ю. М. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з

ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов. – К. : Авіцена, 2002. – 155 с.

3. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : Морион, 2001. – 408 с.

4. Саркисов Д. С. Структурные основы адаптации компенсации нарушенных функций / Д. С. Саркисов. – М. : Медицина, 1997. – 448 с.
5. Сорочинников А. Г. Гистологическая и микроскопическая техника / А. Г. Сорочинников, А. Е. Доросевич. – М. : Медицина, 1987. – 448 с.
6. Шестакова М. В. Дисфункция эпителия – причина или следствие метаболического синдрома / М. В. Шестакова // Рос. мед. журн. – 2001. – № 2. – С. 88–90.
7. Шорманов С. В. Морфологические изменения коронарных артерий при экспериментальной коарктации аорты и после ее устранения / С. В. Шорманов // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1982. – **82**, № 1. – С. 98–107.
8. Cannata-Andia J. B. The clinical impact of aluminium overload in renal failure / J. B. Cannata-Andia, J. L. Fernandez-Martin // Nephrol Dial Transplant. – 2002. – **17**. – P. 9–12.
9. Drueke T. B. Intestinal absorption of aluminium in renal failure / T. B. Drueke // Nephrol. Dial. Transplant. – 2002. – **17**. – P. 13–16.
10. Effect of aluminium load on parathyroid hormone synthesis / C. Diaz-Corte, J. L. Fernandez-Martin, S. Barreto [et al.] // Nephrol Dial Transplant. – 2001. – **16**. – P. 742–745.
11. Silicon, aluminium, arsenic and lithium: essentiality and human health implications / A. M. Perez-Granados, M. P. Vaquero // J. Nutr. Health Aging. – 2002. – **6**. – P. 154–162.

Л. Т. Котляренко, О. М. Ярема

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И. Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ И МОРФОСТРУКТУРЫ ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОРАЖЕНИИ ОРГАНИЗМА АЛЮМИНИЯ ХЛОРИДОМ

Резюме

В условиях экспериментального поражения алюминия хлоридом тонкого кишечника проводили биохимические исследования крови и морфологические исследования данного органа белых крыс. Возрастание антиоксидантных ферментов, а также увеличение количества первичных и вторичных продуктов свидетельствуют об интенсивности протекания свободнорадикального перекисного окисления. Установлены значительные альтеративные и деструктивные изменения в стенке кишечника, наблюдаются инфильтративные процессы, а также выраженные расстройства сосудов, что указывают на существенные патоморфологические поражения стенки тонкой кишки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: перекисное окисление липидов, белые крысы, алюминия хлорид, морфология, тонкий кишечник.

L. T. Kotlyarenko, O. M. Yarema

I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPII STATE MEDICAL UNIVERSITY

CHANGES ON THE FUNCTIONAL STATE AND MORPHOSTRUCTURE OF SMALL INTESTINE AT THE EXPERIMENTAL DAMAGE OF ORGANISM BY ALUMINUM CHLORIDE

Summary

At the experimental damage of aluminum chloride there were performed biochemical investigations of blood and morphostructure study changes in a small intestine of white rats. Increase of antioxidant enzymes and increase the number of primary and secondary products, shows the intensity of flow of free-radical oxidation. There were established changes of dystrophic and alterative processes in the wall of the small intestine, observed infiltrative processes, and expressed vascular disorders, indicating a significant patomorphological damage wall of the small intestine.

KEY WORDS: lipid peroxidation, white rats, aluminum chloride, morphology, small intestine.

Отримано 18.05.11

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

СЛИННА АЛЬФА-АМІЛАЗА ЯК МАРКЕР РЕАКЦІЇ ОРГАНІЗМУ НА ПСИХОЕМОЦІЙНЕ НАПРУЖЕННЯ

Досліджено залежність зміни активності альфа-амілази в змішаній слині молодих людей від психоемоційного напруження і типологічних характеристик особистості. Слинна альфа-амілаза є індикатором психоемоційного стресу та маркером активності симпато-адреналової системи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **слинна альфа-амілаза, ротова рідина, психоемоційний стрес.**

ВСТУП. Стрес – загальна неспецифічна реакція організму на дію надзвичайних подразників (стресорів), що характеризується активацією нейрогуморальних механізмів та зумовленими ними метаболічними і функціональними змінами адаптивного характеру. Але надмірно сильна або тривала дія на організм стресорних чинників може викликати стійкі пошкодження клітин, що складає основу психосоматичних захворювань (ішемічна хвороба серця, виразкова хвороба шлунка та ін.). З'ясовано, що тяжкість метаболічних і структурних змін при стресі суттєво залежить від індивідуального типу реагування організму, зумовленого змінами нейромедіаторного балансу [1]. Саме стійкі пошкодження, що зберігаються від одного стресорного епізоду до другого, сприяють формуванню психосоматичних розладів [6]. Отже, пошук індикаторів психоемоційного напруження є актуальною проблемою медицини.

Найбільш об'єктивним методичним підходом для розкриття питання про зв'язок метаболічних змін і типу реагування особистості на дію стресорних чинників, на наш погляд, є дослідження складових компонентів слини. По-перше, ще з часів класичних досліджень академіка І. П. Павлова добре обґрунтована висока чутливість слинних залоз до нейрогуморальних регуляторів, що стало основою вчення про умовно-рефлекторну діяльність кори головного мозку. По-друге, саліводіагностика є об'єктивним неінвазивним методом для діагностики та прогнозу окремих захворювань [10]. Відомо, що головну роль в адаптації до стресогенної ситуації, яка залежить від

метаболічного забезпечення функцій організму, відіграють індивідуально-особистісні характеристики.

Метою даного дослідження було визначити вплив психоемоційного стресу (екзамен) на біохімічні показники ротової рідини, у тому числі на активність альфа-амілази, а також визначити залежність зміни цих показників від рівня тривожності та індивідуально-особистісних характеристик.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Обстежено 103 молодих людини обох статей (студенти ВНЗ) віком 18–22 років, яких поділили на дві групи: контрольну групу склали молоді люди у стані відносного спокою (за два тижні до складання іспиту), дослідну групу – ті ж особи, обстеження яких проводили безпосередньо перед складанням екзамену. Для перевірки відтворюваності отриманих результатів дослідження виконували у два етапи. На першому етапі обстежено 36 молодих людей обох статей, на другому – 67 осіб того ж віку. Обидва етапи експерименту проводили в одну і ту ж пору року (червень–початок липня) для виключення впливу сезонних ритмів. Нестимульовану ротову рідину збирали шляхом спльовування у попередньо зважені пробірки. В ротовій рідині визначали вміст загального білка [4], активність альфа-амілази [8], каталази [5], а також швидкість секреції ротової рідини та вміст окиснювально-модифікованих білків (ОМБ) у модифікації Д. Г. Ажицького [7]. Для оцінки ситуативної та особистісної тривожності використовували опитувальник Спілбергера–Ханіна, для визначення типу реагування особистості – 16-факторний особистісний опитувальник

© В. Ю. Цубер, 2011.

Кеттелла [2]. Статистичний аналіз результатів дослідження проводили з використанням критерію t-Стюдента та коефіцієнта кореляції Пірсона.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. А. Вплив психоемоційного напруження на активність альфа-амілази.

Нами встановлено, що при психоемоційному стресі на першому етапі дослідження активність альфа-амілази в ротовій рідині достовірно підвищилася на 7,71 % порівняно з контролем ($p < 0,05$). На другому етапі спостерігалася така ж закономірність – активність альфа-амілази за цих умов зросла на 10,1 % ($p < 0,01$) (табл. 1). Швидкість секреції ротової рідини та концентрація загального білка в ротовій рідині в обох групах досліджень достовірно не змінилися порівняно з контролем ($p > 0,05$) (табл. 1).

Визначення густини ротової рідини за умов психоемоційного напруження показало її достовірне зростання на 9,2 % відносно контрольних величин ($p < 0,005$) (табл. 1), що може свідчити про підвищений вміст муцину.

Дані опитувальника Спілбергера–Ханіна в обох групах досліджень свідчать про стресогенний вплив психоемоційного напруження під час складання іспиту як значимої події у житті молодих людей. Ситуативна тривожність за умов психоемоційного напруження на першому етапі дослідження достовірно збільшилась на 27,91 % ($p < 0,001$), на другому етапі – на 42,9 % ($p < 0,001$), що відображає паралелізм

змін активності альфа-амілази в ротовій рідині та ступеня емоційного напруження (табл. 1). Особистісна тривожність на першому етапі дослідження суттєво не змінилася ($p > 0,05$), на другому – збільшилась на 9,99 % ($p < 0,05$), що може бути пов'язано з більш вираженим зростанням ситуативної тривожності (табл. 1).

Отже, підвищення активності слинної альфа-амілази під впливом психоемоційного напруження порівняно з контролем, що відбувається синхронно зі значним зростанням ситуативної тривожності, свідчить про залежність активності ферменту від ступеня активації стресреалізуючих систем.

Слинну альфа-амілазу останнім часом вважають одним із надійних біомаркерів стресорної реакції [11]. Проведені нами дослідження переконують у тому, що даний показник є добре відтворюваним, тобто об'єктивно відображає залежність білково-синтетичної та секреторної функцій слинних залоз від ступеня емоційного напруження особистості.

Б. Залежність активності альфа-амілази в ротовій рідині від індивідуально-особистісних характеристик.

У літературних джерелах досить обмежені дані про взаємозв'язок змін вмісту окремих компонентів ротової рідини з типологічними характеристиками особистості за умов психоемоційного напруження. На підставі визначення низки кардіоваскулярних показників доведено, що люди, які намагаються контролювати свої емоції та виражати їх у соціально прийнятній формі, реагують на стрес

Таблиця 1 – **Зміна параметрів ротової рідини у молодих людей у стані відносного спокою (контроль) та за умов психоемоційного стресу ($M \pm m$)**

Показник	Контроль	Стрес	Відхилення від M, %	p
Швидкість секреції ротової рідини, г/хв (1)	0,471±0,045	0,470±0,053	--	>0,05
Швидкість секреції ротової рідини, мл/хв (2)	0,519±0,032	0,553±0,039	--	>0,05
Густина ротової рідини, г/мл (2)	1,093±0,149	1,190±0,238	↑ 9,2	<0,005
Концентрація загального білка, г/л (1)	2,202±0,124	2,148±0,158	--	>0,05
Концентрація загального білка, г/л (2)	2,591±0,134	2,708±0,129	--	>0,05
Активність альфа-амілази, мг/с·л (1)	25,149±0,693	27,086±0,525	↑ 7,706	<0,05
Активність альфа-амілази, мг/с·л (2)	25,875±0,419	28,475±0,606	↑ 10,1	<0,001
Ситуативна тривожність (1)	42,50±1,40	54,36±2,22	↑ 27,91	<0,001
Ситуативна тривожність (2)	40,42±0,96	57,76±1,54	↑ 42,9	<0,001
Особистісна тривожність (1)	43,57±1,52	43,80±1,41	--	>0,05
Особистісна тривожність (2)	39,58±0,98	43,36±1,16	↑ 9,99	<0,05

Примітка. (1) – перший етап експерименту; (2) – другий етап експерименту.

більшою активацією симпатичної нервової системи [3].

Для оцінки залежності біохімічних показників змішаної слини від індивідуально-особистісних характеристик нами був використаний 16-факторний опитувальник Кеттелла [2]. За допомогою кореляційного аналізу виявлено достовірний зв'язок між активністю слинної альфа-амілази та особистісними рисами молодих людей як за умов психоемоційного стресу, так і в стані відносного спокою. Встановлено, що у безстресових умовах активність альфа-амілази в ротовій рідині позитивно корелювала з фактором Н опитувальника Кеттелла "боязливність – сміливість" ($r=+0,394$; $p<0,05$). Можна припустити, що для "сміливих, авантюристичних, схильних до ризику" осіб характерна більша активність слинної альфа-амілази у стані відносного спокою. У безстресових умовах активність альфа-амілази проявляла достовірну позитивну кореляцію з фактором Q3 "низька самооцінка – висока самооцінка" ($r=+0,361$; $p<0,05$). Особистості з високим балом за цією шкалою є вольовими, контролюють свої емоції та поведінку.

У стані психоемоційного напруження спостерігалась позитивна кореляція активності слинної альфа-амілази з інтегративним фактором F4 опитувальника Кеттелла "конформ-

ність – незалежність" ($r=+0,322$; $p<0,05$). Згідно з інтерпретацією шкали опитувальника Кеттелла, низькі показники цього фактора означають переважання пасивності та потреби в підтримці, високі – сміливість, ініціативність. У стані психоемоційного напруження спостерігалась також достовірна позитивна кореляція активності слинної альфа-амілази з фактором М "практичність – мрійливість" ($r=+0,323$; $p<0,05$). Високі показники за цією шкалою властиві людям, які "мрійливі, з багатим творчим потенціалом, багатою уявою". Таким чином, підвищення активності слинної альфа-амілази, яке може вказувати на звичну більшу активацію симпато-адреналової системи, спостерігається в особистостях з високим творчим та інтелектуальним потенціалом, схильних до незалежності, агресивності, зібраних, енергійних, з високим самоконтролем та силою волі.

ВИСНОВКИ. Зміни активності альфа-амілази в ротовій рідині залежно від типологічних характеристик особистості свідчать про взаємозв'язок даних параметрів з індивідуальною стресостійкістю організму. Визначення активності альфа-амілази в ротовій рідині є об'єктивним маркером стресогенного впливу на організм і типу реагування особистості у стресовій ситуації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Белова Т. И. Катехоламины мозга в условиях экспериментальных перенапряжений / Т. И. Белова, Р. Квентанский. // Усп. физиол. наук. – 1981. – 12 (2). – С. 67–90.
2. Елисеев О. П. Практикум по психологии личности / О. П. Елисеев. – СПб. : Питер, 2006. – 512 с.
3. Зорій А. І. Взаємозв'язок особистісних рис студентів-медиків і показників вегетативної нервової системи під час складання іспитів / А. І. Зорій // Мед. психологія. – 2010. – № 1. – С. 15–18.
4. Коробейникова Э. Н. Количественное определение белка и муцина (гликопротеинов) в слюне / Э. Н. Коробейникова, Е. И. Ильиных // Клин. лаб. диагностика. – 2001. – № 8. – С. 34–35.
5. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 9–13.
6. Меерсон Ф. З. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф. З. Меерсон, М. Г. Пшенникова. – М. : Медицина, 1988. – 256 с.
7. Методика и результаты определения уровня окисленномодифицированных белков в слюне / Д. Г. Ажицкий, С. И. Жадько, Г. Ю. Ажицкий [и др.] // Вісник стоматології. – 2000. – № 4. – С. 19–20.
8. Методы исследования в профпатологии / под ред. О. Г. Архиповой. – М. : Медицина, 1988. – 208 с.
9. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения / Е. Е. Дубинина, С. О. Бурмистров, Д. А. Ходов [и др.] // Вопр. мед. химии. – 1995. – 41 (1). – С. 24–25.
10. Слюнные железы (биохимия, физиология, клинические аспекты) / Л. М. Тарасенко, Г. А. Суханова, В. П. Мищенко [и др.]. – Томск : изд-во НТЛ, 2002. – 124 с.
11. Nater U. M. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research / U. M. Nater, N. Rohleder // Psychoneuroendocrinology. – 2009. – № 34. – P. 486–496.

СЛЮННАЯ АЛЬФА-АМИЛАЗА КАК МАРКЕР РЕАКЦИИ ОРГАНИЗМА НА ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНОЕ НАПРЯЖЕНИЕ

Резюме

Исследована зависимость изменения активности альфа-амилазы в смешанной слюне молодых людей от психоэмоционального напряжения и типологических характеристик личности. Слюнная альфа-амилаза является индикатором психоэмоционального стресса и маркером активности симпато-адреналовой системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **слюнная альфа-амилаза, ротовая жидкость, психоэмоциональный стресс.**

V. Yu. Tsuber
UKRAINIAN MEDICAL STOMATOLOGICAL ACADEMY, POLTAVA

SALIVARY ALPHA-AMYLASE AS A MARKER OF ORGANISM REACTION TO PSYCHOEMOTIONAL STRESS

Summary

A relationship of alterations of activity of alpha-amylase in whole saliva with psychoemotional stress and personality typological characteristics is studied. Salivary alpha-amylase is an indicator of psychoemotional stress and a marker of activity of the sympatho-adrenal axis.

KEY WORDS: **salivary alpha-amylase, whole saliva, psychoemotional stress.**

Отримано 21.04.11

Адреса для листування: В. Ю. Цубер, вул. Степового Фронту, 34, кв. 66, Полтава, 36021, Україна.

**ВИВЧЕННЯ ГАСТРОТОКСИЧНОСТІ МЕТИЛОВОГО
ЕСТЕРУ N-[(2-ОКСОІНДОЛІНІЛІДЕН-3)-2-ОКСІАЦЕТИЛ]-
АМІНООЦТОВОЇ КИСЛОТИ**

У роботі наведено результати експериментальних досліджень гастротоксичності метилового естеру N-[(2-оксоіндолініліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти, що проявляє виражені протизапальні властивості. Встановлено, що вказана сполука, на відміну від препарату порівняння – вольтарену, не впливає на секреторну функцію шлунка і не чинить ульцерогенної дії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: протизапальні засоби, гастротоксичність, ульцерогенна дія, секреторна функція шлунка.

ВСТУП. Нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) відносять до найважливіших “симптоматичних” лікарських засобів, які широко застосовують практично в усіх галузях медицини [3]. На сьогодні створено понад 50 НПЗЗ, але, на жаль, усі вони мають побічні ефекти [5, 7–9]. До найбільш розповсюджених проявів побічної дії НПЗЗ належать ураження шлунково-кишкового тракту, які виділено в окремих синдромах – НПЗЗ-гастродуоденопатію. Він проявляється диспепсією, болем в епігастрії, анорексією, езофагітом, запорами або проносами, утворенням ерозій та виразок у шлунку і дванадцятипалій кишці, шлунково-кишковими кровотечами та ін. [6]. У зв'язку з цим, проблема безпечної гастропатії залишається невирішеною, як і проблема пошуку раціональних методів терапії запальних захворювань.

Метою даного дослідження було вивчення гастротоксичності метилового естеру N-[(2-оксоіндолініліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти – сполуки, що проявляє виражені протизапальні властивості.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом досліджень став метиловий естер N-[(2-оксоіндолініліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти, який, за результатами проведених нами скринінгових досліджень, має виражені протизапальні властивості (антиексудативну, анальгетичну, жарознижувальну активність).

© Т. О. Лой, Т. І. Тюпка, Н. М. Кононенко, 2011.

Препаратом порівняння було обрано вольтарен (Novartis Pharma, Швейцарія).

Експерименти проводили на 60 білих нелінійних щурах масою 180–200 г. Досліди виконували відповідно до національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001), які узгоджуються з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1985). До початку експериментів щури перебували на 24-годинному голодуванні без обмеження води. Проводили 2 серії експериментів: перша – вивчення ульцерогенної дії за результатами макроскопічного дослідження слизової оболонки шлунка; друга – вивчення секреторної функції шлунка. Кожну серію експериментів виконували на 3-х групах тварин (по 10 щурів у кожній): 1-ша група – інтактний контроль; 2-га – щури, яким внутрішньошлунково вводили досліджувану речовину – метиловий естер N-[(2-оксоіндолініліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти в ефективній дозі, визначеній за антиексудативною активністю (8 мг/кг); 3-тя – щури, яким внутрішньошлунково вводили водний розчин вольтарену в дозі 8 мг/кг. Інтактним тваринам вводили еквівалентну кількість розчинника. Через 3 год щурів виводили з експерименту шляхом дислокації шийних хребців під ефірним наркозом і виконували макроскопічне дослідження слизової оболонки шлунка за допомогою

лупи. Ульцерогенну дію вивчали за методом Marrasi-Uberti [10] й оцінювали в балах: 0 балів – відсутність пошкоджень; 0,5 бала – набряк, гіперемія, краплинні крововиливи; 1 бал – 2–3 невеликі виразки; 2 бали – більше 3-х невеликих виразок; 3 бали – виразка значних розмірів; 4 бали – декілька великих виразок; 5 балів – перфорація.

Перед проведенням другої серії експериментів тварин утримували на голодній дієті протягом 48 год. Секреторну функцію шлунка вивчали за методом [1]. Через 1 год після введення щурам 1-ї, 2-ї, 3-ї груп води очищеної, досліджуваної сполуки та вольтарену відповідно тваринам під барбаміловим наркозом (40 мг/кг) робили лапаротомію і накладали лігатуру на пілоричний сфінктер шлунка, ще через 4 год накладали лігатуру на кардіальний сфінктер, виймали шлунок і вимірювали об'єм шлункового соку, перераховували на 100 г маси тіла тварини. Загальну кислотність шлункового соку визначали шляхом його титрування 0,1N розчином їдкого натру (NaOH) за присутності індикаторів фенолфталеїну та бромотимолового синього. Загальну і вільну кислотність виражали кількістю мілілітрів 0,1N розчину NaOH, необхідного для нейтралізації 100 мл шлункового соку. Зв'язану кислотність визначали за різницею між загальною і

вільною кислотністю. Результати досліджень обробляли статистично з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) та програми STATISTICA (версія 6.0) [2, 4].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналіз результатів досліджень показав, що при внутрішньошлунковому введенні метилового естеру N-[(2-оксоіндолініліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти у 4-х щурів з групи (n=10) спостерігали пошкодження слизової оболонки шлунка у вигляді набряку і гіперемії, тобто відповідали 0,5 бала, у решти тварин пошкодження були відсутніми. Інтенсивність ураження в цій групі складала в середньому 0,2 бала (табл. 1).

У тварин, які одержували вольтарен, визначали пошкодження слизової оболонки шлунка різного ступеня: у 2-х щурів – набряк, гіперемію, краплинні крововиливи (0,5 бала); у 2-х – по 2 невеликі виразки на фоні гіперемії (1 бал); у 6 – по 4–5 невеликих виразок (2 бали). Інтенсивність ураження слизової оболонки шлунка у цій групі складала в середньому 1,5 бала (табл. 1).

Результати досліджень підтверджують літературні дані про наявність гастротоксичної дії вольтарену [6, 8]. Показники секреторної функції шлунка наведено в таблиці 2. Встанов-

Таблиця 1 – Інтенсивність ураження слизової оболонки шлунка щурів під впливом метилового естеру N-[(2-оксоіндолініліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти та вольтарену

Група щурів	Інтенсивність ураження, бали X		
	X _{min}	X _{max}	X _{min} ·X _{max}
Інтактний контроль (n=10)	–	–	–
Метилловий естер N-[(2-оксоіндолініліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти (n=10)	0	0,5	0,2*/**
Вольтарен (n=10)	0,5	2,0	1,5

Примітки: 1. * – вірогідно відносно інтактного контролю.
2. ** – вірогідно відносно препарату порівняння вольтарену.

Таблиця 2 – Вплив метилового естеру N-[(2-оксоіндолініліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти та вольтарену на секреторну функцію шлунка

Група щурів	Об'єм шлункового соку, мл/100 г маси щура	Загальна кислотність, ммоль/л HCl	Вільна кислотність, ммоль/л HCl	Зв'язана кислотність, ммоль/л HCl
Інтактний контроль (n=10)	0,95±0,2	190,75±17,6	108,81±10,7	81,94±9,8
Метилловий естер N-[(2-оксоіндолініліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти (n=10)	1,08±0,1	195,45±18,4	110,52±21,6**	84,93±11,2**
Вольтарен (n=10)	1,12±0,2	201,50±15,4	140,46±10,5*	61,04±12,7*

Примітки: 1. * – p≤0,05 відносно інтактного контролю.
2. ** – p≤0,05 відносно препарату порівняння вольтарену.

лено, що метиловий естер N-[(2-оксоіндолініліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти не викликає збільшення секреції шлункового соку порівняно з інтактною групою. Жодних змін фракційного складу кислотності шлункового соку під впливом досліджуваної сполуки також не спостерігали.

У щурів, яким вводили вольтарен, вірогідних змін об'єму, загальної та зв'язаної кислотності шлункового соку не відмічали, але спостерігали збільшення вільної кислотності в 1,4 раза.

ВИСНОВКИ. 1. На відміну від вольтарену, метиловий естер N-[(2-оксоіндолініліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти не чинить ульцерогенної дії та не впливає на секреторну функцію шлунка.

2. Метиловий естер N-[(2-оксоіндолініліден-3)-2-оксіацетил]-амінооцтової кислоти – перспективна сполука для подальшого вивчення як потенційний нестероїдний протизапальний засіб.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева А. И. Определения влияния веществ на секрецию соляной кислоты в желудке / А. И. Андреева, С. А. Шарова // Фармакол. и токсикол. – 1978. – № 4. – С. 428–432.

2. Зайцев В. М. Прикладная медицинская статистика / В. М. Зайцев, В. Г. Лифляндский, В. И. Маринкин. – СПб. : ФОЛИАНТ, 2003. – 429 с.

3. Кашуба О. В. Побічні реакції, спричинені нестероїдними препаратами: сучасний стан проблеми в Україні // Укр. мед. часопис. – 2009. – № 5 (73). – С. 80–84.

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

5. Насонов Е. Л. Кардиоваскулярные осложнения ингибиторов ЦОГ-2: вопросов больше, чем ответов / Е. Л. Насонов // Рус. мед. журн. – 2005. – № 7 (13). – С. 383–390.

6. Подплетняя Е. А. Механизмы гастродуодено-

токсичности нестероидных противовоспалительных средств / Е. А. Подплетняя, В. И. Мамчур // Журн. АМН Украины. – 2005. – 11, № 1. – С. 47–62.

7. Шуба Н. М. Гепатотоксичность НПВП: существует ли реальная угроза? / Н. М. Шуба, Т. Д. Воронина // Укр. ревматол. журн. – № 1 (35). – С. 33–38.

8. Щекина Е. Г. НПВС – проблемы безопасности / Е. Г. Щекина, С. М. Дрогвозов, В. В. Страшный // Провизор. – 2003. – № 4. – С. 24–28.

9. Яковлева Л. В. Вивчення гастротропної дії похідних бензофурану, 1,5-дигідропірол-2-онів та 2,3-d-піримідин-6-карбонових кислот, які виявляють властивості нестероїдних протизапальних препаратів / Л. В. Яковлева, Г. Л. Литвиненко // Клін. фармація. – 2010. – № 1. – С. 55–57.

10. Marrasi-Uberti E. The experimental gastric ulcer from histamine in guinea-pigs. Rept. II. Methodology for biologically controlling the anti-ulcer activity of drugs / Marrasi-Uberti E. Turba C. // Med. Exptl. – 1961. – 1. – P. 9–14.

Т. А. Лой, Т. И. Тюпка, Н. Н. Кононенко
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ИЗУЧЕНИЕ ГАСТРОТОКСИЧНОСТИ МЕТИЛОВОГО ЭСТЕРА N-[(2-ОКСОИНДОЛИНИЛИДЕН-3)-2-ОКСИАЦЕТИЛ]-АМИНОУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ

Резюме

В работе приведены результаты экспериментальных исследований гастротоксичности метилового эстера N-[(2-оксоиндолинилиден-3)-2-оксиацетил]-аминоуксусной кислоты, который проявляет выраженные противовоспалительные свойства. Установлено, что указанное соединение, в отличие от препарата сравнения – вольтарена, не влияет на секреторную функцию желудка и не оказывает ульцерогенного действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: противовоспалительные средства, гастротоксичность, ульцерогенное действие, секреторная функция желудка.

**STUDY OF GASTROTOXICITY OF METHYL ESTER
N-[(2-OXOINDOLINILIDEN-3)-2-OXIACETIL] – AMINOACETIC ACID**

Summary

There are presented the results of experimental studies of gastrototoxicity of methyl ester N-[(2-oxoindoliniliden-3)-2-oxiacetyl] amino-acetic acid, which exhibits pronounced antiinflammatory properties. It has been established that this compound, in contrast to the reference drug – voltaren does not affect the secretory function of the stomach and causes no ulcerogenic effect.

KEY WORDS: antiinflammatories, gastrototoxicity, ulcerogenic action, secretory function of stomach.

Отримано 01.03.11

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

**ВПЛИВ АЦЕТАМІНОФЕНУ НА АКТИВНІСТЬ ПРОЦЕСІВ
ЛІПОПЕРОКСИДАЦІЇ І СТАН АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ
СТАТЕВОЗРІЛИХ ЩУРІВ-САМОК НА ТЛІ ТРИВАЛОГО ЗАСТОСУВАННЯ
ПРОГЕСТИНІВ ТА ЕСТРОГЕНІВ**

Досліджено вплив ацетамінофену на активність процесів ліпідної пероксидації і показники антиоксидантної системи на фоні довготривалого введення естрогенів та прогестинів. Установлено, що прогресування патологічного процесу в печінці супроводжується інтенсифікацією процесів вільнорадикального окиснення, спричиняє істотне порушення компенсаторних механізмів, особливо стану ферментної та неферментної ланок антиоксидантної системи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ацетамінофен, пероксидне окиснення ліпідів, антиоксидантна система, гепатотоксичність, естрогени, прогестини.

ВСТУП. Одним із частих ускладнень сучасної фармакотерапії є медикаментозне ураження печінки. Налічується понад 1000 фармакологічних засобів, здатних спричиняти пошкоджувальну дію на печінку, серед них більше 200 є потенційно гепатотоксичними речовинами. Саме до таких препаратів відносять широко застосовуваний анальгетик і антипіретик – парацетамол. Його гепатотоксичність зумовлена утворенням вільних радикалів і реактивних метаболітів електрофільної природи. Основний метаболіт парацетамолу – N-ацетилр-бензохінонімін – здатний ковалентно зв'язуватися з найважливішими макромолекулами гепатоцитів і викликати централобулярну некротизацію гепатоцитів [16]. Не тільки передозування парацетамолу, але і тривале застосування його в терапевтичних дозах, особливо при наявності супутніх захворювань (діабет, гепатити, алкоголізм), незбалансованості харчування, контакті з органічними розчинниками, спричиняють гостре токсичне ураження печінки [10, 13].

Лікарські засоби, що містять парацетамол, використовують для лікування болю і застуди. У нашій країні зареєстровано десятки препаратів з цією активною речовиною. Найвідоміші з них – Калпол, Панадол, Тайленол, Еффералган.

© І. Б. Івануса, І. М. Кліщ, І. З. Кернична, Н. А. Васишин, 2011.

Оральні контрацептиви (ОК) відносять до широко застосовуваних препаратів. Їх поділяють на дві групи – ті, що містять комбінацію естрогену та прогестину, і ті, що містять тільки прогестин [17]. Естрогенний компонент зазвичай представлений етинілестрадіолом, який метаболізується в слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту і печінці з участю ізоферментів системи цитохрому Р-450. До найбільш поширених прогестинів, які входять до складу оральних контрацептивів, належать левоноргестрел, дезогестрел і норетиндрон. Прогестини не зазнають суттєвих метаболічних перетворень при першому проходженні через печінку і не метаболізуються в стінках кишечника [9].

Оральні контрацептиви можуть взаємодіяти з іншими лікарськими засобами. З одного боку, вони самі є індукторами ряду ізоформ мікросомальних монооксигеназ, змінюючи метаболізм ряду лікарських речовин, з іншого – метаболізм ОК може змінюватися під впливом лікарських засобів, які підвищують або знижують рівень естрогену чи прогестину в організмі [14]. Це може слугувати причиною розвитку побічних реакцій – від небажаної вагітності до мігрені або підвищеної втоми. Підсилюють метаболізм ОК ампіцилін, невирапін, фенобарбітал, тетрациклін, рифампіцин та ін., тоді як аторвастатин, парацетамол, грейпфрутовий сік знижують його, сприяють

підвищенню рівня гормональних компонентів ОК у крові [12]. З іншого боку, ОК можуть змінювати плазмові концентрації парацетамолу, тровафлоксацину, саліцилової кислоти і збільшувати рівні іміпраміну, кофеїну, циклоспорину [18].

Зважаючи на наведені вище результати, а також враховуючи те, що парацетамол досить часто застосовують на фоні тривалої терапії ОК, метою наших досліджень було вивчити особливості перебігу токсичного ураження парацетамолом на тлі тривалого введення естрогенів і прогестинів, зокрема активність процесів ліпідної пероксидації і стан антиоксидантної системи.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на білих статевозрілих щурах-самках масою 180–220 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води.

Нами було проведено 2 серії експериментів. У першій токсичне ураження ацетамінофеном викликали шляхом одноразового внутрішньошлункового введення тваринам суспензії ацетамінофену в 2 % розчині крохмалю у дозі 1250 мг/кг маси тіла ($1/2 LD_{50}$), у другій – суспензії ацетамінофену в 2 % розчині крохмалю у дозі 55 мг/кг, що відповідає вищій терапевтичній дозі, протягом 7 діб. Левоноргестрел у 2 % розчині крохмалю щурам обох серій вводили внутрішньошлунково у дозі 1,17 мг/кг маси тіла, а етинілестрадіол – в дозі 0,23 мг/кг маси тіла протягом 40 діб.

У першій серії експерименту піддослідних щурів поділили на 4 групи: 1-ша – інтактні (контроль); 2-га – уражені ацетамінофеном одноразово; 3-тя – тварини, яким вводили левоноргестрел та етинілестрадіол; 4-та – уражені ацетамінофеном після введення левоноргестрелу та етинілестрадіолу. В другій серії експерименту піддослідних щурів поділили на 4 групи: 1-ша – інтактні (контроль); 2-га – уражені ацетамінофеном протягом 7 діб; 3-тя – тварини, яким вводили левоноргестрел та етинілестрадіол; 4-та – уражені ацетамінофеном протягом 7 діб після введення левоноргестрелу та етинілестрадіолу.

Тварин виводили з експерименту з моменту припинення ураження шляхом етаназії за умов тіопенталового наркозу. Всі експерименти на щурах проводили відповідно до Науково-практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [3].

Досліджували цільну кров, сироватку крові й гомогенат печінки. Концентрацію дієнових кон'югатів (ДК) визначали за методом, описа-

ним у роботі [5], концентрацію ТБК-активних продуктів – за методикою [1]. Визначали загальну пероксидазну активність крові (ПАК) за методом Т. Попова (1972) [8], церулоплазміну (ЦП) [4]. Активність каталази (КТ) досліджували за методикою М. А. Королюка і співавт. (1988) [6], активність супероксиддисмутази (СОД) – за методикою [11], активність глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази (ГП та ГР) визначали за кількістю НАДФН₂, що витрачається у ферментативній реакції відновлення окисненого глутатіону [7]. Вміст відновленого глутатіону (ВГ) досліджували згідно з методикою G. L. Ellman [15]. Для визначення активності аланін- і аспартатамінотрансфераз (АлАТ, АсАТ) використовували метод Райтмана і Френкеля [2]. Кількісні показники обробляли статистично. Достовірність різниці між порівнюваними величинами визначали за t-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані нами результати вказують на те, що інтоксикація тварин ацетамінофеном супроводжувалась активацією вільнорадикального окиснення ліпідів у сироватці крові та печінці щурів, про що свідчило достовірне збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у сироватці крові та печінці протягом всього експерименту. Також зростав вміст ДК і ТК протягом всього експерименту відносно контрольної групи тварин (табл. 1).

Активність СОД у крові та печінці за дії ацетамінофену на фоні естрогенів та прогестинів зазнала зниження. Дана активність у сироватці крові в 2-й групі піддослідних тварин знизилась на 41,9 %, а в 3-й – на 79 % відповідно до контрольної групи щурів. Зменшення активності СОД, імовірно, є ознакою пригнічення синтезу ферменту. Важлива роль у знешкодженні супероксидамінорадикалів у плазмі крові належить церулоплазміну, вміст якого протягом всього експерименту знижувався.

У піддослідних щурів спостерігали достовірне підвищення активності каталази в сироватці крові (у 3,6 раза в 2-й групі та 2,5 раза в 3-й групі тварин), а також зниження її в печінці (на 48,2 % у 2-й групі та на 65,2 % в 3-й групі тварин відносно контрольної групи щурів).

Після введення ацетамінофену в 2-й групі піддослідних тварин активність ферменту АсАТ підвищилася у 4,1 раза, тоді як в 3-й групі під впливом естрогенів та прогестинів зросла у 2,3 раза. Активність АлАТ сироватки крові в 2-й групі під дією ацетамінофену зросла у 4,6 раза, а в 3-й експериментальній групі тварин

Таблиця 1 – Показники активності ліпідної пероксидації і стану антиоксидантної системи білих щурів за умов гострого токсичного ураження ацетамінофеном та при поєднанні ацетамінофену з комбінованими контрацептивами ($M \pm m$)

Показник	Контроль (n=6)	Група тварин		
		ацетамінофен одноразово (n=6)	левоноргестрел+ етинілестрадіол 40 діб (n=6)	ацетамінофен після 40-денного введення левоноргестрелу та етинілестрадіолу (n=6)
ТБК-активні продукти сироватки, мкмоль/л	7,55±0,36	9,59±0,67 $p_1 < 0,05$	9,38±0,62 $p_1 < 0,05$	16,08±0,81 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
ТБК-активні продукти печінки, мкмоль/кг	15,92±3,33	24,36±2,51 $p_1 > 0,05$	22,74±3,13 $p_1 > 0,05$	28,03±3,78 $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
ДК сироватки, $\times 10^3$ ум. од./л	1,11±0,03	3,31±0,67 $p_1 < 0,05$	1,86±0,44 $p_1 > 0,05$	4,43±0,51 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$
ДК печінки, $\times 10^3$ ум. од./кг	6,24±0,24	14,12±1,68 $p_1 < 0,01$	7,99±0,87 $p_1 > 0,05$	17,67±1,48 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,02$
ТК сироватки, $\times 10^3$ ум. од./л	0,61±0,01	3,31±0,71 $p_1 < 0,01$	1,24±0,2 $p_1 < 0,05$	4,16±0,8 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,02$
ТК печінки, $\times 10^3$ ум. од./кг	3,75±0,09	6,68±0,59 $p_1 < 0,01$	4,36±0,49 $p_1 > 0,05$	8,27±0,87 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,02$
ЦП, мг/л	251,92±2,68	173,76±3,21 $p_1 < 0,001$	204,97±2,93 $p_1 < 0,001$	103,33±2,01 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
КТ сироватки, мкат/л	0,19±0,01	0,68±0,04 $p_1 < 0,001$	0,48±0,02 $p_1 < 0,001$	0,96±0,05 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$ $p_3 < 0,001$
КТ печінки, мкат/кг	58,79±2,38	28,36±1,14 $p_1 < 0,001$	38,34±2,27 $p_1 < 0,001$	19,76±0,82 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
ПАК, мкмоль/л	282,6±6,32	486,7±9,4 $p_1 < 0,001$	324±6,06 $p_1 < 0,01$	615,0±18,9 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$ $p_3 < 0,001$
СОД сироватки, ум. од./л	1,24±0,02	0,52±0,17 $p_1 < 0,01$	0,98±0,36 $p_1 > 0,05$	0,36±0,04 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 > 0,05$
СОД печінки, ум. од./кг	4,27±0,07	1,75±0,3 $p_1 < 0,001$	3,14±0,43 $p_1 < 0,05$	1,26±0,19 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,01$
АсАТ, ммоль/л-год	0,36±0,09	1,48±0,18 $p_1 < 0,01$	0,81±0,08 $p_1 < 0,02$	1,92±0,38 $p_1 < 0,02$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$
АлАТ, ммоль/л-год	0,58±0,11	2,68±0,55 $p_1 < 0,01$	1,40±0,24 $p_1 < 0,05$	3,18±0,65 $p_1 < 0,02$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,05$
ГП, ммоль/(хв-кг)	0,241±0,01	0,094±0,004 $p_1 < 0,001$	0,168±0,01 $p_1 < 0,02$	0,066±0,007 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,02$ $p_3 < 0,001$
ГР, ммоль/(хв-кг)	77,44±3,4	31,18±2,2 $p_1 < 0,001$	63,66±2,85 $p_1 < 0,05$	26,54±2,18 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$ $p_3 < 0,001$
ВГ, ммоль/кг	4,27±0,04	2,36±0,17 $p_1 < 0,001$	3,14±0,07 $p_1 < 0,001$	1,48±0,28 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$ $p_3 < 0,001$

Примітка. Тут і в наступній таблиці: p_1 – різниця достовірна відносно інтактних тварин; p_2 – різниця достовірна відносно тварин, уражених ацетамінофеном; p_3 – різниця достовірна відносно тварин, яким протягом 40 діб вводили естрогени і прогестини.

підвищилася у 2,4 раза. Під впливом ацетамінофену та комбінованих контрацептивів на організм піддослідних щурів знижувалася активність цитохромоксидази протягом всього експерименту. Значного зростання зазнала пероксидазна активність крові в 2-й і 3-й групах тварин – у 1,7 та 1,2 раза.

Останньою ланкою захисту клітин від переокищення є система глутатіону, яка включає ферменти – глутатіонпероксидазу та глутатіонредуктазу, а також неферментний компонент – відновлений глутатіон. За дії ацетамінофену активність ГП зменшувалась відносно контрольних тварин, також спостерігалось зниження ГР та ВГ протягом всього експерименту. Аналізуючи отримані результати, можна зробити висновок, що за умов інтоксикації ацетамінофеном зміни компонентів антиоксидантного захисту мають компенсаторний характер і спрямовані на знешкодження продуктів вільнорадикального окиснення.

Введення ацетамінофену на фоні тривалого застосування естрогенів та прогестинів призводило до більш глибоких змін досліджуваних показників. Вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові та печінці щурів 4-ї групи зростав у 2,5 раза порівняно з контролем (табл. 1). Значне збільшення ДК і ТК відбулося у 4-й групі піддослідних тварин порівняно з контролем та 2-ю і 3-ю групами. Активність каталази у сироватці крові достовірно зростала протягом всього експерименту порівняно з інтактними тваринами. Це може вказувати на більш значні пошкодження цитоплазматичної мембрани і вихід ферменту з гепатоцитів у кров, про що свідчать показники активності каталази в печінці, яка достовірно знижувалась відносно контролю протягом всього експерименту (табл. 1). Зростання пероксидазної активності крові було недостовірним відносно інтактних тварин, проте достовірним відносно отруєних ацетамінофеном протягом всього експерименту. Активність СОД у сироватці крові та печінці знижувалася протягом всього дослідження. Що стосується церулоплазміну, то його концентрація достовірно зменшувалася протягом всього експерименту порівняно з інтактними щурами. Спостерігалось зростання активності ферментів АсАТ та АлАТ відносно контрольної групи тварин. Достовірне зниження активності цитохромоксидази та сукцинатдегідрогенази відмічали у групі щурів, уражених ацетамінофеном, левоноргестрелом та етинілестрадіолом.

У тварин, яким вводили ацетамінофен у максимальній терапевтичній дозі протягом 7 діб, нами відмічено, що інтоксикація щурів аце-

тамінофеном супроводжувалась активацією вільнорадикального окиснення ліпідів у сироватці крові та печінці, про що свідчило достовірне збільшення вмісту ТБК-активних продуктів у сироватці крові та печінці протягом всього експерименту. Також зростав вміст ДК і ТК протягом всього експерименту відносно контрольної групи тварин (табл. 2).

Активність СОД у крові та печінці за дії ацетамінофену на фоні естрогенів та прогестинів зазнала зниження. Дана активність у сироватці крові в 2-й групі піддослідних тварин знизилась на 62,9 %, а в 3-й – на 79 % відповідно до контрольної групи щурів, що показує пригнічення синтезу ферменту. На знешкодження супероксидамінорадикалів у плазмі крові впливає церулоплазмін, вміст якого протягом всього експерименту зменшувався.

У піддослідних щурів спостерігали достовірне підвищення активності каталази у сироватці крові (у 2,7 раза в 2-й групі та 2,5 раза в 3-й групі тварин), а також зниження її в печінці (на 65,2 % в 2-й та 3-й групах тварин відносно контрольної групи щурів).

Після введення ацетамінофену у вищій терапевтичній дозі протягом 7 діб у 2-й групі піддослідних тварин активність ферменту АсАТ підвищилася у 2,3 раза, тоді як в 3-й групі під впливом естрогенів та прогестинів зросла у 2,3 раза. Активність АлАТ сироватки крові в 2-й групі під дією ацетамінофену зросла у 3,1 раза, а в 3-й експериментальній групі тварин підвищилася у 2,4 раза. Під впливом ацетамінофену та комбінованих контрацептивів на організм піддослідних щурів знижувалася активність цитохромоксидази протягом всього експерименту. Значного зростання зазнала пероксидазна активність крові в 2-й і 3-й групах тварин – у 1,7 та 1,2 раза.

За дії введення ацетамінофену у вищій терапевтичній дозі протягом 7 діб активність ГП, ГР та ВГ зменшувалась відносно контрольних тварин протягом всього експерименту. Можливо, це відбувалось за рахунок більш швидкого виснаження ферменту.

Введення ацетамінофену на фоні тривалого застосування естрогенів та прогестинів призводило до більш глибоких змін досліджуваних показників. Вміст ТБК-активних продуктів зростав у 4-й групі щурів: у сироватці крові – в 1,5 раза, печінці – в 1,8 раза порівняно з контролем (табл. 2). Значне збільшення ДК і ТК відбулося у 4-й групі піддослідних тварин порівняно з контролем і 2-ю та 3-ю групами. Активність каталази у сироватці крові достовірно зростала протягом всього експерименту порівняно з інтактними тваринами.

Таблиця 2 – Активність процесів ліпідної пероксидації і стан антиоксидантної системи у щурів-самок за дії ацетамінофену при його введенні у дозі 55 мг/кг протягом 7 діб після тривалого застосування естрогенів і прогестинів ($M \pm m$)

Показник	Контроль (n=6)	Група тварин		
		ацетамінофен 7 діб	левоноргестрел+етинілестрадіол 40 діб	ацетамінофен після 40-денного введення левоноргестрелу та етинілестрадіолу
ТБК-активні продукти сироватки, мкмоль/л	7,55±0,36	9,16±0,8 p ₁ >0,05	9,38±0,62 p ₁ <0,05	11,47±0,74 p ₁ <0,01 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
ТБК-активні продукти печінки, мкмоль/кг	15,92±3,33	19,09±2,04 p ₁ >0,05	22,74±3,13 p ₁ >0,05	39,00±2,71 p ₁ <0,01 p ₂ <0,001 p ₃ <0,02
ДК сироватки, ×10 ³ ум. од./л	1,11±0,03	2,81±0,55 p ₁ <0,02	1,86±0,44 p ₁ >0,05	3,19±0,64 p ₁ <0,02 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
ДК печінки, ×10 ³ ум. од./кг	6,24±0,24	8,25±0,67 p ₁ <0,05	7,99±0,87 p ₁ >0,05	10,76±0,96 p ₁ <0,01 p ₂ <0,05 p ₃ <0,05
ТК сироватки, ×10 ³ ум. од./л	0,61±0,01	2,55±0,49 p ₁ <0,01	1,24±0,2 p ₁ <0,05	2,73±0,70 p ₁ <0,01 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
ТК печінки, ×10 ³ ум. од./кг	3,75±0,09	4,37±0,85 p ₁ >0,05	4,36±0,49 p ₁ >0,05	5,29±0,63 p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
ЦП, мг/л	251,92±2,68	216,25±1,45 p ₁ <0,001	204,97±2,93 p ₁ <0,001	136,93±1,76 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001
КТ сироватки, мкат/л	0,19±0,01	0,52±0,02 p ₁ <0,001	0,48±0,02 p ₁ <0,001	0,79±0,03 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,001
КТ печінки, мкат/кг	58,79±2,38	38,24±1,58 p ₁ <0,001	38,34±2,27 p ₁ <0,001	26,63±1,07 p ₁ <0,001 p ₂ <0,001 p ₃ <0,01
ПАК, мкмоль/л	282,6±6,32	482,7±4,7 p ₁ <0,001	324±6,06 p ₁ <0,01	512,5±2,19 p ₁ <0,001 p ₂ <0,01 p ₃ <0,001
СОД сироватки, ум. од./л	1,24±0,02	0,78±0,15 p ₁ <0,05	0,98±0,36 p ₁ >0,05	0,64±0,09 p ₁ <0,001 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
СОД печінки, ум. од./кг	4,27±0,07	2,72±0,46 p ₁ <0,02	3,14±0,43 p ₁ <0,05	2,16±0,34 p ₁ <0,001 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
АсАТ, ммоль/л·год	0,36±0,09	0,83±0,15 p ₁ <0,05	0,81±0,08 p ₁ <0,02	1,36±0,21 p ₁ <0,01 p ₂ >0,05 p ₃ <0,05
АлАТ, ммоль/л·год	0,58±0,11	1,80±0,31 p ₁ <0,02	1,40±0,24 p ₁ <0,05	2,16±0,55 p ₁ <0,05 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05
ГП, ммоль/(хв·кг)	0,241±0,01	0,144±0,01 p ₁ <0,01	0,168±0,01 p ₁ <0,02	0,132±0,01 p ₁ <0,01 p ₂ >0,05 p ₃ <0,05
ГР, ммоль/(хв·кг)	77,44±3,4	48,82±2,17 p ₁ <0,01	63,66±2,85 p ₁ <0,05	48,26±0,53 p ₁ <0,001 p ₂ >0,05 p ₃ <0,01
ВГ, ммоль/кг	4,27±0,04	3,18±0,13 p ₁ <0,001	3,14±0,07 p ₁ <0,001	3,11±0,15 p ₁ <0,001 p ₂ >0,05 p ₃ >0,05

Це може вказувати на більш значні пошкодження цитоплазматичної мембрани і вихід ферменту з гепатоцитів у кров, про що свідчать показники активності каталази в печінці, яка достовірно знижувалась відносно контролю протягом всього експерименту (табл. 2). Зростання пероксидазної активності крові було недостовірним відносно інтактних тварин, проте достовірним відносно отруєних ацетамінофеном протягом всього експерименту. Активність СОД у сироватці крові та печінці знижувалась протягом всього дослідження. Що стосується церулоплазміну, то його концентрація достовірно знижувалась протягом всього експерименту порівняно з інтактними шу-

рами. Спостерігалось зростання активності ферментів АсАТ та АлАТ відносно контрольної групи тварин. Достовірно зниження активності цитохромоксидази та сукцинатдегідрогенази відмічали у групі тварин, уражених ацетамінофеном, левоноргестрелом та етинілес-традіолом.

ВИСНОВОК. Отруєння ацетамінофеном на фоні довготривалого введення естрогенів та прогестинів призводить до активації процесів вільнорадикального окиснення, спричиняє істотне порушення компенсаторних механізмів, особливо стану ферментативної та неферментативної ланок антиоксидантної системи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Владимиров Ю. А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков. – М. : Медицина, 1972. – 252 с.
2. Горячковский А. М. Справочное пособие по клинической биохимии / А. М. Горячковский. – Одесса : ОКФа, 1994. – 415 с.
3. Кожем'якін Ю. М. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філошенко. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.
4. Колб В. Г. Справочник по клинической химии / В. Г. Колб, В. С. Камышников. – М. : Минск, 1982. – 311 с.
5. Колесова О. Е. Пероксидное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах / О. Е. Колесова, А. А. Маркин, Т. Н. Федорова // Лаб. дело. – 1984. – № 9. – С. 540–546.
6. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майорова // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–18.
7. Кругликова Г. О. Глутатионпероксидазна та глутатионредуктазна активність печінки щурів після введення селеніту натрію / Г. О. Кругликова, Ц. М. Штутман // Укр. біохім. журн. – 1976. – **48**, № 2. – С. 227–233.
8. Попов Т. Метод определения пероксидазной активности крови / Т. Попов, Л. Нейковска // Гигиена и санитария. – 1971. – № 10. – С. 89–93.
9. Руководство по контрацепции / Русское международное издание, Bridging The Gap Communications. Inc. Decatur, Georgia, U. S. A., 1994.
10. Способ диагностики эндогенной интоксикации / А. А. Тогайбаев, А. В. Кургузкин, И. В. Рикун, Р. М. Карибжанова // Лаб. дело. – 1988. – № 9. – С. 22–24.
11. Чевари С. Роль супероксидредуктазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологическом материале / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.
12. Archer J. S. Oral contraceptive efficacy and antibiotic interaction: a myth debunked / J. S. Archer // J. Am. Acad. Dermatol. – 2002. – **46**. – P. 917-923.
13. Cohen S. D. Acetaminophen induced hepatotoxicity / S. D. Cohen, D. J. Hoivik, E. A. Khairallah / Toxicology of the Liver. – Raven Press, New York, 1998. – P. 159–186.
14. Drug interactions between oral contraceptives and antibiotics / B. D. Dickinson, R. D. Altman, N. H. Nielsen, M. L. Sterling // Obstet Gynecol. – 2001. – **98**. – P. 853–860.
15. Ellman G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman // Arch. Bioch. Biophys. – 1959. – № 82. – P. 70–77.
16. Lieber C. S. Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role / C. S. Lieber // Physiological reviews. – 1997. – **77**, № 2. – P. 518–544.
17. Shenfield G. M. Oral Contraceptives. Are drug interactions of clinical significance? / G. M. Shenfield // Drug. Safety. – 1998. – **9** (1). – P. 21–37.
18. Thomsen M. S. Oxidative metabolism of acetaminophen (paracetamol) to a reactive species: Involved cytochrome P-450 enzymes and target toxicity related to covalent binding / M. S. Thomsen // Ugeskr. Laeger. – 1996. – **158**, № 28. – P. 4095–4096.

ВЛИЯНИЕ АЦЕТАМИНОФЕНА НА АКТИВНОСТЬ ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ И СОСТОЯНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ ПОЛОВОЗРЕЛЫХ КРЫС-САМОК НА ФОНЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПРОГЕСТИНОВ И ЭСТРОГЕНОВ

Резюме

Исследовано влияние ацетаминофена на активность процессов липидной пероксидации и показатели антиоксидантной системы на фоне длительного введения эстрогенов и прогестинов. Установлено, что прогрессирование патологического процесса в печени сопровождается интенсификацией процессов свободнорадикального окисления, влечет существенное нарушение компенсаторных механизмов, особенно состояния ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ацетаминофен, пероксидное окисление липидов, антиоксидантная система, гепатотоксичность, эстрогены, прогестины.

I. B. Ivanusa, I. M. Klishch, I. Z. Kernychna, N. A. Vasylyshyn
TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I. YA. HORBACHEVSKY

EFFECT OF ACETAMINOPHEN ON THE ACTIVITY OF LIPID PEROXIDATION PROCESSES AND THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF RAT-PUBERTAL FEMALES ON THE BACKGROUND OF PROLONGED USE OF PROGESTIN AND ESTROGEN

Summary

The effect of acetaminophen on process of lipid peroxidation activity of parameters and antioxidant system on the background of long-term estrogen and progestin introduction. It was established that the progression of the pathological process in the liver accompanied by the intensification of free radical oxidation, causing a material breach of compensatory mechanisms, especially the state of ferment and nonferment links antioxidant system.

KEY WORDS: acetaminophen, lipid peroxidation, antioxidant system, hepatotoxicity, estrogen, progestin.

Отримано 29.03.11

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

І. П. Банний¹, В. А. Георгіянец¹, Н. І. Банна¹, О. С. Криський¹, В. М. Савченко²
 НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ¹, ХАРКІВ
 ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Н. КАРАЗІНА²

СИНТЕЗ, ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ТА ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ γ -(R-БЕНЗОЛСУЛЬФОНІЛОКСАМІДО)-БУТАНОВИХ КИСЛОТ

З метою пошуку речовин з діуретичною та протисудомною активністю здійснено синтез нової групи хімічних сполук – γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)-бутанових кислот. Структуру синтезованих сполук доведено методами елементного аналізу, УФ-, ІЧ- та ПМР-спектроскопії. Фармакологічні дослідження показали, що більшість сполук проявляє діуретичну та протисудомну активність при низькій токсичності.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)-бутанові кислоти, фармакологічна активність, токсичність.

ВСТУП. У сучасній медичній практиці застосовують велику кількість діуретичних препаратів, однак усі вони тією чи іншою мірою проявляють побічну дію (метаболічний алкалоз, гіпокаліємія, гіперліпідемія та ін.) [6, 8].

Для лікування епілепсії на сучасному етапі широко використовують різноманітні протисудомні лікарські засоби [6]. Але вони проявляють побічну дію, тому мають протипоказання до застосування: порушення функції нирок, печінкова недостатність, вагітність, лактація та ін. [8].

З огляду на такі обставини, пошук нових високоефективних і нешкідливих препаратів є актуальною проблемою сучасної фармацевтичної хімії та фармакології.

Перспективними виявились дослідження ряду похідних оксамінових та оксанілових кислот. У вказаних рядах сполук знайдено речовини з широким спектром фармакологічної дії [3, 7].

Метою даної роботи були синтез нової групи хімічних сполук – γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)-бутанових кислот, а також вивчення діуретичної і протисудомної активності та встановлення зв'язку "структура-фармакологічна активність".

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. УФ-спектри синтезованих сполук зареєстровано на приладі SPECORD 200 (фірма "Analytikjena") в етанолі.

© І. П. Банний, В. А. Георгіянец, Н. І. Банна, О. С. Криський, В. М. Савченко, 2011.

ІЧ-спектри виміряно на спектрофотометрі TENSOR 27 (фірма "Bruker") у таблетках калію броміду (концентрація речовини – 0,5 %). Спектри ПМР записано у DMSO-D₆ на спектрометрі Varian Mercury VX-200, внутрішній стандарт – ТМС.

γ -(2-Метилбензолсульфонілоксамідо)-бутанова кислота (IIIa, табл. 1).

До розчину 1,12 г (0,02 моль) калію гідроксиду в 10 мл метанолу додали 2,06 г (0,02 моль) γ -амінобутанової кислоти. Одержаний розчин додали до розчину 2,57 г (0,01 моль) метилового естеру 2-метилбензолсульфоніл-оксамінової кислоти у 10 мл діоксану та залишили стояти до зникнення лужного середовища. Осад, що випав, відфільтрували, розчинили у 10 мл води. Розчин підкислили до рН 3. Осад, що випав, відфільтрували, висушили і кристалізували з етанолу. Т. пл. 158–160 °С. Вихід – 2,35 г.

Аналогічно одержували сполуки IIIб-і.

Гостру токсичність синтезованих сполук вивчали при внутрішньошлунковому їх введенні білим мишам [4]. Середні смертельні дози (ЛД₅₀) визначали методом Кьорбера [2].

Діуретичну активність вивчали на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 210–240 г [4]. Результати досліджень наведено в таблиці 3.

Протисудомну активність вивчали за методикою Л. В. Крушинського [5].

Під час проведення дослідів тварини перебували у приміщенні віварію при 18–22 °С, вологості 50–60 %, природному світловому ре-

Таблиця 1 – Характеристики γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)-бутанових кислот

Сполука	R	Вихід, %	Т. пл. *, °C	Знайдено, %				Брутто-формула	Вирахувано, %				R _f **
				C	H	N	S		C	H	N	S	
IIIa	2-CH ₃	72	158–160	47,65	4,97	8,61	9,80	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₆ S	47,55	4,91	8,53	9,76	0,46
б	2OCH ₃	68	166–168	45,43	4,74	8,21	9,39	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₇ S	45,34	4,68	8,13	9,31	0,64
в	2-CO ₂ CH ₃	79	197–199	45,24	4,41	7,58	8,68	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₈ S	45,16	4,33	7,52	8,61	0,58
г	3-CO ₂ CH ₃	81	204–206	45,30	4,38	7,61	8,71	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₈ S	45,16	4,33	7,52	8,61	0,63
д	2-CO ₂ C ₂ H ₅	66	196–198	46,72	4,75	7,30	8,38	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₈ S	46,63	4,69	7,25	8,30	0,49
е	3-CO ₂ C ₂ H ₅	72	210–212	46,74	4,76	7,28	8,36	C ₁₅ H ₁₈ N ₂ O ₈ S	46,63	4,69	7,25	8,30	0,54
ж	3-Br	76	232–234	36,76	3,41	7,21	8,22	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ BrO ₆ S	36,65	3,33	7,12	8,15	0,67
з	2-Cl	69	212–214	41,50	3,81	8,12	9,24	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ ClO ₆ S	41,33	3,76	8,03	9,19	0,71
і	3-Cl	74	218–220	41,54	3,80	8,15	9,22	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ ClO ₆ S	41,33	3,76	8,03	9,19	0,69

Примітка. * – кристалізують з етанолу; ** – константи R_f визначено методом ТШХ у системі розчинників хлороформ-етанол-ацетон (1:9:10) на пластинках Silufol UV-254, проявлення параами йоду.

Таблиця 2 – ПМР-спектри γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)-бутанових кислот, δ , м.ч.

Сполука	H аром.	CONHCH ₂	SO ₂ NH	γ -CH ₂	-CH ₂ -	α -CH ₂	Інші протони
IIIa	7,44 (2H, д) 7,84 (2H, д)	8,84 (1H, т)	7,84 (1H, д)	3,12 (2H, к)	1,62 (2H, кв)	2,18 (2H, т)	2,35 (3H, д) CH ₃ 11,94 (1H, уш. с.) COOH
б	7,46 (2H, д) 7,82 (2H, д)	8,88 (1H, т)	7,78 (1H, д)	3,08 (2H, к)	1,58 (2H, кв)	2,16 (2H, т)	2,42 (3H, д) OCH ₃
в	7,42 (2H, д) 7,85 (2H, д)	8,94 (1H, т)	7,82 (1H, д)	3,10 (2H, к)	1,60 (2H, кв)	2,18 (2H, т)	2,36 (3H, д) CH ₃ 11,97 (1H, уш. с.) COOH
г	7,44 (3H, д) 7,88 (1H, д)	8,96 (1H, т)	7,76 (1H, д)	3,12 (2H, к)	1,64 (2H, кв)	2,22 (2H, т)	3,34 (3H, д) CH ₃ 12,00 (1H, уш. с.) COOH
д	7,48 (2H, д) 7,90 (2H, д)	9,02 (1H, т)	7,88 (1H, т)	3,16 (2H, к)	1,66 (2H, кв)	2,20 (2H, т)	1,30 (3H, т) CO ₂ C ₂ H ₅ 4,25 (2H, к) CO ₂ C ₂ H ₅ 12,10 (1H, уш. с.) COOH
е	7,44 (3H, д) 7,88 (1H, д)	9,00 (1H, т)	7,86 (1H, т)	3,14 (2H, к)	1,62 (2H, кв)	2,15 (2H, т)	1,28 (3H, т) CO ₂ C ₂ H ₅ 4,30 (2H, к) CO ₂ C ₂ H ₅ 12,08 (1H, уш. с.) COOH
ж	7,42 (3H, д) 7,86 (1H, д)	9,04 (1H, т)	7,54 (1H, т)	3,20 (2H, к)	1,56 (2H, кв)	2,22 (2H, т)	12,00 (1H, уш. с.) COOH
з	7,44 (2H, д) 7,82 (2H, д)	9,05 (1H, т)	7,84 (1H, д)	3,18 (2H, к)	1,62 (2H, кв)	2,18 (2H, т)	12,08 (1H, уш. с.) COOH
і	7,48 (3H, д) 7,88 (1H, д)	8,98 (1H, т)	7,82 (1H, д)	3,16 (2H, к)	1,58 (2H, кв)	2,16 (2H, т)	12,02 (1H, уш. с.) COOH

Таблиця 3 – Діуретична, протисудомна активність та гостра токсичність γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)-бутанових кислот

Сполука	Активність						ЛД ₅₀ , мг/кг
	діуретична, % у дозі 0,01 ЛД ₅₀		протисудомна, % у дозі 50 мг/кг, через год				
	через 2 год	через 4 год	1	2	3	4	
IIIa	148,8	159,4	25,5	24,6	13,5	7,9	1910
б	128,7	148,8	20,6	23,8	29,8	22,4	2040
в	158,5	174,6	20,8	27,7	15,6	2,8	2315
г	185,6	200,8	25,6	16,4	18,6	10,7	2160
д	125,2	146,4	10,6	16,6	19,2	8,6	2210
е	135,7	167,0	38,5	43,3	44,7	18,4	2080
ж	241,2	253,4	25,7	24,4	14,6	12,6	1890
з	196,1	211,7	23,4	28,8	24,4	11,3	2070
і	160,6	181,2	20,6	17,7	18,5	10,5	1990
Гіпотіазид	158,8	167,5					1175
Фуросемід	321,2	404,6					1000
Адїурекрин	55,1	57,2					
Ламотриджин			33,3	35,1	29,0	18,5	340

жимі, в стандартних клітках при стандартному харчовому раціоні.

Протисудомну активність вивчали на білих безпородних лабораторних щурах масою 160–200 г, попередньо відібраних за рівнем судомної готовності. Відбір тварин проводили у металевій камері розміром 80х40х30 см із кришкою з прозорого оргскла. Як звуковий подразник використовували звучання електродзвоника з тривалістю звучання 120 с. Гучність звуку на рівні підлоги камери дорівнювала 96 дБ. Реакцію тварин оцінювали у балах за такою шкалою:

- 0 балів – відсутність рухового збудження та судомної реакції;
- 1 бал – тремтіння та незначна бігова реакція;
- 2 бали – виражена бігова реакція, яка закінчується падінням тварин на живіт;
- 3 бали – виражене рухове збудження, яке закінчується падінням тварин на бік та клінічними судомними;
- 4 бали – судомний напад з тонічною напругою всієї мускулатури.

З тестових тварин було сформовано групи з високою аудіогенною судомною готовністю (3–4 бали), на яких досліджували сполуки та препарат порівняння – ламотриджин. Речовини вводили перорально за допомогою зонда у вигляді тонкої суспензії в 1 % розчині крохмального клейстеру (5 мл) у дозі 50 мг/кг.

Одержані експериментальні дані наведено у таблиці 3.

Увесь експериментальний матеріал було оброблено методом варіаційної статистики з урахуванням критерію Стьюдента [1].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як реагенти для синтезу γ -(R-бензол-сульфонілоксамідо)-бутанових кислот (IIIa-i) було використано аренсульфаміди (I, схема).

Значення R наведено у таблиці 1.

Конденсацією натрієвих солей аренсульфамідів (I) з діетилоксалатом у середовищі абсолютного метанолу при кімнатній температурі було синтезовано метилові естери аренсульфонілоксамінових кислот (II). У результаті амідування естерів II γ -амінобутановою кислотою за присутності гідроксиду калію утворюються γ -карбоксіпропіламонієві солі γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)-бутанових кислот, при підкисленні яких одержано γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)-бутанові кислоти (IIIa-i).

Сполуки IIIa-i (табл. 1) – безбарвні кристалічні речовини, які легко розчиняються у водних лугах, а при нагріванні – у ДМФА, спирті, діоксані.

Будову сполук IIIa-i підтверджено даними елементного аналізу, УФ-, ІЧ- та ПМР-спектрів, індивідуальність – методом ТШХ (табл. 1, 2).

В УФ-спектрах найбільш інтенсивним є поглинання основного структурного фрагмента молекули, що містить бензольний цикл. УФ-спектри синтезованих сполук мають одну смугу поглинання при значеннях λ 203–216 нм, ϵ 6620–10370 л·см⁻¹·моль⁻¹.

В ІЧ-спектрах сполук IIIa-i виявлено смуги поглинання у ділянці 1710–1698 см⁻¹, які відповідають валентним коливанням карбонільної групи (I амідна смуга). Смуги поглинання у ділянці 1590–1536 см⁻¹ відносять до деформаційних коливань NH-групи (II амідна смуга), а при 3366–3310 та 3292–2998 см⁻¹ –

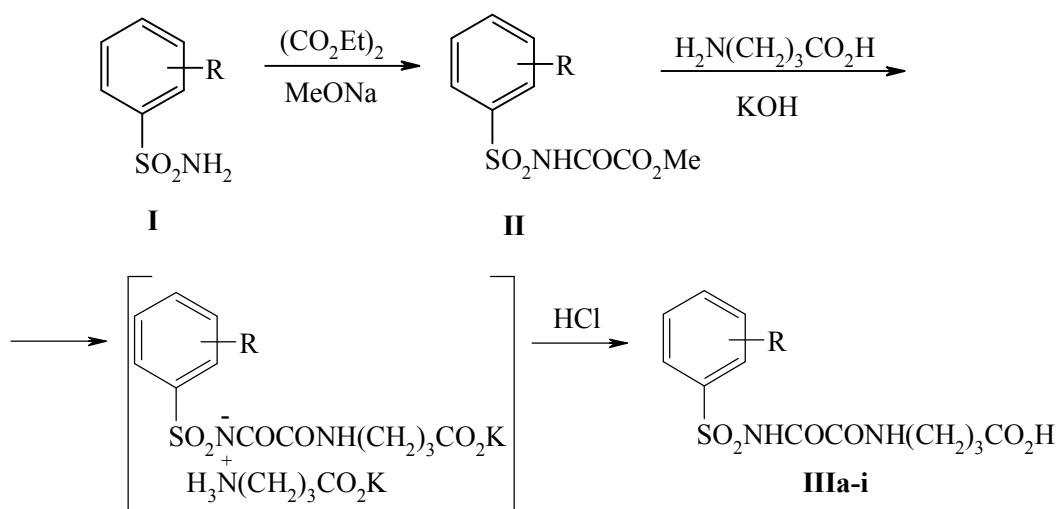


Схема.

до валентних коливань NH-групи. Валентні коливання у ділянці 3172–2984 см⁻¹ відповідають гідроксильній групі. В ІЧ-спектрах сполук також присутній дублет смуги асиметричних (1380–1348 см⁻¹) та симетричних (1172–1152 см⁻¹) коливань SO₂-групи. Валентні коливання зв'язків C–Cl та C–Br спостерігаються при 786–748 та 538 см⁻¹ відповідно.

У ПМР-спектрах γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)-бутанових кислот (IIIa-i, табл. 2) присутня група сигналів при 7,88–7,42 м.ч., яка відповідає протонам ароматичної системи. Квартет сигналів γ -метиленової групи спостерігається при 3,20–3,08 м.ч. Квінтетність сигналів при 1,66–1,58 м.ч. зумовлена коливанням протонів середньої метиленової групи. Триплет сигналів α -метиленової групи спостерігається при 2,22–2,15 м.ч. У слабкому полі з хімічним зсувом 9,05–8,84 та 7,88–7,54 м.ч. перебувають сигнали NH-груп, а в більш слабкому полі – протони карбоксильної групи у вигляді широкого синглету.

У результаті проведених досліджень встановлено, що гостра токсичність групи сполук, які вивчали, перебувала у діапазоні 1890–2315 мг/кг (табл. 3). Найменш токсичною виявилась γ -(2-метоксикарбонілбензолсульфонілоксамідо)-бутанова кислота (IIIв), ЛД₅₀ якої становить 2315 мг/кг, найтоксичнішою – сполука IIIж, яка містить у положенні 3 бензольного кільця атом бром, ЛД₅₀ її складає 1890 мг/кг.

Аналіз результатів вивчення діуретичної активності показав, що всі синтезовані сполуки за умов водного навантаження викликали збільшення видільної функції нирок у середньому на 46,4–153,4 % (табл. 3). Виражену діуретичну активність, яка перевищувала дію гіпотіазиду, проявляли сполуки, що містять у бензольному циклі замісники 3-COOCH₃, 3-Br, 2-Cl (IIIг, IIIж, IIIз). Вказані сполуки у дозах 21,6, 18,9 та 20,7 мг/кг за 2 год збільшували діурез у середньому на 85,6, 141,2 та 96,1 % відповідно, а за 4 год – на 100,8, 153,4 та 111,7 % відповідно.

Аналіз результатів досліджень показав, що майже всі синтезовані сполуки проявляють протисудомну активність (табл. 3). Найактивнішою виявилась γ -(3-етоксикарбонілбензолсульфонілоксамідо)-бутанова кислота (IIIе), яка у дозі 50 мг/кг показала протисудомну активність через 1 год – 38,5, 2 год – 43,3, 3 год – 44,7, 4 год – 18,4 %, що значно перевищує протисудомну активність препарату порівняння – ламотриджину.

ВИСНОВКИ. 1. Синтезовано нову групу хімічних сполук – γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)-бутанові кислоти, структуру яких підтверджено даними елементного аналізу, УФ-, ІЧ-та ПМР-спектрів.

2. У результаті фармакологічного скринінгу виявлено речовини, які за діуретичною та протисудомною активністю перевищують дію препаратів гіпотіазиду та ламотриджину.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М. Л. Беленький. – 2-е изд. – Л. : Медицина, 1963. – С. 99–107.
- Гацура В. В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ / В. В. Гацура. – М. : Медицина, 1977. – 131 с.
- Георгіянц В. А. Синтез та діуретична активність γ -(R-бензолсульфонілоксамідо)-бутанових кислот / В. А. Георгіянц, Н. І. Банна, В. М. Савченко // Вісник фармації. – 2007. – № 3 (51). – С. 7–11.
- Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.
- Крушинский Л. В. Формирование поведения животных в норме и патологии / Л. В. Крушинский. – М. : Изд-во МГУ, 1960. – С. 12–18.
- Машковский М. Д. Лекарственные средства : в 2 т. – 14-е изд. – М. : Новая волна, 2003. – Т. 1. – 540 с., Т. 2. – 608 с.
- Синтез, фармакологічна активність та гостра токсичність γ -(4-N-R-сульфамідобензол-оксамідо)-бутанових кислот / В. А. Георгіянц, Н. І. Банна, В. М. Савченко, І. П. Банний // Журнал органічної і фармацевтичної хімії. – 2009. – **11**, № 1. – С. 34–39.
- Чекман И. С. Осложнения фармакотерапии / И. С. Чекман. – К. : Здоров'я, 1980. – 236 с.

И. П. Банний¹, В. А. Георгиянц¹, Н. И. Банная¹, О. С. Крыськив¹, В. Н. Савченко²
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ¹, ХАРЬКОВ
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В. Н. КАРАЗИНА²

СИНТЕЗ, ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ γ -(R-БЕНЗОЛСУЛЬФОНИЛОКСАМИДО)-БУТАНОВЫХ КИСЛОТ

Резюме

С целью поиска веществ с диуретической и противосудорожной активностью осуществлен синтез новой группы химических соединений – γ -(R-бензолсульфонилоксамидо)-бутановых кислот. Структура синтезированных соединений доказана методами элементного анализа, УФ-, ИК- и ПМР-спектроскопии. Фармакологические исследования показали, что большинство соединений проявляет диуретическую и противосудорожную активность при низкой токсичности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: γ -(R-бензолсульфонилоксамидо)-бутановые кислоты, фармакологическая активность, токсичность.

I. P. Bannyi¹, V. A. Heorhiyants¹, N. I. Banna¹, O. S. Kryskiv¹, V. M. Savchenko²
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY¹, KHARKIV
V. N. KARAZIN KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY²

SYNTHESIS, PHARMACOLOGICAL PROPERTIES AND ACUTE TOXICITY OF THE γ -(R-PHENYLSULFONYLOXAMIDO)-BUTANOIC ACIDS

Summary

With the purpose of search of substances with diuretic and anticonvulsive activity the synthesis of a new group of chemical compounds γ -(R-phenyl-sulfonyloxamido)-butanoic acids was carried out. The structure of synthesized compounds was proved by methods of elemental analysis, UV-, IR-and NMR-spectroscopy. The pharmacologic researches showed that the majority of compounds synthesized displays diuretic and anticonvulsive activity when the toxicity is low.

KEY WORDS: γ -(R-phenylsulfonyloxamido)-butanoic acids, pharmacological activity, toxicity.

Отримано 28.04.11

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

СТАН ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ І АНТИОКСИДАНТНОЇ СИСТЕМИ У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ПОРУШЕННЯМ ПОРФІРИНОВОГО ОБМІНУ

У роботі наведено результати дослідження стану перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантної системи у щурів з експериментальним порушенням порфіринового обміну. Встановлено, що застосування предукталу при експериментальному порушенні порфіринового обміну в щурів призводить до зменшення активації процесів перекисного окиснення ліпідів та сприяє нормалізації стану антиоксидантної системи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: порфірія, бензолна інтоксикація, предуктал, перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантна система.

ВСТУП. За даними літератури, бензолна інтоксикація супроводжується вираженими порушеннями порфіринового обміну та призводить до накопичення проміжних продуктів синтезу гему: δ-амінолевулінової кислоти (АЛК) та порфобіліногену (ПБГ) [9, 15]. Підвищення їх концентрації в плазмі крові та сечі є одним з головних лабораторних критеріїв діагностики даної патології [6, 9]. При цьому значне збільшення попередників синтезу гему зумовлює хронічну інтоксикацію організму. Клінічно картина характеризується ураженням шлунково-кишкового тракту, нервової системи, кровотворних органів, серцево-судинної системи. Велике значення мають зміни з боку тканини крові, при цьому ступінь анемії різко варіює [2, 4, 15]. Порушення процесів транспорту кисню, гіпоксичний стан закономірно призводять до активації процесів перекисного окиснення ліпідів та змін з боку антиоксидантної системи [1, 3, 10, 14, 15]. Застосування з лікувальною та профілактичною метою предукталу – препарату, який стабілізує енергетичний метаболізм у клітинах та підтримує належний рівень аденозинтрифосфату всередині клітин [13], є патогенетично обґрунтованим засобом фармакотерапії порфірії. Його дія пов'язана з утворенням фізіологічного інгібітора АЛК і, зрештою, зменшенням синтезу порфіринів. Однак відомостей про вплив предукталу на стан перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантної системи при ек-

спериментальному порушенні порфіринового обміну ми не зустрічали.

У зв'язку з цим, метою дослідження стало вивчення впливу предукталу на стан перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і антиоксидантної системи (АОС) при експериментальному порушенні порфіринового обміну.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проведено на 30 нелінійних щурах-самцях масою 180–200 г, яких було поділено на 3 групи: 1-ша – інтактний контроль; 2-га – тварини з бензолною інтоксикацією без лікування; 3-тя – тварини з бензолною інтоксикацією, яких лікували предукталом. Щури 2-ї і 3-ї груп протягом 14 днів отримували підшкірні ін'єкції бензолу з розрахунку 0,1 мл на 1 кг маси тварини кожного дня (така доза є достатньою для одержання виражених порушень порфіринового обміну та не викликає загибелі тварин) [16, 17]. Предуктал розводили фізіологічним розчином та вводили підшкірно 1 раз на добу. Контрольна та 2-га групи отримували протягом всього досліду фізіологічний розчин. В інтактних щурів і тварин з бензолною інтоксикацією визначали в плазмі крові рівень δ-амінолевулінової кислоти та порфобіліногену за методом Mauzerall і Granick [12, 16]. Про стан процесів ПОЛ судили за рівнем проміжних продуктів ПОЛ (дієнові кон'югати, малоновий діальдегід – ТБК) і ступенем окиснення ліпідів сироватки крові [3, 12]. Вміст дієнових кон'ю-

© С. І. Крижна, 2011.

гатів у сироватці крові визначали спектрофотометрично з використанням двопробеневого спектрофотометра "Specord UV VIS" (Німеччина, 1999) за різницею оптичної щільності між дослідною і контрольною пробами при довжині хвилі 233 нм; малонового діальдегіду – спектрофлуориметричним методом. Про ендогенну АОС судили за концентрацією в сироватці крові основного ліпідного антиоксиданта α -токоферолу і позаклітинного антиоксидантного ферменту церулоплазміну. Рівень α -токоферолу визначали флуоресцентним методом, концентрацію церулоплазміну – спектрофотометричним методом з використанням як субстрату парафенілендіаміну [3, 11]. Всі тварини перебували на стандартному раціоні. Статистичну обробку даних проводили з використанням параметричних методів статистики за t-критерієм Стьюдента [5, 11]. Щурів утримували в умовах віварію при постійній температурі й вологості повітря. Усі маніпуляції на тваринах проводили під гексеналовим наркозом (60 мг/кг підшкірно) згідно з Міжнародними принципами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) [8].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати проведеного дослідження показали, що у тварин із бензольною інтоксикацією (що викликає порушення порфіринового обміну) 2-ї групи відзначали підвищення у 2,5 раза АЛК, у 1,3 раза ПБГ порівняно з 3-ю групою, що свідчить про вагомий вплив предукталу на розвиток експериментальної порфірії та має лікувальні властивості за рахунок гальмування утворення АЛК та ПБГ.

Результати проведеного дослідження також свідчать про те, що у щурів із порушенням порфіриновим обміном відмічали підвищення вмісту дієнових кон'югатів у крові в 2,3 раза порівняно з інтактними тваринами. Під впливом предукталу у тварин 3-ї групи цей показ-

ник був у 1,4 нижчим, ніж у щурів, які його не отримували (табл.).

При вивченні ТБК-реактанту встановлено, що в щурів 2-ї і 3-ї груп вміст його в сироватці крові був вищим, ніж у інтактних тварин, в 1,8 і 1,4 раза відповідно. Цей факт свідчить про те, що предуктал зменшує активацію процесів ПОЛ у сироватці крові тварин з експериментальною бензольною інтоксикацією, знижуючи вміст проміжних продуктів ПОЛ протягом всього експерименту. Можна зробити припущення про те, що на фоні лікування предукталом тварин із бензольною інтоксикацією знижується виразність гіпоксії в органах і тканинах експериментальних тварин, зменшується утворення активних форм кисню і проміжних продуктів ПОЛ, що проявляється зменшенням їх рівня в сироватці крові. Аналогічні зміни спостерігали щодо збільшення ступеня окиснення ліпідів сироватки крові. Дані статистично достовірні ($p < 0,05$).

Дані проведених досліджень показали, що у тварин із бензольною інтоксикацією без застосування предукталу підвищувалася концентрація α -токоферолу в крові в 1,5 раза, тоді як при його застосуванні – лише в 1,2 раза порівняно з інтактним контролем. Отримані дані можна розглядати як результат включення адаптаційних механізмів організму у відповідь на гіпоксичне пошкодження тканин при експериментальній порфірії. Оскільки α -токоферол пригнічує утворення ліпоперексидів, підвищення його концентрації в сироватці крові експериментальних щурів є відповіддю на активацію процесів ПОЛ. Вочевидь, цей ефект предукталу зумовлений позитивним впливом на порфіриновий обмін і кисневий гомостаз [1, 7].

При вивченні рівня церулоплазміну в сироватці крові тварин 2-ї і 3-ї груп виявлено підвищення його в 1,7 і в 1,2 раза відповідно. Це також свідчить про те, що предуктал сприяє нормалізації стану ендогенної АОС. Дані статистично достовірні ($p < 0,05$).

Таблиця – Вплив предукталу на показники порфіринового обміну (АЛК і ПБГ), вміст дієнових кон'югатів, ТБК та церулоплазміну при експериментальному моделюванні порфірії

Показник	1-ша група (інтактні тварини)	2-га група (тварини з порфірією без лікування)	3-тя група (тварини з порфірією, лікування предукталом)
АЛК, мг на 1 г креатиніну	0,70±0,30**	9,2±2,20*	3,8±0,56*/**
ПБГ, мг на 1 г креатиніну	0,46±0,13**	2,9±1,02*	2,15±0,3*/**
Дієнові кон'югати, ΔD_{233} /мл·мг	0,61±0,21**	1,53±2,1*	1,05±1,1*/**
ТБК, нмоль/мл	1,21±0,3**	2,51±0,33*	1,41±1,2**
Церулоплазмін, мг%	28,05±1,21**	52,04±1,41*	40,32±2,0*/**

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; ** – $p < 0,05$ порівняно з групою без лікування.

ВИСНОВКИ. 1. Застосування предукталу при експериментальному порушенні порфіринового обміну в щурів достовірно призводить до гальмування утворення АЛК та ПБГ.

2. Предуктал зменшує активацію процесів ПОЛ у сироватці крові тварин з експериментальним порушенням порфіринового обміну.

3. Застосування предукталу сприяє нормалізації стану ендогенної АОС за рахунок зменшення рівня церулоплазміну.

4. Використання предукталу при експериментальному порушенні порфіринового обміну є патогенетично обґрунтованим засобом лікування, бо призводить не тільки до зниження проміжних продуктів порфіринового обміну (АЛК та ПБГ), але і корегує процеси перекисного окиснення ліпідів і стан антиоксидантної системи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барабой В. А. Окислительно-антиоксидантный гоместаз в норме и патологии / В. А. Барабой, Д. А. Суткова ; под ред. Ю. А. Зозули. – К. : Чернобиль интер-информ, 1997. – Ч. 2. – 220 с.

2. Гжегоцький М. Р. Система крові. Фізіологічні та клінічні основи / М. Г. Гжегоцький, О. С. Заячківська. – Львів : Світ, 2001. – 173 с.

3. Дослідження пероксидної окисації ліпідів та антиоксидантного захисту організму в клінічній практиці : методичні рекомендації. – Львів, 2002. – 20 с.

4. Еритроцит при захворюваннях внутрішніх органів / М. Ю. Коломоець, М. В. Шаплавський, Г. І. Мардар, Т. Я. Чурсіна. – Чернівці, 1998. – 220 с.

5. Зайцев В. М. Прикладная медицинская статистика / В. М. Зайцев, В. Г. Лифляндский, В. И. Маринкин. – СПб. : ФОЛИАНТ, 2003. – 429 с.

6. Калиман П. А. Метаболизм гема и оксидативный стресс / П. А. Калиман, Т. В. Баранник // Укр. биохим. журн. – 2001. – **73**, № 1. – С. 5–15.

7. Ланкин В. З. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях : пособие для врачей / В. З. Ланкин, А. К. Тихадзе, Ю. Н. Беленков. – 2-е изд., испр. и доп. – М. : РКНПК МЗ РФ, 2001. – С. 78.

8. Макаров В. А. Патология гемостаза / В. А. Макаров // Патол. физиол. и эксперим. терапия. – 1998. – № 4. – С. 40–48.

9. Метаболізм гему та гемопротейнів і деякі показники антиоксидантної системи в еритроцитах і тканинах щурів при фенілгідразинової анемії / П. А. Калиман, К. В. Стрельченко, Т. В. Баранник, І. В. Нікітченко // Фізіол. журн. – 2003. – **49**, № 2. – С. 66–71.

10. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Ко-

жем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.

11. Ройтман Е. В. Изменение реологических свойств крови и осмотической резистентности эритроцитов при активации свободнорадикальных процессов / Е. В. Ройтман, И. И. Дементьева, О. А. Азизова // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2000. – № 1. – С. 15–17.

12. Руководство по клинической лабораторной диагностике : учеб. пособие / [М. А. Базарнова, З. П. Гетте, Л. И. Кальнова и др.] ; под ред. М. А. Базарновой, В. Т. Морозовой. – 2-е изд., перераб. и доп. – К. : Вища школа, 2000. – Ч. 3 : Клиническая биохимия. – 319 с.

13. Сернов Л. Н. Элементы экспериментальной фармакологии / Л. Н. Сернов, В. В. Гацура. – М., 2000. – С. 192.

14. Сыркин А. Л. Антиишемические препараты метаболического действия / А. Л. Сыркин, А. В. Добровольский // Consilium Medicum. – 2002. – **4**, № 11. – С. 572–575.

15. Ткачишин В. С. Професійні захворювання опорно-рухового апарату та прилеглих структур, спричинені впливом ряду шкідливих виробничих факторів. Лекція 6 : Фізические, химические и биологические факторы в процессе производственной деятельности // Укр. ревматол. журн. – 2006. – № 2 (24). – С. 26–29.

16. Lipid peroxidation during acute stress / P. Kovacs, I. Juranek, T. Stancovicova [et al.] // Pharmazia. – 1996. – **51**. – P. 51–53.

17. Zaider E. Clinical laboratory methods for diagnosis of the porphyrias / E. Zaider, D. R. Bickers // Clin. Dermatol. – 1998. – **16** (2). – P. 277–293.

СОСТОЯНИЕ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ И АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ НАРУШЕНИЕМ ПОРФИРИНОВОГО ОБМЕНА

Резюме

В работе приведены результаты исследования состояния перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у крыс с экспериментальным нарушением порфиринового обмена. Установлено, что применение предуктала при экспериментальном нарушении порфиринового обмена приводит к уменьшению активации процессов перекисного окисления липидов и способствует нормализации состояния антиоксидантной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: порфирия, бензольная интоксикация, предуктал, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система.

S. I. Kryzhna
NATIONAL PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, KHARKIV

THE STATE OF THE PEROXIDE OXIDATION OF LIPIDS AND ANTIOXIDANT SYSTEM IN RATS DURING THE EXPERIMENTAL DISTURBANCE OF THE PORPHYRIN EXCHANGE

Summary

In the work there are presented the results of investigating the state of the peroxide oxidation of lipids and antioxidant system in rats during the experimental disturbance of porphyrin exchange. It has been set that the use of preductal during the experimental disturbance of porphyrin exchange leads to the decrease of the activation of the processes of the peroxide oxidation of lipids and it contributes the normalization of the state of antioxidant system.

KEY WORDS: porphyries, benzene intoxication, preductal, peroxide oxidation of lipids, antioxidant system.

Отримано 13.05.11

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

**РОЗРОБКА І БІОФАРМАЦЕВТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ
СУПОЗИТОРІВ З АМЛОДИПНОМ**

Установлено, що вид основи-носія і вид поверхнево-активних речовин впливають на вивільнення амлодипіну із супозиторіїв ректальних. Виявлено, що найбільший вплив на вивільнення амлодипіну із супозиторіїв ректальних справляє вид поверхнево-активних речовин. Дисперсійний аналіз результатів досліджень показав, що оптимальне вивільнення амлодипіну із супозиторіїв ректальних забезпечує композиція твердо-го жиру кондитерського на пальмоядровій основі без вмісту поверхнево-активних речовин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: амлодипін, основа-носії, поверхнево-активні речовини, вивільнення.

ВСТУП. Потреба практичної медицини у фармакотерапевтичних засобах для лікування захворювань серцево-судинної системи, зокрема артеріальної гіпертензії та її цереброваскулярних ускладнень, стабільно зростає у зв'язку з тим, що летальність та інвалідизація від цих патологій посідають перше місце серед причин смертності населення України. За прогнозами, до 2020 р. їх питома вага збільшиться, що значною мірою пов'язано зі старінням населення. Артеріальна гіпертензія (АГ) належить до найпоширеніших захворювань і є найбільш частою хронічною патологією, з якою доводиться мати справу лікарям загальної практики. Згідно з результатами досліджень, поширеність АГ в Україні в 2007 р. становила 29 899 на 100 тис. населення (33 % популяції) [3, 5].

Хоча фармакотерапевтичний арсенал антигіпертензивних засобів досить значний, вітчизняна складова в ньому невелика й представлена в основному таблетковими препаратами-генериками. Пероральний шлях уведення антигіпертензивних препаратів не забезпечує швидке зниження артеріального тиску, часто призводить до значних втрат лікарських речовин за рахунок часткової деструкції в шлунково-кишковому тракті й біотрансформації в печінці [4].

Очевидно, створення аплікаційних лікарських форм, що забезпечують високий рівень фармакологічного ефекту за рахунок альтер-

© Фаді Ал Зедан, В. В. Гладишев, Б. С. Бурлака, І. Л. Кечин, 2011.

нативних видів усмоктування, насамперед ректального, дозволить значно збільшити біологічну доступність антигіпертензивних лікарських речовин і знизити рівень побічних ефектів від їх застосування [7, 10]. Амлодипін – антигіпертензивний засіб із групи блокаторів кальцієвих каналів – добре зарекомендував себе в практичній кардіології [9]. Створення на його основі м'яких лікарських форм (супозиторіїв ректальних) дозволить більш повно розкрити його клінічні можливості й розширити арсенал високоефективних вітчизняних антигіпертензивних засобів для практичної кардіології.

Властивості, стабільність, біологічна доступність і фармакотерапевтична ефективність супозиторіїв залежать від виду основи, природи інших допоміжних речовин, використаної технології [1, 11].

Метою даної роботи було вивчити вплив допоміжних речовин (супозиторних основ-носіїв і поверхнево-активних речовин) на біофармацевтичні характеристики ректальної лікарської форми амлодипіну.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Як носії для ректальної лікарської форми амлодипіну досліджували супозиторні основи і поверхнево-активні речовини (ПАР), що широко застосовуються в промисловому й аптечному виробництві м'яких лікарських форм і описані в літературі [1, 2, 11]. Супозиторії готували методом виливання з використанням форм від напівавтомата Франко-Креспі. Середня маса супозиторіїв на ліпофільних основах складала

1,3 г, а на поліетиленоксидній – 1,6 г. Концентрація ПАР у всіх дослідках – 2 % від маси супозиторіїв, вміст амлодипіну – 0,01 г у кожному супозиторії. Дослідження проводили за планом двофакторного дисперсійного аналізу з повторними спостереженнями [6].

Параметром оптимізації обрали вивільнення амлодипіну із супозиторіїв як перший етап визначення біологічної доступності. Вивільнення амлодипіну із супозиторіїв вивчали методом рівноважного діалізу за [12] при температурі (37±0,5) °С через целофанову напівпроникну мембрану – плівку “Купрофан” за ДСТ 7730-89. Діалізічним середовищем з урахуванням розчинності амлодипіну було обрано спирт етиловий. Концентрацію амлодипіну, що вивільнився через 30 хв, встановлювали спектрофотометрично [8].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Матриця планування експерименту та результати визначення концентрації амлодипіну, що вивільнився із супозиторіїв через 30 хв, наведені в таблиці 1.

Під час виготовлення супозиторіїв на ПЕО-основі амлодипін розчиняли у розплаві

поліетиленоксидів при нагріванні. До інших основ його вводили за типом суспензії, ретельно подрібнюючи лікарську речовину із частиною основи, та з подальшим додаванням отриманої суміші до всієї розплавленої основи.

У таблиці 2 наведено дисперсійний аналіз отриманих результатів.

Як впливає з наведених даних, фактор А (вид основи) і фактор В (вид ПАР) статистично значимо впливають на вивільнення амлодипіну із супозиторіїв ($F_{\text{експ.}} > F_{\text{табл.}}$). При цьому вплив виду ПАР більш значний, ніж виду основи-носія. Також статистично значима взаємодія між цими фармацевтичними факторами. На підставі отриманих даних складено ряд впливу вивчених факторів на інтенсивність вивільнення амлодипіну із супозиторних композицій: $V > A \times V > A$.

Перевірка відмінності середніх результатів значущих факторів за допомогою множинного рангового критерію Дункана [6] дозволила побудувати такі ряди переваг:

За фактором А (вид основи-носія)
 a_1 (твердий жир) $> a_4$ (ПЕО-основа) $> a_3$ (ЗЖО) $> a_2$ (масло какао)

Таблиця 1 – Матриця планування та результати визначення концентрації (%) амлодипіну, що вивільнився із супозиторіїв (інтервал 30 хв)

Фактор А	Фактор В				Сума		
	В ₁ ем. № 1	В ₂ МГД	В ₃ твін-80	В ₄ без ПАР			
a ₁	1) 4,35 4,35 <u>4,46</u> 13,16	2) 5,4 5,4 <u>5,98</u> 16,78	3) 10,87 10,87 <u>11,96</u> 33,7	4) 17,4 17,4 <u>17,4</u> 52,2	115,84		
a ₂	5) 2,17 2,17 <u>2,28</u> 6,62	6) 6,52 6,52 <u>6,41</u> 19,45	7) 1,09 1,09 <u>1,2</u> 3,38	8) 17,4 21,74 <u>19,57</u> 58,71		88,16	
a ₃	9) 6,74 6,52 <u>6,63</u> 19,89	10) 6,52 5,4 <u>5,98</u> 17,9	11) 11,96 10,87 <u>10,87</u> 33,7	12) 11,96 14,13 <u>13,04</u> 39,13			110,62
a ₄	13) 5,4 5,4 <u>5,54</u> 16,34	14) 5,4 5,4 <u>5,98</u> 16,78	15) 10,87 10,87 <u>11,96</u> 33,7	16) 16,31 13,04 <u>15,22</u> 44,57			
Сума	56,01	70,91	104,48	194,61	426,01		

Позначення факторів, які досліджували:

А – супозиторні основи: a₁ – твердий жир; a₂ – масло какао; a₃ – заводська жирова основа (ЗЖО); a₄ – суміш поліетиленоксидів із молекулярною масою 1500 та 400 у співвідношенні 9:1.

В – поверхнево-активні речовини: v₁ – емульгатор № 1; v₂ – моногліцериди дистильовані; v₃ – твін-80; v₄ – без емульгатора.

Таблиця 2 – Дисперсійний аналіз результатів визначення вивільнення амлодипіну із супозиторіїв ректальних

Джерело мінливості	Сума квадратів	Число ступенів свободи	Середній квадрат	F _{експ.}	F _{табл.}
Фактор А	38,7	3	12,9	19,79	2,9
Фактор В	965,28	3	321,76	493,5	2,9
АхВ – взаємодія	298,19	9	33,13	50,81	2,23
Похибка	20,86	32	0,652	–	
Загальна сума	5103,96	47	–	–	

За фактором В (вид ПАР)
 v_4 (без ПАР) $> v_3$ (твін-80) $> v_2$ (МГД) $> v_1$
 (емульгатор № 1)

Таким чином, найбільш швидке вивільнення амлодипіну із супозиторіїв ректальних забезпечує носій на основі твердого жиру кондитерського на пальмоядровій основі без вмісту поверхнево-активних речовин.

ВИСНОВКИ. 1. Установлено, що вид основи-носія і вид поверхнево-активних речовин

впливають на вивільнення амлодипіну із супозиторіїв ректальних.

2. Виявлено, що найбільший вплив на вивільнення амлодипіну із супозиторіїв ректальних справляє вид поверхнево-активних речовин.

3. Дисперсійний аналіз результатів досліджень показав, що оптимальне вивільнення амлодипіну із супозиторіїв ректальних забезпечує композиція твердого жиру кондитерського на пальмоядровій основі без вмісту поверхнево-активних речовин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гладышев В. В. Теоретическое и экспериментальное обоснование создания мягких лекарственных форм антимикотического действия : автореф. дисс. на соискание учёной степени д-ра фармацевт. наук : спец. 15.00.01 "Технология лекарств и организация фармацевтического дела" / В. В. Гладышев. – Пятигорск, 1997. – 34 с.

2. Головкин В. А. Лекарственные средства для ректального применения в педиатрии / В. А. Головкин, В. В. Головкин, Ю. П. Ткаченко. – Запорожье : Просвіта, 2006. – 140 с.

3. Горбась І. М. Епідеміологічні аспекти поширеності артеріальної гіпертензії та дисліпідемій серед населення України / І. М. Горбась // Здоров'я України. – 2008. – № 6. – С. 30–31.

4. Кечин І. Л. Фармакологічна корекція неуспешних гіпертензивних кризів антигіпертензивними препаратами для аплікаційного застосування : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня д-ра мед. наук : спец. 14.01.28 "Клінічна фармакологія" / І. Л. Кечин. – К., 2009. – 41 с.

5. Ленфант К. Гипертензия и её последствия: Состояние проблемы в мире / К. Ленфант // Здоров'я України. – 2006. – № 5. – С. 32.

6. Методические указания по обработке результатов эксперимента по технологии лекарств / А. И. Тенцова, Т. А. Грошовый, В. А. Головкин,

С. М. Махамов. – Ташкент : НИИ "Узгипрозем", 1980. – 71 с.

7. Нагорний В. В. Біофармацевтичне обґрунтування раціонального складу і технології супозиторіїв з натрію нітропрюсидом / В. В. Нагорний // Фармац. журн. – 1998. – № 1. – С. 106–109.

8. Спектрофотометричне визначення амлодипіну бесилату в субстанції / Ю. В. Бурлака, О. О. Тарханова, С. О. Васюк [та ін.] // Запорож. мед. журн. – 2011. – **13**, № 2. – С. 50–52.

9. Тимошик Ю. В. Маркетингові дослідження ринку серцево-судинних засобів на прикладі блокаторів кальцієвих каналів / Ю. В. Тимошик, В. В. Петренко // Фармац. журн. – 2010. – № 1. – С. 15–19.

10. Харенко Е. А. Мукоадгезивные лекарственные формы (обзор) / Е. А. Харенко, Н. И. Ларионова, Н. Б. Демина // Хим.-фармац. журн. – 2009. – **43**, № 4. – С. 21–29.

11. Цагарейшвили Г. В. Биофармацевтические, фармакокинетические и технологические аспекты создания мягких лекарственных форм (ректальные препараты) / Г. В. Цагарейшвили, В. А. Головкин, Т. А. Грошовый. – Тбилиси : Мецниереба, 1987. – 263 с.

12. Krowczynski L. Metody analityczne stosowane w badaniach biofarmaceutycznych / L. Krowczynski, H. E. Krasowaka // Biul. Inform. Inst. przem. pharm. – 1975. – **23**, № 3. – С. 284–293.

РАЗРАБОТКА И БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СУППОЗИТОРИЕВ С АМЛОДИПИНОМ

Резюме

Установлено, что вид основы-носителя и вид поверхностно-активных веществ оказывают значимое влияние на высвобождение амлодипина из суппозитория ректальных. Выявлено, что наибольшее влияние на высвобождение амлодипина из суппозитория ректальных имеет вид поверхностно-активных веществ. Дисперсионный анализ результатов исследований показал, что оптимальное высвобождение амлодипина из суппозитория ректальных обеспечивает композиция твердого жира кондитерского на пальмовидной основе без содержания поверхностно-активных веществ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амлодипин, основа-носитель, поверхностно-активные вещества, высвобождаемость.

Fadi Al Zedan, V. V. Hladyshev, B. S. Burlaka, I. L. Kechyn
ZAPORIZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

DEVELOPMENT AND BIOPHARMACEUTICAL RESEARCH OF SUPPOSITORIES WITH AMLODIPINE

Summary

It was determined that the type of foundation of the carrier and the type of surface-active substances have a significant effect on the release of amlodipine from rectal suppositories. It was revealed that the greatest influence on the release of amlodipine from rectal suppositories has the form of surface-active substances. Dispersion analysis of results showed that the optimal release of amlodipine from rectal composition provides solid fat pastry for palm-based content without the surfactant.

KEY WORDS: amlodipine, basis of a carrier, surfactant, release of drugs.

Отримано 23.05.11

Адреса для листування: В. В. Гладышев, Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69095, Україна.

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН НИРОК ЗА УМОВ ГІПЕРГІДРАТАЦІЇ ОРГАНІЗМУ У ВАГІТНИХ ЩУРІВ-САМОК

У роботі наведено дані експериментів з вивчення функціонального стану нирок за умов гіпергідратації організму у вагітних щурів-самок. Доведено, що гідроуретична реакція нирок збільшується на тлі вагітності. Вагітність у щурів-самок підвищує екскрецію іонів калію, суттєво не впливає на натрійурез. Найбільш виражені та вірогідні зміни функціонального стану нирок за умов гіпергідратації проявляються під час вагітності.

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

ВСТУП. Дослідження функціонального стану нирок, за даними літератури, звичайно проводять як за умов індукованого діурезу (гідратації організму), так і за умов спонтанного діурезу [1, 5, 6, 7]. Робіт з вивчення функціонального стану нирок на тлі вагітності в щурів-самок ми не зустріли.

Метою даної роботи стало вивчення функціонального стану нирок за умов гіпергідратації організму у вагітних щурів-самок.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проведено на двох групах (вагітні та невагітні) нелінійних щурів-самок масою 200,0–250,0 г по 10 тварин у кожній. У шлунок щурів-самок через зонд вводили питну воду кімнатної температури в об'ємі 5 % від маси тіла [1, 2, 3]. Після об'ємної стимуляції тварин поміщали на 2 год в індивідуальні клітки для збирання сечі, в якій визначали концентрацію креатиніну та основних електролітів. Для визначення аналогічних показників у плазмі крові проводили евтаназію щурів під ефірною анестезією, кров забирали гепаринізованим шприцом і центрифугували при 3000 об./хв тривалістю 10 хв.

Концентрацію креатиніну (ммоль/л) у плазмі крові визначали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 590 нм за методом Фоліна у модифікації Є. Б. Берхіна [1]. Концентрацію креатиніну в сечі досліджували за методом Фоліна, концентрацію білка в сечі – за методом А. П. Міхеєвої, І. А. Богодарової [3]. Вміст іонів натрію, калію в плазмі крові та сечі

визначали методом полум'яної фотометрії на ФПЛ-1 [3]. Концентрацію електролітів у біологічних рідинах вивчали шляхом порівняння показників полум'яного фотометра при введенні в розпилювач досліджуваних і стандартних розчинів. За стандартною кривою, яка містила концентрації іонів натрію або калію від 0,1 до 0,5 мекв/л, визначали вміст досліджуваних іонів і, враховуючи розведення розчинів, проводили відповідні перерахунки.

Протягом експерименту з тваринами обходилися відповідно до Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986).

Дані обробляли методами параметричної статистики з використанням t-критерію Стьюдента [4].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати досліджень деяких показників екскреторної та іонорегулюючої функції нирок щурів-самок наведено в таблиці.

Дані свідчать про те, що гіпергідратація організму вагітних щурів-самок проявляє неоднаковий вплив на основні показники функцій нирок. Так, тенденція до посилення гідроуретичної реакції нирок зростала у тварин до 19–20 дня вагітності.

Вірогідне посилення діурезу в 1,2 раза спостерігалось у вагітних щурів-самок порівняно з показниками контрольної групи невагітних тварин.

© Е. Л. Торянік, 2011.

Таблиця – Патолофізіологічний профіль водно-електролітного обміну у вагітних щурів-самок ($\bar{X} \pm S\bar{x}$)

Групи	Показник						
	діурез мл/2 год	концентрація креатинину сечі, ммоль/л	екскреція креатиніну, мкмоль/ 2 год/100 г	концентрація K ⁺ в сечі, ммоль/л	екскреція K ⁺ , мкмоль/ 2 год/100 г	концентрація Na ⁺ в сечі, ммоль/л	екскреція Na ⁺ , мкмоль/ 2 год/100 г
Контрольна група невагітних щурів-самок	3,50±0,18	0,40±0,04	1,40±0,19	4,80±0,42	16,74±1,96	0,77±0,10	2,70±0,42
Вагітні щури-самки	4,01±0,22*	0,75±0,04*	3,00±0,21*	5,37±0,52	21,35±2,27*	0,65±0,04	2,60±0,22

Примітка. n=10 в усіх групах; * – p<0,05 вірогідно з контролем.

Екскреція ендogenous креатиніну як показника швидкості клубочкової фільтрації у вагітних щурів-самок мала тенденцію до зростання (p<0,05) і була у 2,1 раза більшою, ніж у невагітних тварин.

Екскреція креатиніну у вагітних щурів-самок була також вищою від показників контрольної групи тварин (у 2,5 раза), і ця тенденція до збільшення зберігалася (в 1,9 раза порівняно з контролем) до кінця вагітності, але виразність була меншою, ніж на початку вагітності. Концентрація креатиніну в сечі також зростала зі збільшенням терміну вагітності.

Концентрація та екскреція іонів натрію вірогідно не відрізнялись від даних невагітних тварин (контроль) незалежно від терміну вагітності щурів-самок, хоча більш значна тенденція до зростання цих показників також мала місце у вагітних тварин. Дещо інший ха-

рактер змін ми спостерігали при вивченні екскреції іонів калію, оскільки мало місце зниження концентрації та екскреції іонів калію у вагітних щурів-самок. Навпаки, на 19–20 день вагітності виникало зростання вказаних показників.

Максимальне і вірогідне збільшення калійуризу спостерігали до 20-го дня вагітності (в 1,6–1,8 раза порівняно з контрольною групою щурів-самок).

ВИСНОВКИ. 1. Гідроуретична реакція нирок збільшується на тлі вагітності.

2. Вагітність у щурів-самок підвищує екскрецію іонів калію, суттєво не впливає на натрійурез.

3. Вагітність щурів-самок викликає найбільш виразні та вірогідні зміни функціонального стану нирок за умов гіпергідратації.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Берхин Е. Б. Методы экспериментального исследования почек и водно-солевого обмена / Е. Б. Берхин, Ю. И. Иванов. – М. : Медицина, 1972. – 198 с.
2. Куковська І. Л. Вплив даларгіну на екскреторну функцію нирок у щурів / І. Л. Куковська, Р. Б. Косуба // Ліки. – 2000. – № 6. – С. 24–27.
3. Магальяс В. М. Сучасні методики експериментальних та клінічних досліджень центральної науково-дослідної лабораторії Буковинської державної медичної академії : навч.-метод. посіб. / В. М. Магальяс, А. О. Міхеев, Ю. Е. Роговий. – Чернівці : БДМА, 2001. – 42 с.
4. Сернов Л. Н. Элементы экспериментальной

фармакологии / Л. Н. Сернов, В. В. Гацура. – М. : Медицина, 2000. – С. 117–320.

5. Arthur J. M. Interaction of cyclosporine and FK506 with diuretics in transplant patients / J. M. Arthur, S. Shamim // *Kidney Int.* – 2000. – **58**. – P. 325–330.

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

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

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПОЧЕК В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГИДРАТАЦИИ ОРГАНИЗМА У БЕРЕМЕННЫХ КРЫС-САМОК

Резюме

В работе представлены данные экспериментов по изучению функционального состояния почек в условиях гипергидратации организма у беременных крыс-самок. Показано, что гидроуретическая реакция почек увеличивается на фоне беременности. Беременность у крыс-самок повышает экскрецию ионов калия, существенно не влияет на натрийурез. Наиболее выраженные и вероятные изменения функционального состояния почек в условиях гипергидратации проявляются во время беременности.

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

E. L. Toryanik
NATIONAL PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, KHARKIV

FUNCTIONAL STATE OF THE KIDNEYS DURING HYPERHYDRATION OF PREGNANT FEMALE RATS ORGANISMS

Summary

In the work there is presented the experimental data on the study of renal function in the body hyperhydration in pregnant female rats. It is proved that the reaction of the kidneys increases hydrouretic against pregnancy. Pregnancy in female rats increases the excretion of potassium ions and does not affect the sodiumuresis. Pregnance of female rats cause the most pronounced and likely changes in renal function in hyperhydration.

KEY WORDS: renal function, hyperhydration, potassiumuresis, sodiumuresis, pregnancy.

Отримано 06.04.11

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

**ФАРМАКОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ПОХІДНИХ ТРИАЗОЛОПРИМІДИНУ
ТА КІЛЬКІСНІ СПІВВІДНОШЕННЯ “СТРУКТУРА-ПРОТИСУДОМНА
АКТИВНІСТЬ”**

Проведено фармакологічні дослідження протисудомної активності похідних [1,2,4]триазоло[1,5-а]піримідину на моделі аудіогенних судом у тварин. Розраховано фізико-хімічні параметри молекул синтезованих речовин. Обчислено коефіцієнти кореляційної залежності протисудомної активності від електронно-просторових параметрів молекул та їх фізико-хімічних властивостей. Встановлено, що сполуки в даній групі на моделі аудіогенних судом не мають суттєвих рівнів кореляції з показником середньої тяжкості судом та сумарною антиконвульсантною активністю, що може бути аргументом на користь оригінального механізму їх дії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: синтез, 1,2,4-триазол, піримідин, кількісні співвідношення “структура-протисудомна активність”.

ВСТУП. Цілеспрямований синтез біологічно активних речовин важко проводити в нових класах хімічних сполук внаслідок відсутності необхідних початкових даних про зв'язок між фармакологічною активністю і будовою речовини. Завдання встановлення такого взаємозв'язку виникло досить давно, проте способи його вирішення продовжують безперервно удосконалюватися. В останні роки на перший план висувається проблема конструювання нових лікарських речовин, виходячи з раніше знайдених кількісних співвідношень “структура-активність”. Розроблено ряд методів встановлення таких співвідношень. У будь-якому з них виділяються два ключових етапи: представлення структури молекули речовини набором дескрипторів і побудова математичної моделі як функції дескрипторів, що апроксимує зміни активності. Детальність опису хімічної будови може бути різною: використовуються індикаторні змінні (метод Фрі-Вілсона) і фізико-хімічні константи замісників (наприклад в методі Хенча), різноманітні топологічні індекси. Як правило, математична модель будується у вигляді регресійного рівняння і є дуже корисним емпіричним співвідношенням. Основна складність цього підходу, який став класичним, полягає у виборі регресорів, що дають “якнайкращу” модель, з величезної кількості відомих дескрипторів. Концеп-

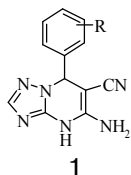
© Л. О. Перехода, Г. І. Северіна, В. А. Георгіянец, В. В. Гриненко, 2011.

цію “схожість з лідерами” (“drug-likeness”) або так звані правила Ліпінського [10] успішно використовують на етапі пошуку нових препаратів. Суть вказаних правил полягає в оцінюванні потенційної здатності сполуки проникати в клітину та взаємодіяти з ферментами та іншими біологічними об'єктами. Наслідком даних правил є те, що сполуки-лідери повинні мати, порівняно з кінцевими ліками, меншу молекулярну масу, ліпофільність та загальну молекулярну складність. Це пов'язано з тим, що на шляху до лікарського препарату сполука-лідер проходить стадію медично-хімічної оптимізації, при якій, як показали статистичні дослідження, величини всіх вказаних молекулярних параметрів збільшуються. Якщо сполука-лідер вже має граничні значення даних параметрів, то подальша її оптимізація може виявитися проблематичною. Згідно з цією концепцією, біологічна активність речовини (при пероральному прийманні) менш вірогідна, якщо одночасно:

- молекулярна маса більша 500;
- $\log P$ більший 5;
- кількість донорів водневого зв'язку більша 5;
- кількість акцепторів водневого зв'язку більша 10.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для кількісного опису характеристик синтезованих молекулярних систем протисудомної дії та їх зв'язку з

фізико-хімічними показниками обрано ряд дескрипторів, значення яких обчислено за допомогою програми ACD/Labs. Результати розрахунків фізико-хімічних параметрів для статистичної вибірки з 14 синтезованих сполук загальної формули 1 наведено у таблиці 1 [8].



де R=H (1), 4-MeO (2), 4-HO (3), 4-Cl (4), 2-Cl (5), 3-Cl (6), 3,4-diCl (7), 4-Me (8), 2,5-diMe (9), 4-Br (10), 4-F (11), 3,4-diF (12), 4-(Me)₂N (13), 4-NO₂ (14)

Порівняння отриманих значень з необхідними значеннями дескрипторів відповідно до концепції "схожість з лідерами" ("drug-likeness") свідчить про те, що всі одержані сполуки відповідають вимогам цієї концепції (табл. 1).

Таким чином, похідні [1,2,4]триазоло[1,5-а]піримідину (1-14) за сукупністю своїх фізико-хімічних властивостей відповідають сучасним вимогам, які ставлять до нових сполук на стадії тестування їх біологічної активності. Вони можуть бути рекомендовані для подальших випробувань як біологічно активні сполуки, що мають сприятливі фізико-хімічні властивості.

Літературні дані стосовно фармакологічних досліджень похідних 1,2,4-триазолу та піримі-

дину підтверджують доцільність пошуку серед них засобів, які діють переважно на ЦНС [11, 12]. Враховуючи це, ми провели первинний фармакологічний скринінг на виявлення протисудомної активності. Протисудомну активність вивчали на безпородних білих щурах масою 180–220 г (по 6 тварин в кожній групі) на моделі аудіогенних судом [5, 6]. Піддослідних тварин попередньо було відібрано за рівнем судомної готовності. Відбір щурів здійснювали у металевій камері розміром 80×40×30 см із кришкою з прозорого скла. Як звуковий подразник використовували електричний дзвінок з тривалістю звучання 120 с. Гучність на рівні підлоги камери становила 96 дБ. Реакцію тварин оцінювали в балах за такою шкалою:

0 балів – відсутність рухливого збудження та судомної реакції;

1 бал – здригання та незначна бігова реакція;

2 бали – висловлена бігова реакція з наступним падінням на бік та клонічними судомами;

3 бали – клоніко-тонічна екстензія;

4 бали – судомний напад з тонічним напруженням усієї мускулатури.

З тестованих тварин було сформовано групи таким чином: контрольна група – щури з високим порогом аудіогенних судом (0 балів, контроль), 2-га група – щури з яскраво вираженою епілептиформною реакцією і, відпові-

Таблиця 1 – Фізико-хімічні властивості похідних [1,2,4]триазоло[1,5-а]піримідину

Сполука	Дескриптор				
	молекулярна маса, MW	молярна рефракція, MR cm ³	коефіцієнт розподілу, Log P	кількість донорів водневого зв'язку	кількість акцепторів водневого зв'язку
1	238,24	67,14	1,35	1	6
2	252,28	71,57	1,27	1	7
3	268,27	72,96	1,72	2	7
4	254,25	67,99	1,94	1	6
5	272,69	71,74	1,94	1	6
6	272,69	71,74	1,94	1	6
7	272,69	71,74	2,41	1	6
8	307,14	76,34	1,81	1	6
9	266,3	75,99	2,27	1	6
10	317,14	74,7	2,12	1	6
11	256,24	67,01	1,40	1	6
12	274,22	66,88	1,36	1	6
13	281,32	79,95	1,46	1	6
14	283,25	72,8	1,08	1	7
Інтервал значень	252,28–317,14	66,88–79,95	1,08–2,41	1–2	6–7
Середнє значення	272,63	72,04	1,72	1	6,21
Максимально допустиме значення	460	130	5,6	5	10
Оптимальне значення	357	97	2,52	–	–

дно, високою аудіогенною судомною готовністю (3–4 бали).

Досліджувані речовини вводили внутрішньошлунково через зонд у вигляді тонкої водної суспензії, солюбілізованої твіном-80 за 30 хв у розрахунку 50,0 мг на 1 кг маси тіла. Тваринам контрольної групи вводили по 0,3 мл ізотонічного розчину натрію хлориду. Рівень протисудомної активності оцінювали за наведеними вище балами за 1, 2, 3 та 4 год. Як препарат порівняння використовували ламотриджин, який вводили аналогічно. Критерієм оцінки протисудомного ефекту була середня тяжкість судомної реакції (А). Для приведення активності, вивченої в умовах експерименту, до показника, який можна порівняти в умовах різних експериментів, нами була розрахована сумарна антиконвульсанта активність (А1) у балах відносно контролю (0 балів) та препарату порівняння (10 балів). Результати фармакологічного скринінгу наведено у таблиці 2.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як показали результати експериментального фармакологічного дослідження, похідні [1,2,4]триазоло[1,5-а]піримідину здатні тією чи іншою мірою знижувати судомну готовність тварин при звуковому подразнику. За цим показником сполуки 2 та 6 (що мають у своїй будові метоксигрупу в четвертому положенні та хлор у третьому положенні відповідно) значно перевищують за активністю препарат порівняння – ламотриджин.

Для продовження досліджень у цьому напрямку ми вважали за доцільне спробувати встановити залежність між різноманітними параметрами структури молекул синтезованих речовин та величиною протисудомної активності. За допомогою сучасної комп'ютерної програми ACD/Labs розраховано низку молекулярних дискрипторів, які є факторами, що визначають реакційну здатність молекул. Результати розрахунків наведено у таблиці 3.

Залежність протисудомної активності від параметрів молекулярної будови було розраховано за допомогою програми STATISTIKA [1].

Тяжкість судом та сумарну антиконвульсанта активність зіставляли із середніми показниками електронно-просторових параметрів молекул та фізико-хімічних властивостей кожної сполуки. При статистичній обробці результатів медико-біологічних досліджень при аналізі вибірки довжиною у 14 випадків статистично достовірними вважають показники коефіцієнта кореляції, більші 0,426 ($p \leq 0,05$) [4]. Аналіз даних статистичної обробки результатів свідчить про те, що сполуки в даній групі на моделі аудіогенних судом не мають суттєвих рівнів кореляції з показником середньої тяжкості судом та сумарною антиконвульсанта активністю. У попередніх дослідженнях [2, 3] нами вже була виявлена кореляція між фізико-хімічними параметрами та показниками протисудомної активності в деяких групах похідних триазолу на моделі коразолових судом. Низький рівень кореляції в групі похідних триазолопіримідину може бути аргументом на ко-

Таблиця 2 – Протисудомна активність синтезованих похідних у балах

Сполука	Вихідні дані у балах	Тяжкість судомної реакції через кількість годин				Середня тяжкість судомної реакції (А)	Середня протисудомна активність (А1)
		1	2	3	4		
		у балах	у балах	у балах	у балах		
Контроль	3,7±0,35	3,7±0,35	2,7±0,28	3,7±0,38	3,7±0,41		
Ламотриджин	3,7±0,36	2,7±0,28	2,6±0,34	2,5±0,37	3,3±0,38	2,95	10
1	3,6±0,34	2,9±0,28	2,7±0,27	2,9±0,27	3,3±0,31	2,9	9,83
2	3,7±0,31	2,7±0,29	2,0±0,22	2,0±0,21	2,3±0,27	2,5	8,47
3	3,8±0,31	2,7±0,32	2,7±0,31	2,6±0,33	3,4±0,27	2,85	9,66
4	3,8±0,32	2,8±0,27	2,9±0,31	3,0±0,27	3,4±0,32	3,02	10,25
5	3,8±0,38	2,8±0,28	2,98±0,34	3,12±0,37	3,4±0,38	3,05	10,33
6	3,7±0,38	2,7±0,27	2,6±0,25	2,3±0,26	2,9±0,29	2,6	8,81
7	3,9±0,34	2,9±0,27	2,8±0,30	3,1±0,33	3,3±0,33	3,02	10,25
8	3,8±0,32	2,7±0,32	2,7±0,31	2,6±0,33	3,4±0,31	2,85	9,66
9	3,8±0,31	2,7±0,33	2,7±0,35	2,7±0,36	3,4±0,27	3,05	10,33
10	3,8±0,31	2,7±0,27	2,7±0,31	2,6±0,34	3,4±0,27	2,85	9,66
11	3,9±0,34	3,0±0,27	2,8±0,30	3,1±0,33	3,3±0,33	3,05	10,33
12	3,8±0,38	2,8±0,27	2,98±0,35	3,1±0,35	3,4±0,38	3,07	10,4
13	3,6±0,34	2,9±0,28	2,8±0,27	2,8±0,27	3,3±0,31	3	10,17
14	3,8±0,31	2,7±0,32	2,7±0,32	2,6±0,35	3,4±0,28	2,95	10

Таблиця 3 – Фізико-хімічні параметри похідних [1,2,4]триазоло[1,5-а]піримідину

Сполука	Молярний об'єм, см ³	Парахор, см ³	Індекс рефракції	Поверхневий натяг, дин/см	Густина, г/см ³	Здатність до поляризації, см ³
1	158,7	461	1,788	71	1,5	26,61
2	174	492,1	1,759	63,9	1,44	28,37
3	180,4	511,2	1,752	64,3	1,48	28,92
4	156	466,6	1,821	79,9	1,62	26,95
5	168	489,8	1,796	72,1	1,62	28,44
6	168	489,8	1,798	72,1	1,62	28,44
7	168	489,8	1,798	72,1	1,62	28,44
8	177,4	518,7	1,807	73	1,73	30,26
9	189,2	523,2	1,735	58,4	1,4	30,12
10	171,3	504,5	1,821	75,1	1,85	29,61
11	161,6	461,1	1,767	66,2	1,58	26,56
12	164,5	461,3	1,747	61,7	1,66	26,51
13	200	557,3	1,731	60,2	1,4	31,61
14	164,1	506,4	1,841	90,6	1,72	28,86

ристь оригінального механізму їх дії. Разом із тим, на нашу думку, для майбутніх досліджень варто враховувати, що аудіогенні судоми провокуються зовнішнім стимулюванням, тобто рефлекторно. У людини практично не буває аудіогенних судом у тому вигляді, в якому їх виявляють у гризунів. Це свідчить про те, що аудіогенна епілепсія гризунів як модель захворювання людини має певні недоліки. Разом із тим, легкість провокування судом, чіткість та відтворюваність феномену, а також можливість проведення міжлінійних порівнянь на фізіологічному, біохімічному та молекулярно-рівнях роблять дослідження на аудіогенних тестах дуже поширеними.

ВИСНОВКИ. 1. Проведено фармакологічні дослідження протисудомної активності похідних [1,2,4]триазоло[1,5-а]піримідину на моделі аудіогенних судом у тварин.

2. Розраховано фізико-хімічні параметри молекул синтезованих речовин.

3. Обчислено коефіцієнти кореляційної залежності протисудомної активності від фізико-хімічних властивостей синтезованих речовин.

4. Встановлено, що сполуки в даній групі на моделі аудіогенних судом не мають суттєвих рівнів кореляції з показником середньої тяжкості судом та сумарною антиконвульсантною активністю, що може бути аргументом на користь оригінального механізму їх дії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Боровиков В. П. STATISTICA: искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов / В. П. Боровиков. – СПб.: Питер, 2001. – 656 с.

2. Виявлення перспективних фізико-хімічних параметрів для визначення фармакологічної активності в ряду похідних 1-арил-4-арилсульфоніл-5-аміно-1,2,3-триазолів (1Н) / В. А. Георгіянц, Л. О. Перехода, І. А. Сич, А. В. Глущенко // Укр. журн. клін. та лаб. медицини. – 2009. – 4, № 3. – С. 91–95.

3. Георгіянц В. А. Залежність протисудомної активності від молекулярної будови / В. А. Георгіянц, Л. О. Перехода, А. В. Глущенко // Мед. хімія. – 2009. – 11, № 2. – С. 36–40.

4. Гублер Е. В. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях / Е. В. Гублер, А. А. Генкин. – Л.: Медицина, 1973. – 141 с.

5. Крушинский Л. В. Формирование поведения животных в норме и патологии / Л. В. Крушинский. – М.: Изд-во МГУ, 1960. – 236 с.

6. Максименко О. Г. Рівень триптофану і серотоніну в умовах судомної готовності головного мозку / О. Г. Максименко, В. М. Савченко // Вісник ХНУ ім. В. Н. Каразіна. – 2000. – № 494. – С. 39–42.

7. Протисудомна активність диметиллових естерів 1-арил-1,2,3-триазол(1Н)-4,5-дикарбонових кислот та її залежність від молекулярної будови / Л. О. Перехода, В. А. Георгіянц, Т. Л. Рибальченко, С. В. Плис // Клін. фармація. – 2009. – 13, вип. 3. – С. 67–70.

8. Северіна Г. І. Синтез та протисудомна активність похідних [1,2,4]триазоло[1,5-а]піримідину / Г. І. Северіна, Л. О. Перехода, В. А. Георгіянц // Фармац. часопис. – 2009. – № 3 (9). – С. 3–6.

9. Dahlstron A. Evidence for the existence of monoamine containing neurons in the central nervous system / A. Dahlstron, K. Fuxe // Acta physiol. Scand. – 1995. – 64, № 247. – P. 39–85.

10. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery

and development settings / C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. Feeney // J. Adv. Drug Delivery Rev. – 1997. – **23**, № 1. – P. 3–25.

11. Synthesis and biological activity of new derivatives of 3-(3,4-diaryl-1,2,4-triazole-5-yl)propenoic acid / B. Modzelewska-Banachiewicz, J. Banachiewicz, A. Chod-

kowska [et al.] // Eur. J. Med. Chem. – 2004. – **39**, № 10. – P. 873–877.

12. Synthesis of 3-(aryalkylthio)-4-alkyl/aryl-5-(4-aminophenyl)-4H-1,2,4-triazole derivatives and their anticonvulsant activity / I. Kucukguzel, S. Guniz Kucukguzel, S. Rollas [et al.] // Farmaco. – 2004. – **59**, № 11. – P. 893–901.

Л. А. Перехода, А. И. Северина, В. А. Георгианц, В. В. Гриненко
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПРОИЗВОДНЫХ ТРИАЗОЛОПИРИМИДИНА И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ СООТНОШЕНИЯ “СТРУКТУРА-ПРОТИВОСУДОРОЖНАЯ АКТИВНОСТЬ”

Резюме

Проведены фармакологические исследования противосудорожной активности производных [1,2,4]триазоло[1,5-а]пиримидина на модели аудиогенных судорог у животных. Рассчитаны физико-химические параметры молекул синтезированных веществ. Вычислены коэффициенты корреляционной зависимости противосудорожной активности от электронно-пространственных параметров молекул и физико-химических свойств исследуемых соединений. Установлено, что соединения в данной группе на модели аудиогенных судорог не имеют существенных уровней корреляции с показателем средней тяжести судорог и суммарной антиконвульсантной активностью, что может быть аргументом в пользу оригинального механизма их действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: синтез, 1,2,4-триазол, пиримидин, количественные соотношения “структура-активность”.

L. O. Perekhoda, H. I. Severina, V. A. Heorhiyants, V. V. Hrynenko
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF DERIVATIVES TRYAZOLOPIRYMIDYNS AND QUANTITATIVE RATIO “STRUCTURE-ANTICONVULSANT ACTIVITY”

Summary

A pharmacological study of anticonvulsant activity of derivatives of [1,2,4] triazolo [1,5-a] pyrimidine was carried out on audiogenic seizures tests in animals. There were calculated physico-chemical parameters of molecules synthesized substances. There were calculated correlation coefficients depending on anticonvulsant activity of electron-spatial parameters of molecules and physico-chemical properties of the compounds. It was determined, that none of the calculated parameters of molecules of the compounds does not correlate with the average severity of seizures on the audiogenic models, which can be the argument in favor of the original mechanism of their action.

KEY WORDS: synthesis of 1,2,4-triazole, pyrimidine, quantitative ratio “structure-anticonvulsant activity”.

Отримано 18.05.11

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

**ГІСТОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ М'ЯКИХ ТКАНИН ОВЕЦЬ
З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ГНІЙНО-ЗАПАЛЬНИМ ПРОЦЕСОМ НА ФОНІ
ВИКОРИСТАННЯ ПОХІДНИХ 5-(ФУРАН-2-ІЛ)-1,2,4-ТРІАЗОЛ-3-ТІОНІВ**

Вивчено особливості гістології м'яких тканин овець з експериментальним гнійно-запальним процесом на фоні використання субстанції піперидиній 2-(5-фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілітіо)ацетату.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: піперидиній 2-(5-фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілітіо)ацетат, гістологічні дослідження.

ВСТУП. Впровадження в медичну та ветеринарну практику нових малотоксичних та високоефективних лікарських засобів є актуальним завданням сучасної науки. Відомо, що серед фармакологічно активних субстанцій особливу увагу привертають синтетичні молекули [2, 4, 5], які є основою для створення потенційних ліків. Аналізуючи літературні джерела [1, 3, 6–12], слід відмітити, що великі синтетичні та фармакологічні перспективи належать гетероциклічній системі – 1,2,4-тріазолу.

На сьогодні в медичній практиці широко застосовують лікарські засоби, діючою речовиною яких є похідні 1,2,4-тріазолу [2, 4, 5]. Крім того, відомо, що система 1,2,4-тріазолу – фрагмент багатьох фармакологічно активних субстанцій [1, 6, 9, 10, 12]. Таким чином, продовження пошуку біологічно активних молекул серед заміщених 1,2,4-тріазолу є перспективним напрямком синтетичної хімії та не викликає жодних сумнівів [13].

Раніше ми відмічали [1, 6, 9–11], що піперидиній 2-(5-фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілітіо)ацетат (“Комбістим”, “Трифузол”) є практично нетоксичною речовиною, яка проявляє високу біологічну властивість. Результати фармакологічних досліджень піперидиній 2-(5-фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілітіо)ацетату свідчать про високу імуномодельную, антиоксидантну, гепатопротекторну активність. Крім того, виявлено противірусну дію. Встановлено також позитивний вплив даної солі на ди-

© В. В. Парченко, 2011.

наміку та перебіг асептичного і гнійного запалення [7, 9, 10]. Попередні результати вивчення фармакологічної активності свідчать про досить високу перспективу створення на основі субстанції піперидиній 2-(5-фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілітіо)ацетату нового оригінального вітчизняного лікарського засобу.

Таким чином, ми вважали за доцільне вивчити більш детально цю сполуку. Тому метою наших досліджень на даному етапі було вивчити особливості гістології м'яких тканин з експериментальним гнійно-запальним процесом на фоні використання субстанції піперидиній 2-(5-фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілітіо)ацетату.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Гістологічні дослідження проводили в трьох дослідних групах. Як комплексну терапію для кожної дослідної групи застосовували різні комбінації лікарських засобів.

1-ша дослідна група. Місцево мазь “Трифузол” (піперидиній 2-(5-фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілітіо)ацетат) 1 % на гідрофільній основі (I фаза ранового процесу), 1 % крем-емульсія “Трифузол” (піперидиній 2-(5-фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілітіо)ацетат) (II фаза ранового процесу) з 1 % водним розчином “Трифузолу” (піперидиній 2-(5-фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілітіо)ацетату) внутрішньом'язово 1,0 мк/кг з інтервалом 72 год.

2-га дослідна група. Місцево мазь “Левомеколь” (I фаза ранового процесу), лінімент

бальзамічний за Вишневським (II фаза ранового процесу) з водним розчином селеніту натрію внутрішньом'язово 0,01 мк/кг з інтервалом 7 діб.

3-тя дослідна група. Місцево мазь "Левомеколь" (I фаза ранового процесу), лінімент бальзамічний за Вишневським (II фаза ранового процесу) із замісною естрогено-ліпосомальною терапією.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як показали наші гістологічні дослідження, на 3-тю добу після нанесення рани реєструвались яскраво виражені деструктивні процеси тканин у ділянці пошкодження. Слід відзначити, що ці процеси мали мозаїчний характер. Так, у глибоких шарах, зокрема в підшкірній жировій клітковині, виявляли окремі вогнища клітинної інфільтрації на фоні деструкції ліпоцитів. Причому в окремих місцях ліпоцити, внаслідок порушення їх цитолемі, утворювали жирові кісти. Клітинні інфільтрати склались переважно з нейтрофільних лейкоцитів. У складі таких інфільтратів зустрічались поодинокі скупчення лімфоцитів, макрофагів, плазмоцитів, а також еритроцитів. Характерно, що такі клітинні комплекси пронизували жирову клітковину у вигляді різних за товщиною тяжів у напрямку до поверхні ранового каналу (рис. 1). Слід відзначити, що судини мікроциркуляторного русла, прилеглі до клітинного інфільтрату, були різко розширені, переповнені кров'ю. На поверхні ранового дефекту в зоні підшкірної жирової тканини виявили струп. Структура його була неоднорідною. На поверхні простежувались гомогенні еозинофільні маси у вигляді згорнутої лімфи та плазми крові.

У глибоких шарах струпа були зосереджені круглоклітинні інфільтрати (рис. 2). У шкірі запальний процес виражений неоднозначно.

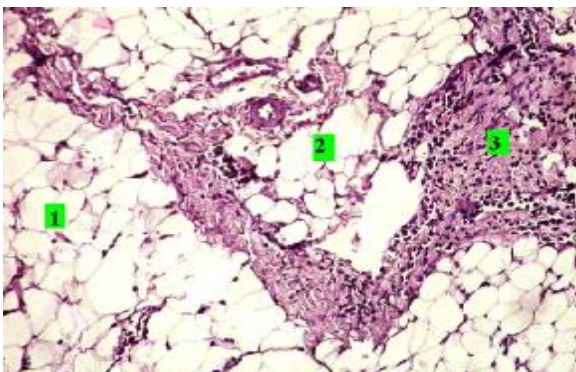


Рис. 1. Просочена гнійним ексудатом жирова клітковина (3-тя доба): 1 – жирова тканина; 2 – жирові кісти; 3 – інфільтрована лейкоцитами волокниста сполучна тканина. Забарвлення гематоксилином Ерліха та еозином.

При вивченні мікропрепаратів зустрічались ділянки, заповнені гнійним ексудатом, місцями з домішками еритроцитів.

При цьому гнійний ексудат поширювався не тільки у власне дермі, але й виходив на поверхню через ділянки зруйнованого епідермісу. Останнє закінчилось формуванням струпа (рис. 2).

В окремих місцях дерма була різко набрякла. Нейтрофільний ексудат поширювався відносно рівномірно. Мало місце стоншення епідермісу з наявністю в ньому мікроабсцесів. За рахунок формування останніх відбувалась перфорація епідермісу і через новоутворений канал гнійний ексудат виходив на поверхню шкіри. Зустрічались місця, де виникало відшарування епідермісу ексудатом. У цьому випадку нейтрофіли виходили на поверхню шкіри між клітинами епідермісу внаслідок його різкого набряку (рис. 3).

Аналізуючи гістологічні препарати з ранового біоптату через 7 діб від початку лікування, можна відзначити суттєві позитивні зрушен-

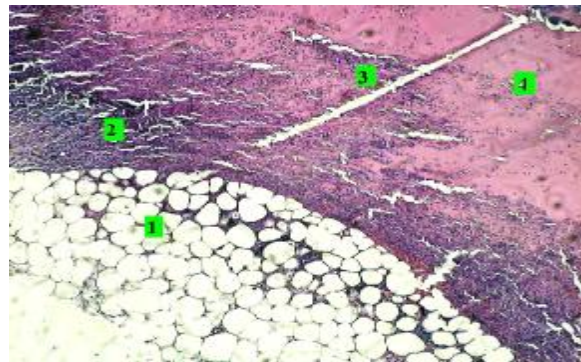


Рис. 2. Струп на поверхні жирової клітковини (3-тя доба): 1 – жирова клітковина; 2 – лейкоцитарний інфільтрат; 3 – нейтрофіли в товщі струпа; 4 – гомогенні білкові маси. Забарвлення гематоксилином Ерліха та еозином.

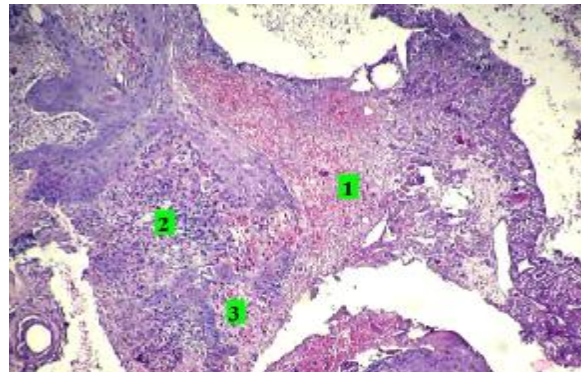


Рис. 3. Гістоструктура поверхневих шарів шкіри (3-тя доба): 1 – геморагічне вогнище; 2 – гнійний ексудат; 3 – відділення епідермісу від дерми. Забарвлення гематоксилином Ерліха та еозином.

ня в бік загоювання ранового дефекту в результаті застосування медикаментозних препаратів порівняно з контрольною групою. Характер патоморфологічних процесів у рановому каналі залежить від використання різних лікарських засобів. У зв'язку з цим, швидкість загоювання ранового дефекту в кожній групі тварин може бути оцінена неоднозначно.

У 1-й групі експериментальних тварин відмічали інтенсивне звільнення шкірних покривів від залишків нейтрофільної інфільтрації, тобто гною. Характерно, що клітинний склад ексудату різко відрізнявся від такого в попередній часовий період. Як видно з рисунка 4, в ексудаті переважали еозинофільні тіні нейтрофілів – гнійні тільця.

Звернула на себе увагу гіпертрофія епідермісу за рахунок гіперплазії клітин шкірного шару. Мав місце помірно виражений набряк. У дермі розвивався склероз, що проявлявся наявністю значної кількості фібробластів та невеликої кількості тонких еозинофільних волокон, що формували рубцеві структури в цьому шарі шкіри. Аналіз гістологічних препаратів із ранових біоптатів експериментальних тварин 2-ї дослідної групи на 7-му добу лікування гнійного запалення свідчить про нерівномірність репаративних процесів у різних ділянках. Поряд з еміграцією гнійного ексудату на поверхню шкіри відмічали формування грануляційної тканини.

Звернув на себе увагу рідкий характер ексудату, клітинний склад якого становили переважно гнійні тільця, серед яких розміщені поодинокі нейтрофіли з різним станом ядра. В них відмічали явища каріопікнозу, каріорексису та каріолізу.

Поряд із цим, у дермі виявляли грануляційну тканину. Простори між судинами в ній були густо заповнені фібробластами. Явища фібрилогенезу не виражені (рис. 5). У ділянках із непошкодженим епідермісом розвивались набряк шипуватого шару та явища акантозу. В інших ділянках шкіри, незважаючи на значне скупчення гною на її поверхні, позбавленій епідермісу, місцями виявляли острівці грануляційної тканини, а також початкові етапи її дозрівання, що характеризувались наявністю тонких еозинофільних волокон. Поверхневі шари дерми були просочені густим гнійним ексудатом, в якому переважали нейтрофіли.

У контрольній групі тварин процеси очищення рани, а також її загоювання відставали від таких у 1-й та 2-й групах. Про це свідчили ділянки шкіри, позбавлені епідермісу й густо просочені гнійним ексудатом, що містив

велику кількість функціонально активних нейтрофілів. Також виявляли обширні ділянки скупчення еозинофільної гомогенної маси, густо просоченої нейтрофільними лейкоцитами. Місцями реєстрували проникнення нейтрофілів між клітинами набряклого епідермального шару. В останніх мав місце розвиток гідропічної і балонної дистрофії та набряку (рис. 6).

На 14-ту добу експерименту в овець 1-ї дослідної групи процеси репаративної регенерації відмічали в усіх шарах шкіри. Клітини епідермісу досягали рівня дефінітивних структур. Епідерміс представлений всіма шарами. Роговий шар тонкий.

Дерма виглядала повністю сформованою. В ній виявляли товсті й тонкі колагенові волокна. Єдиною особливістю слід вважати непорядкованість ходу цих волокнистих структур

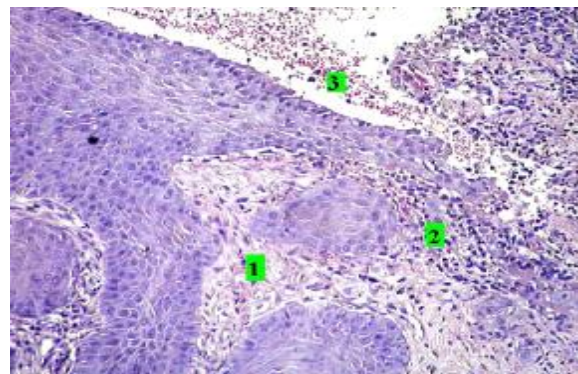


Рис. 4. Гістоструктура ранового біоптату на 7-му добу в 1-й дослідній групі: 1 – грануляційна тканина під епідермісом з утворенням тоненьких волокон; 2 – лейкоцитарно-геморагічний інфільтрат; 3 – вихід ексудату на поверхню епідермісу. Забарвлення гематоксиліном Ерліха та еозином.

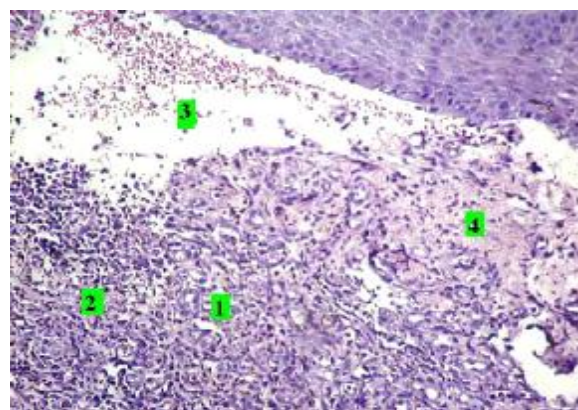


Рис. 5. Гістоструктура ранового біоптату на 7-му добу в 2-й дослідній групі: 1 – молода грануляційна тканина; 2 – значна кількість фібробластів; 3 – гнійний ексудат; 4 – острівці молодої волокнистої сполучної тканини. Забарвлення гематоксиліном Ерліха та еозином.

(рис. 7). Крім цього, відмічали різке зменшення кількості тонкостінних кровоносних судин, а також фібробластів. В окремих мікросудинах, що збереглися, реєстрували потовщення стінки, тобто утворення всіх її шарів. У сосочковому шарі дерми були розсереджені чисельні залози й одиничні волосяні фолікули. Це свідчило про активні регенеративні процеси в шкірі.

Що стосувалось процесів загоювання ран у тварин 2-ї дослідної групи, то станом на 14-ту добу значних відмінностей в гістологічних препаратах, порівняно з 1-ю дослідною групою овець, практично не відмічали. Ретельний аналіз мікропрепаратів дозволив відзначити певне відставання в процесах рубцювання.

Свідченням цього твердження слід вважати ту обставину, що дерма містить ще не дозрілі ніжні волокнисті структури, а також велику кількість фібробластів (рис. 8). Крім цього, в даній групі тварин регенерація придатків шкіри була виражена недостатньо.

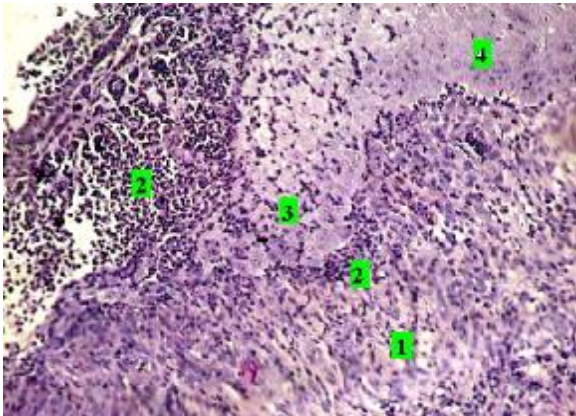


Рис. 6. Гнійна інфільтрація поверхневих шарів шкіри (7-ма доба, контрольна група): 1 – дерма; 2 – гнійний інфільтрат; 3 – нейтрофіли між клітинами епідермісу; 4 – гідропічна і балонна дистрофія клітин епідермісу. Забарвлення гематоксилином Ерліха та еозином.

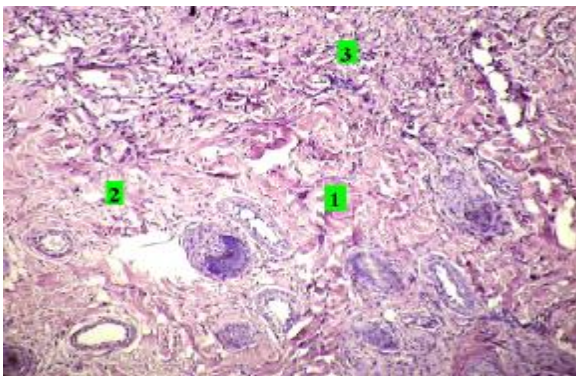


Рис. 7. Гістоструктура ранового біоптату в тварини 1-ї дослідної групи на 14-ту добу: 1 – грубі колагенові волокна; 2 – одиничні кровоносні судини; 3 – тонкі колагенові волокна і фібробласти. Забарвлення гематоксилином Ерліха та еозином.

Характер загоювання ранового дефекту в контрольній групі овець станом на 14-ту добу від початку лікування характеризувався значним відставанням. При вивченні гістологічних препаратів в усіх шарах шкіри відмічали початкові етапи формування рубцевої тканини. Так, у дермі виявляли молоду грануляційну тканину, пронизану великою кількістю кровоносних капілярів. Крім цього, тут була велика кількість фібробластів, між якими розкидані тонкі колагенові волокна (рис. 9). Процеси регенерації придатків шкіри практично відсутні.

Шар епідермісу має вигляд тонкої смужки, клітинний склад якої ще повністю не сформований. Це свідчить про початкові етапи відновлення структур шкіри, зокрема епідермісу. Підсумовуючи наведений фактичний матеріал, слід відзначити, що загоювання нанесених ран у нашому експерименті відбувалось через нагноювання.

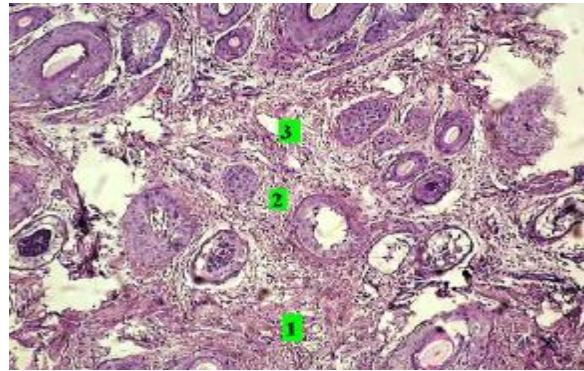


Рис. 8. Гістоструктура ранового біоптату в тварини 2-ї дослідної групи на 14-ту добу: 1 – ділянки товстих колагенових волокон; 2 – тонкі волокнисті структури; 3 – розширений кровоносний капіляр. Забарвлення гематоксилином Ерліха та еозином.

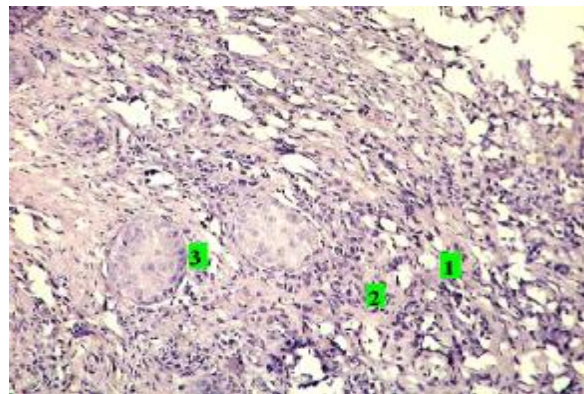


Рис. 9. Гістоструктура ранового біоптату в тварини контрольної групи на 14-ту добу (глибокий шар дерми): 1 – множинні кровоносні капіляри; 2 – фібробласти серед тонких волокнистих структур; 3 – початкова стадія регенерації волосяних фолікулів. Забарвлення гематоксилином Ерліха та еозином.

На перших етапах цього процесу виникало гнійне запалення. За рахунок складних морфо-біохімічних процесів відбувались лізис змертвілих тканин і, з часом, вихід гнійного ексудату на поверхню. У звільнених від некротичних мас та ексудату тканинах з'являлась молода грануляційна тканина. Таким чином відбувалось очищення рани. Поступово грануляційна тканина, дозріваючи, перетворилась в рубцеву. Цей процес починався вглибині рани і поступово поширювався в бік її поверхні. Швидкість перебігу ранового процесу залежала від значної кількості факторів

зовнішнього та внутрішнього середовища, а також від активності лікарських речовин.

ВИСНОВОК. Результати досліджень свідчать про особливості гістології м'яких тканин овець з експериментальним гнійно-запальним процесом. Як показали результати досліджень, найшвидше очищення ран і формування рубцевої тканини відбувалися в овець 1-ї дослідної групи, яким комплексно вводили препарат "Трифузол" (піперидиній 2-(5-фуран-2-іл)-4-феніл-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)-ацетат).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антиоксидантна активність деяких похідних 1,2,4-тріазолу при експериментальній гіперліпемії / Є. С. Пругло, І. М. Білай, А. Г. Каплаушенко [та ін.] // Фармац. часопис. – 2010. – Вип. 1 (10). – С. 61–65.
2. Бертрам Г. Катцунг. Базисная и клиническая фармакология / Бертрам Г. Катцунг. – М. : Бином, 1998. – Т. 2. – 669 с.
3. Досягнення сучасної фармації та перспективи її розвитку у новому тисячолітті : Матеріали 5 нац. з'їзду фармацевтів України / [Л. Г. Прокопенко, Н. А. Бистрова, Ю. О. Яхонтова та ін.] – Х., 1999. – С. 446.
4. Кожные и венерические болезни : справочник / под ред. О. Л. Иванова. – М. : Медицина, 1997. – 350 с.
5. Машковский М. Д. Лекарственные средства / М. Д. Машковский. – М. : Медицина, 1986. – Т. 1. – 621 с.; Т. 2. – 575 с.
6. Нейропротективна активність S-похідних 1,2,4-тріазолу / Р. О. Щербина, В. В. Парченко, С. В. Павлов [та ін.] // Запорж. мед. журн. – 2011. – **13**, № 1. – С. 94–97.
7. Особливості перебігу асептичного та гнійно-го запалення в овець і його корекція / В. Й. Іздепський, С. П. Челідзе, Б. П. Киричко, В. В. Парченко // Ветеринарна медицина. – 2008. – № 3. – С. 33–35.
8. Панасенко О. І. Синтез, перетворення, фізико-хімічні та біологічні властивості похідних 1,2,4-тріазолу : дис. д-ра фармац. наук / Панасенко О. І. – К., 2005. – 396 с.
9. Пат. 90983 Україна, А61К 31/4196, А61К 9/06, А61Р 29/00. Мазь для корекції перебігу запальних процесів / Книш Є. Г., Парченко В. В., Панасенко О. І., Іздепський В. Й. та ін. – Заявл. 12.10.09 ; опубл. 10.06.10, Бюл. № 11.
10. Пат. 90984 Україна, А61К 31/4196, А61К 9/08, А61Р 29/00. Ін'єкційний розчин для корекції перебігу запальних процесів / Книш Є. Г., Парченко В. В., Панасенко О. І., Іздепський В. Й. та ін. – Заявл. 12.10.09 ; опубл. 10.06.10, Бюл. № 11.
11. Протизапальна активність S-похідних 5-(фуран-2-іл)-4-R-1,2,4-тріазол-3-тіонів / В. В. Парченко, О. І. Панасенко, Є. Г. Книш [та ін.] // Запорж. мед. журн. – 2009. – **11**, № 4. – С. 100–102.
12. Рукавишнікова В. М. Лечение и профилактика микозов стоп. / В. М. Рукавишнікова, Г. И. Суколин, В. Т. Ку克林 – Казань, 1994.
13. 5-R-2,4-дигідро-1,2,4-тріазол-3-тіооцетові кислоти та їх солі як біологічно активні сполуки / В. В. Парченко, Ю. В. Маковик, О. І. Панасенко [та ін.] // Запорж. мед. журн. – 2004. – **2**, № 1. – С. 37–39.

**ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЯГКИХ ТКАНЕЙ ОВЕЦ
С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМ
ПРОЦЕССОМ НА ФОНЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРОИЗВОДНЫХ
5-(ФУРАН-2-ИЛ)-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТИОНОВ**

Резюме

Изучены особенности гистологии мягких тканей овец с экспериментальным гнойно-воспалительным процессом на фоне использования субстанции пиперидиний 2-(5-фуран-2-ил)-4-фенил-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетата.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пиперидиний 2-(5-фуран-2-ил)-4-фенил-1,2,4-триазол-3-илтио)ацетат, гистологические исследования.

V. V. Parchenko
ZAPORIZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

**HISTOLOGICAL EXAMINATIONS OF SHEEP SOFT TISSUE
WITH EXPERIMENTAL PURULENT-INFLAMMATORY PROCESS
ON THE BACKGROUND OF THE USE OF DERIVATIVES
OF 5-(FURAN-2-YL)-1,2,4-TRIAZOL-3-TIONS**

Summary

There were studied the peculiarities of the histology of soft tissues of sheep with experimental purulent-inflammatory processes on the background of substance piperidine 2 – (5-Furan-2-yl)-4-phenyl-1,2,4-triazol-3-ithio) acetate.

KEY WORDS: piperidine 2 – (5-Furan-2-yl)-4-phenyl-1,2,4-triazol-3-ithio) acetate, histological studies.

Отримано 13.05.11

Адреса для листування: В. В. Парченко, Запорізький державний медичний університет, просп. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.

ВПЛИВ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ ЕКСТРАКТІВ З НАСІННЯ ВИНОГРАДУ НА ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНІ ПОКАЗНИКИ ТКАНИН ЩУРІВ В УМОВАХ СТРЕСУ

Одноразове введення адреналіну спричиняє розвиток оксидативного стресу в щурів: підвищення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів та зниження антиоксидантних показників. Профілактичне введення поліфенольних екстрактів з насіння винограду двох сортів запобігає порушенню антиоксидантно-прооксидантної рівноваги різною мірою. Обговорюються антиоксидантні властивості досліджених поліфенольних екстрактів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **поліфеноли, продукти перекисного окиснення ліпідів, антиоксиданти.**

ВСТУП. Сучасна людина повсякчас стикається з негативним впливом різних факторів зовнішнього середовища: механічних, фізичних, хімічних, біологічних, психоемоційних та психосоціальних. Незалежно від природи будь-який з них запускає універсальний каскад неспецифічних стрес-реакцій, направлений на відновлення гомеостазу.

На сьогодні відомо, що загальним механізмом пошкодження за дії стрес-чинників є порушення окисно-відновної рівноваги, що виступає первинним медіатором стресу [5]. На першому етапі розвитку стрес-реакції відбувається активація симпато-адреналової та гіпоталамо-гіпофізо-кортикоадреналової систем, в тому числі підвищене продукування катехоламінів наднирковими залозами. Останні (адреналін, норадреналін) підсилюють забезпечення органів киснем та поживними речовинами. Збільшені рівні жирних кислот, глюкози та кисню неминуче призводять до активації вільнорадикального окиснення, первинними мішенями якого є мембранні ліпіди та ліпопротеїни крові. Крім того, метаболізм катехоламінів реалізується через проміжне утворення радикалів, які також стимулюють перекисне окиснення ліпідів (ПОЛ). Таким чином, оксидативний стрес (зрушення системи антиоксиданти-прооксиданти у бік останніх) є пусковим механізмом, а також наслідком дії стрес-агента.

© А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, О. А. Красільнікова, Г. Б. Кравченко, Н. В. Шишкіна, 2011.

Вільні радикали пошкоджують усі біомолекули та призводять до структурних і метаболічних порушень у клітинах із подальшим розвитком патології, некрозу або трансформації. На сьогодні добре відомо, що вільнорадикальні процеси відіграють провідну роль у патогенезі серцево-судинних, онкологічних, запальних, інфекційних, дегенеративних та інших патологій [5, 12]. Тому пошук та дослідження засобів антирадикальної та антиоксидантної протидії є вкрай актуальними.

Антиоксидантні властивості притаманні багатьом природним та синтетичним речовинам. В останні роки неухильно зростає інтерес фармакологів і медиків до рослинного світу як невичерпного джерела оздоровчих та лікувальних засобів. Перевагу засобам рослинного походження віддають через відсутність ризику побічних реакцій, токсичних та алергічних ускладнень, а також звикання при тривалому прийманні. До того ж, у рослинах кожний біологічно активний компонент присутній і діє в комплексі з аналогами, синергістами, стабілізаторами, які взаємно підсилюють та пролонгують ефекти один одного.

Особливу увагу дослідників привертають протекторні властивості винограду культурного. Високий вміст фенольних речовин у плодах цієї рослини (до 70 % усіх фенолів виноградної ягоди міститься в насінні) надає винограду потужних антиоксидантних, антиканцерогенних, антиатерогенних та протизапальних властивостей [10, 11]. Але вплив профі-

лактичного введення поліфенольних екстрактів з насіння винограду на стан антиоксидантно-прооксидантної системи за умов гострого стресу вивчено недостатньо.

У зв'язку з вищевикладеним, метою даної роботи було дослідити вплив попереднього введення поліфенольних екстрактів з кісточок винограду червоного та білого сортів на антиоксидантно-прооксидантні показники у тканинах щурів за умов стресу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди виконували на безпородних щурах-самцях масою 180–220 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Стрес викликали шляхом одноразового підшкірного введення адреналіну з розрахунку 2 мг на 100 г маси тіла [4]. Тварин декапітували під хлоразоло-уретановим наркозом через 1 год після ін'єкції. Інтактним щурам вводили відповідний об'єм фізрозчину. Поліфенольні екстракти (ПФЕ) з насіння винограду сортів “Каберне” та “Ркацителі” з метою профілактики стресу та групам контрольних тварин вводили щоденно протягом 14 днів внутрішньошлунково з розрахунку 9 мг на 100 г маси тіла. Екстракти було одержано в Національному інституті винограду і вина “Магарач” (м. Ялта). Дослідження проводили відповідно до національних Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001). Об'єктами дослідження були сироватка крові, гомогенати печінки та нирок.

У вищезазначених тканинах визначали вміст загальних гідроперекисів ліпідів (ЗГ) [1],

дієнових кон'югатів (ДК) [7], ТБК-реактивних продуктів (ТБК-РП) та ізолюваних подвійних зв'язків (ІПЗ) [1]. Стан антиоксидантної системи тканин оцінювали шляхом вимірювання рівнів аскорбінової кислоти (АК) [1], α -токоферолу (α -Т [9] та відновленого глутатіону (GSH) [6]. В гомогенатах печінки та нирок визначали також активність глутатіонредуктази [3]. Вміст білка визначали за методом Лоурі в модифікації Міллера.

Результати експериментів обробляли статистично, достовірність змін оцінювали за непараметричним критерієм Манна-Уїтні. Розходження вважали статистично значущими, якщо $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як видно з таблиці 1, однократне введення адреналіну спричинило підвищення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів (загальних гідроперекисів, дієнових кон'югатів, ТБК-реактивних продуктів) та зниження рівня ізолюваних подвійних зв'язків, які є безпосередніми мішенями для атаки вільними радикалами.

Активация вільнорадикальних процесів в усіх досліджених тканинах супроводжувалась зменшенням вмісту антиоксидантів (табл. 2), що пов'язано з їх витрачанням в окисно-відновних реакціях, направлених на захист тканин від пошкоджувальної дії радикалів. Крім того, в печінці та нирках відмічали зниження активності глутатіонредуктази (табл. 2), що може бути результатом окисного пошкодження молекул ферменту або зниження концент-

Таблиця 1 – Вплив попереднього введення ПФЕ на вміст загальних гідроперекисів, дієнових кон'югатів, ТБК-реактивних продуктів та ізолюваних подвійних зв'язків у тканинах щурів за умов стресу ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Тканина	Інтакт	Стрес	ПФЕ “Каберне”	ПФЕ “Каберне”+ стрес	ПФЕ “Ркацителі”	ПФЕ “Ркацителі”+ стрес
ЗГ, нмоль/мл (г тканини)	Сироватка	81,37±9,15	236,42±21,18*	75,11±6,17	108,32±12,14**	78,39±9,54	121,03±10,47**
	Печінка	46,32±2,86	138,01±6,19*	42,11±3,95	62,53±7,89**	40,15±5,14	78,95±8,11**
	Нирки	53,17±6,18	158,45±19,13*	50,34±6,17	117,41±12,37**	52,11±7,75	129,09±18,44*
ДК, нмоль/мл (г тканини)	Сироватка	15,76±2,79	29,61±3,93*	13,94±2,43	20,11±2,15**	14,17±1,95	23,94±3,76*
	Печінка	12,35±1,17	21,17±2,34*	12,99±0,99	15,34±1,95	12,01±1,95	13,25±1,11
	Нирки	16,72±1,49	31,23±2,44*	15,08±1,27	18,25±1,71	15,93±1,74	25,18±3,49*
ТБК-РП, нмоль/мл (мг білка)	Сироватка	0,54±0,09	0,77±0,08*	0,51±0,08	0,63±0,08	0,53±0,09	0,66±0,08
	Печінка	0,19±0,03	0,35±0,05*	0,15±0,05	0,24±0,06	0,17±0,03	0,28±0,05*
	Нирки	0,47±0,07	0,69±0,08*	0,41±0,09	0,53±0,09	0,43±0,07	0,57±0,09
ІПЗ, ΔE /мл (г тканини)	Сироватка	4,95±1,12	1,9±0,74*	5,17±1,32	3,65±0,97	4,84±0,87	5,17±1,95
	Печінка	35,13±3,19	11,79±1,54*	33,74±3,85	27,81±2,95	36,74±3,85	23,47±3,45**
	Нирки	17,94±2,18	5,98±0,97*	18,74±2,11	15,38±1,45	18,01±1,27	12,03±1,27**

Примітка. Тут і в наступній таблиці: * – $p < 0,05$ відносно контролю; # – $p < 0,05$ відносно стресу.

рації NADPH, необхідного для відновлення глутатіону в глутатіонредуктазній реакції.

Профілактичне введення ПФЕ з насіння винограду сорту “Каберне” значною мірою запобігало накопиченню продуктів ПОЛ у досліджених тканинах (табл. 1). Так, за попереднього введення ПФЕ вміст ЗГ у сироватці та печінці знижувався майже вдвічі порівняно зі стресом. Меншою мірою поліфеноли попереджували підвищення рівня ЗГ у нирках. ПФЕ з насіння винограду сорту “Каберне” зменшував накопичення і ТБК-РП у всіх тканинах, спричинене введенням адреналіну. Вміст ДК у сироватці щурів, які отримували ПФЕ до стресорного впливу, залишався підвищеним порівняно з контролем, але нижчим, ніж у стресованих тварин. А в печінці та нирках попереднє введення ПФЕ нормалізувало рівень ДК. Профілактичне введення ПФЕ з насіння винограду сорту “Каберне” також запобігало зниженню вмісту ІПЗ у печінці та нирках щурів.

Вплив профілактичного введення ПФЕ з кісточок винограду сорту “Ркацителі” на підвищення рівнів продуктів ПОЛ схожий, але в цілому антиоксидантний ефект ПФЕ з насіння цього білого сорту винограду менший (табл. 1). Наприклад, попереднє введення поліфенолів з кісточок винограду сорту “Ркацителі” не впливало на підвищення рівня ДК у нирках, викликане введенням адреналіну.

Встановлений антиоксидантний ефект поліфенольних екстрактів, очевидно, зумовлений здатністю фенольних сполук взаємодіяти як з активними метаболітами кисню, так і з пероксидними радикалами ліпідів, а також пригнічувати активність ферментів, що ге-

нерують активні метаболіти кисню. Крім того, проникаючи у гідрофобну ділянку мембран, поліфеноли значно знижують рухливість ліпідів, що зменшує ефективність взаємодії пероксидних радикалів з новими молекулами. Тобто поліфеноли інгібують процеси ПОЛ як на стадії ініціації, так і на стадії подовження ланцюга [2]. Відомо, що антиоксидантні властивості сполук фенольної природи пов'язані також із захистом аскорбінової кислоти й α -токоферолу від окиснення та відновленням їх окиснених форм [10, 13]. Більше того, фенольні сполуки діють як хелатори металів зі змінною валентністю.

Результати профілактичного введення ПФЕ з кісточок винограду сорту “Каберне” загалом свідчать про нормалізуючий вплив і відносно антиоксидантних показників (табл. 2). Так, поліфеноли запобігали зниженню вмісту відновленого глутатіону в усіх досліджених тканинах, що супроводжувалось та може бути пов'язане з відновленням глутатіонредуктазної активності у печінці та нирках. З іншого боку, фенольні сполуки здатні підвищувати рівень GSH завдяки активації його синтезу через антиоксидант-респонсивний елемент. Попереднє введення ПФЕ з “Каберне” нормалізувало також рівень аскорбінової кислоти та α -токоферолу.

Профілактичне введення поліфенолів з насіння винограду сорту “Ркацителі” так само попереджувало зменшення вмісту відновленого глутатіону та α -токоферолу, але не впливало на зниження активності глутатіонредуктази у нирках і меншою мірою запобігало зниженню рівня аскорбінової кислоти у сироватці стресованих тварин (табл. 2).

Таблиця 2 – Вплив попереднього введення ПФЕ на вміст аскорбінової кислоти, α -токоферолу, відновленого глутатіону та активність глутатіонредуктази у тканинах щурів за умов стресу ($M \pm m$, $n=6$)

Показник	Тканина	Інтакт	Стрес	ПФЕ “Каберне”	ПФЕ “Каберне”+ стрес	ПФЕ “Ркацителі”	ПФЕ “Ркацителі”+ стрес
GSH, мкмоль/мл (г тканини)	Сироватка	13,42 \pm 1,41	8,99 \pm 0,96*	12,96 \pm 1,42	12,85 \pm 1,38	13,97 \pm 1,37	12,03 \pm 2,01
	Печінка	5,3 \pm 0,85	3,53 \pm 0,67*	5,07 \pm 0,69	4,88 \pm 0,42	5,12 \pm 0,83	4,31 \pm 0,64
	Нирки	4,66 \pm 0,37	2,89 \pm 0,31*	5,11 \pm 0,74	4,59 \pm 0,63	4,51 \pm 0,62	4,25 \pm 0,51
ГР, нмоль NADPH/хв/мг білка	Печінка	20,34 \pm 1,19	11,45 \pm 0,99*	22,44 \pm 3,21	18,98 \pm 1,87	19,35 \pm 1,07	16,13 \pm 1,19
	Нирки	12,76 \pm 1,78	8,39 \pm 1,11*	13,41 \pm 0,99	11,56 \pm 1,23	14,04 \pm 1,89	9,93 \pm 1,34*
АК, мкмоль/мл (г тканини)	Сироватка	66,51 \pm 3,01	32,94 \pm 1,6*	69,84 \pm 5,42	55,81 \pm 2,18**	67,12 \pm 3,07	49,64 \pm 3,24**
	Печінка	3,67 \pm 0,41	1,39 \pm 0,22*	3,95 \pm 0,57	3,49 \pm 0,52	3,89 \pm 0,44	3,27 \pm 0,47
	Нирки	8,19 \pm 1,35	5,28 \pm 0,93*	7,99 \pm 0,88	8,05 \pm 0,97	7,57 \pm 0,91	7,36 \pm 0,83
α -Т, нмоль/мл (г тканини)	Сироватка	10,54 \pm 1,17	7,94 \pm 1,16*	12,74 \pm 2,11	9,89 \pm 1,64	11,33 \pm 1,54	8,97 \pm 0,99
	Печінка	29,54 \pm 2,23	12,31 \pm 1,76*	35,19 \pm 4,34	26,07 \pm 2,15	33,14 \pm 3,56	24,15 \pm 2,31
	Нирки	18,37 \pm 1,13	10,31 \pm 1,89*	19,24 \pm 2,11	16,92 \pm 1,78	17,34 \pm 1,85	15,27 \pm 1,89

Отримані нами дані про перевагу поліфенолів із червоного винограду в протекції наслідків стресу узгоджуються з літературними [8]. Більш виражений антиоксидантний вплив ПФЕ з “Каберне”, порівняно з ПФЕ з “Ркацителі”, ймовірно, пов’язаний з вищим вмістом фенольних сполук у ПФЕ з червоного винограду. Зокрема, концентрація дельфінідин-3-О-глікозиду в 54,8 раза, пеонідин-3-О-ацетилглікозиду – в 9,5 раза, мальвідин-3-О-глікозиду – в 3,9 раза, пеонідин-3-О-глікозиду – в 3,3 раза вища у ПФЕ з насіння винограду сорту “Каберне”, ніж у ПФЕ з насіння винограду сорту “Ркацителі”. З літера-

турних джерел відомо, що саме ці сполуки (глікозиди та аглікони дельфінідину, пеонідину, мальвідину, ціанідину, пеларгонідину) відіграють головну роль в антиоксидантній активності продуктів переробки винограду [14].

ВИСНОВОК. Профілактичне введення поліфенолів з насіння винограду запобігає змінам прооксидантно-антиоксидантного балансу, спричиненим одноразовою ін’єкцією адреналіну. Поліфенольний екстракт з кісточок червоного винограду сорту “Каберне” забезпечує більш ефективний антиоксидантний захист.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Арутюнян А. В. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / А. В. Арутюнян, Е. Е. Дубинина, Н. Н. Зыбина. – СПб. : ИКФ “Фолиант”, 2000. – 104 с.
2. Барабой В. А. Биоантиоксиданты / В. А. Барабой. – К. : Книга плюс, 2006. – 462 с.
3. Герасимов А. М. Ферментативные механизмы торможения перекисного окисления липидов в различных отделах головного мозга / А. М. Герасимов, Л. А. Королева, О. С. Брусов [и др.] // *Вопр. мед. химии.* – 1976. – **22**, № 1. – С. 89–94.
4. Морфологическая характеристика слизистой оболочки желудка и его регионального лимфатического узла при язвенном процессе и лимфотропной коррекции / М. В. Фроликова, В. Н. Горчаков, Л. П. Радченко [и др.] // *Бюллетень СО РАМН.* – 2005. – **115**, № 1. – С. 11–16.
5. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / [Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др.]. – М. : Фирма “Слово”, 2006. – 556 с.
6. Путилина Ф. Е. Определение содержания восстановленного глутатиона в тканях // *Методы биохимических исследований*; под ред. М. И. Прохоровой. – Л. : Изд-во Ленинград. ун-та, 1982. – С. 183–185.
7. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови / И. А. Волчегорский, А. Г. Налимов, Б. Г. Яровинский, Р. И. Лифшиц // *Вопр. мед. химии.* – 1989. – № 1. – С. 127–131.
8. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging / D. de Beer, E. Joubert, W. C. Gelderblom, M. Manley // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – **51**. – P. 902–909.
9. Baoutina A. Macrophages can decrease the level of cholesteryl ester hydroperoxides in low density lipoprotein / A. Baoutina, R. T. Dean, W. Jessup // *J. Biol. Chem.* – 2000. – **275**, № 3. – P. 1635–1644.
10. Cancer chemoprotective activity of resveratrol, a natural product derived from grapes / M. Jang, L. Cai, G. O. Udeani [et al.] // *Science.* – 1997. – **275**. – P. 218–220.
11. Determination of peroxy radical scavenging activity of flavonoids and plant extracts using an automatic potentiometric titrator / M. Sano, R. Yoshida, M. Degawa [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – **51**. – P. 2912–2916.
12. Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies / U. Forstermann // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* – 2008. – **5**, № 6. – P. 338–349.
13. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine / E. N. Frankel, J. Kanner, B. German [et al.] // *Lancet.* – 1993. – **341**. – P. 454–457.
14. Tsuda T. Mechanism for the peroxynitrite scavenging activity by the anthocyanins/ Tsuda T. // *FEBS Lett.* – 2000. – **484**, № 3. – P. 207–210.

А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, О. А. Красильникова,
А. Б. Кравченко, Н. В. Шишкина
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ВЛИЯНИЕ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ СЕМЯН ВИНОГРАДА НА ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ТКАНЕЙ КРЫС ПРИ СТРЕССЕ

Резюме

Одноразовое введение адреналина вызывает развитие оксидативного стресса у крыс: повышение содержания продуктов перекисного окисления липидов и снижение антиоксидантных показателей. Профилактическое введение полифенольных экстрактов из семян винограда двух сортов предупреждает нарушение антиоксидантно-прооксидантного равновесия в разной степени. Обсуждаются антиоксидантные свойства исследованных полифенольных экстрактов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: полифенолы, продукты перекисного окисления липидов, антиоксиданты.

A. L. Zahayko, V. P. Fylymonenko, O. A. Krasilnikova, H. B. Kravchenko, N. V. Shyshkina
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

THE INFLUENCE OF POLYPHENOLIC EXTRACTS FROM GRAPE'S SEEDS ON PROOXIDANT-ANTIOXIDANT PARAMETERS IN RAT TISSUES UNDER STRESS

Summary

The single adrenalin causes development of the oxidative stress in rat tissues: the increase of lipid peroxidation products levels and the decrease of antioxidant parameters. Prophylactic introduction by polyphenolic extracts from grape's seeds of two sorts prevents the antioxidant-prooxidant unbalance in a different degree. The antioxidant properties of studied polyphenolic extracts are discussed.

KEY WORDS: polyphenols, lipid peroxidation products, antioxidants.

Отримано 21.04.11

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

**ВИВЧЕННЯ АНТИАГРЕГАНТНОЇ ТА АНТИКОАГУЛЯНТНОЇ АКТИВНОСТІ
7-(2'-ГІДРОКСИ-3'-ІЗОПРОПОКСИ)ПРОПІЛ-3-МЕТИЛ-8-
(4'-ФЕНІЛПІПЕРАЗИН-1'-ІЛ)-КСАНТИНУ В ЩУРІВ НА ФОНІ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІПЕРЛІПІДЕМІЇ**

Проведено дослідження антиагрегантної та антикоагулянтної активності сполуки 7-(2'-гідрокси-3'-ізопропокси)пропіл-3-метил-8-(4'-фенілпіперазин-1'-іл)-ксантину при гіперліпідемії. Ця сполука впливає на першу та другу ланки гемостазу. Зокрема, антиагрегантна активність проявлялася за рахунок зменшення індексу активації тромбоцитів, ступеня агрегації та збільшення часу агрегації, антикоагулянтна дія – за рахунок зниження автокоагуляційного тесту, протромбінового індексу і фібриногену. Причому за рядом показників сполука 25 не поступалася препаратам порівняння – синкумару, ацетилсаліцилової кислоті та пентоксифіліну.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: сполука 7-(2'-гідрокси-3'-ізопропокси)пропіл-3-метил-8-(4'-фенілпіперазин-1'-іл)-ксантин, антиагрегантна та антикоагулянтна активність.

ВСТУП. Сучасні підходи до профілактики та лікування хворих на атеросклероз передбачають застосування антиагрегантних та антикоагулянтних засобів [2]. Відомо, що тромбоцити містять у своїх гранулах інгібітор активатора плазміногена. Вивільнення цих речовин при активації тромбоцитів може обмежувати лізування тромбів. Мабуть, при блокуванні ксантинами реакції “вивільнення” з тромбоцитів блокується і викид інгібіторів фібринолізу на відміну від аспірину [3].

З даних літератури, до того ж, відомо, що похідні ксантину проявляють периферичну вазодилататорну, антиагрегантну, кардіонейропротекторну, гіполіпідемічну дію за механізмом, пов'язаним з інгібуванням ізоферментів 3',5'-фосфодіестерази РДЕ₁ – РДЕ₅ при активації А₁- і А₂-аденозинових рецепторів [4].

У зв'язку з цим, метою даної роботи було вивчити антиагрегантну й антикоагулянтну активність речовини з найбільш вираженими гіполіпідемічною і антиатероматозною діями 7-(2'-гідрокси-3'-ізопропокси)пропіл-3-метил-8-(4'-фенілпіперазин-1'-іл)-ксантину (сполука 25), яку було обрано на підставі даних раніше проведеного скринінгу похідних 3-метилксантину при експериментальній гіперліпідемії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Після заздалегідь проведеного скринінгу нами була вивчена ан-

тиагрегантна й антикоагулянтна активність речовини з найбільш вираженими гіполіпідемічною і антиатероматозною діями 7-(2'-гідрокси-3'-ізопропокси)пропіл-3-метил-8-(4'-фенілпіперазин-1'-іл)-ксантину (сполука 25). Досліди проведено на 58 щурах лінії Вістар обох статей масою 220–260 г. Об'єктом дослідження була плазма крові, яку забирали з черевного відділу аорти тварин на 6-ту добу після моделювання експериментальної гіперліпідемії в щурів: пероральне зондове введення дорослим щурам-самцям (які сформовано в групі по 7–9 тварин) холестерину в добовій дозі 40 мг/кг та фактора порушення ліпідного метаболізму й посилення всмоктування стероїдів у кишечнику – 0,125 % олійного розчину ергокальциферолу (вітамін D₂) в добовій дозі 8 мл/кг [5, 7]. Водну суспензію сполуки 25 вводили per os через годину після введення гіперліпідемогенної суміші протягом 5 днів. На 6-й день після наркотизації етиловим естером здійснювали забір крові з біфуркації аорти. Препаратами порівняння було обрано класичні антиагреганти ацетилсаліцилову кислоту і пентоксифілін, непрямий антикоагулянт синкумар та антиатеросклеротичний препарат аторвастатин. Формували також групи тварин: інтактну, контрольну (по 9 щурів) (введення суміші холестерол-ергокальциферол без додання препаратів) та групи тварин, яким вводили еталонні препарати – аторвастатин

(по 8 тварин) в дозі 20 мг/кг, ацетилсаліцилової кислоти в дозі 50 мг/кг, пентоксифілін в дозі 7,1 мг/кг, синкумар в дозі 0,28 мг/кг, сполуку 25 вводили в дозі 57 мг/кг згідно з LD₅₀ [4]. Антиагрегантний стан при експериментальній гіперліпідемії оцінювали за такими показниками: час агрегації в секундах, швидкість агрегації у %/хв, ступінь агрегації у % (за допомогою агрегометра) [6], проводячи гемолізат-агрегаційний тест, ми визначали індекс активації тромбоцитів (ІАТ), що характеризує міру активації тромбоцитів [1]. Для оцінки стану коагуляційного гемостазу були обрані показники гемостазиограми, що відображають найбільш суттєво стан антикоагулянтної системи: автокоагуляційний тест (АКТ) у %, фібринолітична активність (ФА) у %, антитромбін ІІІ (АТ ІІІ) у %, протромбіновий індекс (ПТІ) у %, кількість фібриногену за Рутберг у г/л [6].

Агрегатограми досліджували на агрегометрі "СОЛАР", який призначений для дослідження агрегації тромбоцитів турбідиметричним методом шляхом безперервного виміру змін коефіцієнта світлопропускання досліджуваного розчину. В основу принципу роботи агрегометра покладено метод Берн (метод світлопропускання) [3].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В результаті дослідження стану судинно-тромбоцитарного гемостазу було виявлено (табл. 1), що при експериментальній гіперліпідемії спосте-

рігалось значне збільшення індексу активації тромбоцитів (на 163,6 %) і міри агрегації (на 24,1 %). При цьому час агрегації трохи скорочувався (на 4,2 %), а швидкість агрегації знижувалася (на 12,5 %). Разом із тим, стан вторинного коагуляційного гемостазу супроводжувався (табл. 2) збільшенням протромбінового індексу на 18,20 %. При цьому спостерігалася також зміна системи фібринолізу. Так, мали місце підвищення рівня автокоагуляційного тесту на 16,8 %, зниження фібринолітичної активності на 13,8 %, незначне збільшення вмісту антитромбіну ІІІ, що відображало коагуляційну активність, на 8,96 %. Звертало на себе увагу також помірне зростання рівня фібриногену на 20,09 %.

У результаті проведеного дослідження (табл. 1) найбільш суттєво індекс активації тромбоцитів знижувався при введенні ацетилсаліцилової кислоти і досліджуваної сполуки 25 (на 55,94 і 46,37 % відповідно). Помірне зменшення цього показника спостерігалось при застосуванні синкумару (на 35,64 %) та пентоксифіліну (на 30,27 %).

Таким чином, оцінюючи первинний судинно-тромбоцитарний гемостаз за рівнем автокоагуляційного тесту, що відображає динаміку активації тромбопластин-тромбінової активності в досліджуваній крові, а також характеризує зовнішній механізм утворення активної протромбінази, можемо констатувати, що досліджувана сполука 25 незначно поступала-

Таблиця 1 – **Зміна антиагрегантного стану крові щурів під впливом сполуки 25 при експериментальній гіперліпідемії**

Сполука, препарат, група	Час агрегації, с	Швидкість агрегації, %/хв	Ступінь агрегації, %	Індекс активації тромбоцитів, ум. од.
Інтактна (n=9)	462,4±5,17	44,8±3,93	73,5±4,56	0,99±0,03
Контрольна (n=9)	443,0±10,1 p ₁ <0,05 -4,2	39,2±4,02 p ₁ >0,05 -12,5	91,2±3,93 p ₁ <0,05 +24,1	2,61±0,33 p ₁ <0,05 +163,6%
Аторвастатин (n=8)	445,2±5,75 p ₂ >0,05 +0,5	37,4±3,02 p ₂ <0,05 -4,6	91,0±4,16 p ₂ >0,05 -0,2	2,76±0,28 p ₂ >0,05 +5,74
Ацетилсаліцилова кислота (n=8)	484,0±6,14 p ₂ <0,05 +9,2	42,2±4,46 p ₂ >0,05 +7,6	76,8±6,13 p ₂ <0,05 -16,0	1,15±0,23 p ₂ >0,05 -55,94
Пентоксифілін (n=8)	431,5±8,67 p ₂ <0,05 -2,6	34,4±4,50 p ₂ >0,05 -12,2	91,0±4,80 p ₂ <0,05 -0,2	1,82±0,15 p ₂ <0,05 -30,27
Синкумар (n=8)	663,2±16,50 p ₂ >0,05 +49,7	19,4±3,33 p ₂ <0,05 -50,5	42,0±4,46 p ₂ <0,05 -54,0	1,68±0,21 p ₂ >0,05 -35,64
Сполука 25 (n=8)	497,4±6,61 p ₂ <0,05 +12,3	46,0±4,33 p ₂ <0,05 +17,3	75,4±6,70 p ₂ <0,05 -17,3	1,40±0,17 p ₂ >0,05 -46,37

Примітка. p₁ – достовірність відносно контрольної групи до інтактної; p₂ – достовірність відносно контрольної групи до дослідної.

Таблиця 2 – Зміна показників гемостазиограми крові щурів під впливом сполуки 25 при експериментальній гіперліпідемії

Сполука, препарат, група	АКТ, %	ФА, %	АТ III, %	ПТІ, %	Фібриноген, г/л
Інтактна	83,2±4,74	16,0±0,61	87,0±6,80	84,6±5,30	4,33±0,33
Контрольна	97,2±5,97 +16,8	13,8±0,88 -13,8	94,8±6,55 +8,96	100,0±5,20 +18,20	5,20±0,26 +20,09
Аторвастатин	95,5±6,54 p<0,01 -1,8	13,8±0,73 p<0,01 ±0	93,4±5,53 p<0,01 -1,5	97,1±5,33 p>0,05 -2,90	5,00±0,28 p<0,01 -3,8
Аспірин	87,0±5,70 p>0,05 -10,5	7,7±0,95 p<0,01 -44,2	57,0±6,30 p<0,01 -39,9	86,1±4,40 p<0,01 -13,90	3,90±0,30 p<0,01 -25,0
Пентоксифілін	96,0±6,28 p<0,01 -1,2	12,9±0,90 p<0,01 -6,5	88,2±5,74 p>0,05 -6,9	92,8±7,36 p>0,05 -7,2	4,37±0,40 p<0,01 -16,0
Синкумар	73,0±4,40 p>0,05 -25,0	5,5±0,81 p<0,01 -60,0	53,2±5,90 p<0,01 -43,9	72,4±5,50 p<0,01 -27,6	3,06±0,28 p<0,01 -41,1
Сполука 25	80,0±4,81 p<0,05 -17,7	8,4±0,23 p<0,01 -39,1	73,0±9,06 p<0,05 -23,0	79,8±4,36 p<0,05 -20,2	4,24±0,41 p<0,01 -18,4

ся ацетилсаліцилової кислоти та перевищувала таку дію пентоксифіліну і синкумару.

Досліджувана речовина 7-(2'-гідрокси-3'-ізопропокси)пропіл-3-метил-8-(4'-фенілпіперазин-1'-іл)-ксантин помірно знижувала ступінь агрегації на 17,3 %, але при цьому підвищувала швидкість агрегації на 17,3 %. Час агрегації ця сполука подовжувала на 12,3 %.

Ступінь агрегації препарати порівняння – синкумар і ацетилсаліцилова кислота знижували, відповідно, на 54,0 і 16,0 %. Ці ж препарати зменшували швидкість агрегації на 50,5 і 12,2 % відповідно. Час агрегації подовжувався на 49,7 і 9,25 % відповідно при введенні синкумару й ацетилсаліцилової кислоти. Еталонний антиатеросклеротичний препарат аторвастатин проявляв індиферентні властивості відносно первинного судинно-тромбоцитарного гемостазу.

При аналізі вторинного коагуляційного гемостазу (табл. 2) найбільш значно рівень автокоагуляційного тесту знижувався при введенні щурам синкумару (на 25,0 %), помірно – сполуки 25 (на 17,7 %) та ацетилсаліцилової кислоти (на 10,5 %). Синкумар також найбільш виражено (на 41,1 %) знижував рівень фібри-

ногену, а сполука 25, пентоксифілін та ацетилсаліцилова кислота – помірно (на 18,4, 16,0 і 25,0 % відповідно).

Протромбіновий індекс найбільш істотно зменшувався при введенні синкумару і сполуки 25 (на 27,6 і 0,2 % відповідно). Ацетилсаліцилова кислота цей показник знижувала на 13,9 %. Звертав на себе увагу факт зниження фібринолітичної активності при введенні синкумару, сполуки 25 і ацетилсаліцилової кислоти (на 60,0, 39,1 і 44,2 % відповідно), а також антитромбіну III цими ж засобами (на 43,9, 23,0 і 39,9 % відповідно).

ВИСНОВКИ. 1. Досліджувана сполука 25 має антиагрегантну дію, знижуючи виразно індекс активації тромбоцитів, ступінь агрегації та збільшуючи час агрегації.

2. Антикоагулянтний ефект цієї сполуки проявляється за рахунок зниження рівня автокоагуляційного тесту, протромбінового індексу та фібриногену.

3. Досліджувана сполука 25 за рядом показників не поступається препаратам порівняння – синкумару, ацетилсаліцилової кислоті та пентоксифіліну.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Баркаган Л. З. Гемолизат агрегационный тест / Л. З. Баркаган, Б. Ф. Архипов, В. М. Кучерский // Лаб. дело. – 1986. – № 3. – С. 138–143.

2. Климов А. Н. Липиды, липопротеиды и атеросклероз / А. Н. Климов, Н. Г. Никульчева. – СПб. : Питер Пресс, 1995. – 297 с.

3. Методические рекомендации по работе в области исследования агрегационной функции тромбоцитов. – Харьков, 2003.

4. Синтез и гиполипидемическая активность 7,8-дизамещенных 3-метилксантина / Н. И. Романенко, Б. А. Приймак, В. С. Якушев [и др.] // Запорож. мед. журн. – 2004. – № 3 (24). – С. 127–129.

5. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження

лікарських засобів / О. В. Стефанов. – К. : Авіцена, 2001. – 521 с.

6. Baugman D. G. Methods Enzymol / D. G. Baugman – 1970. – № 19. – P. 145–1581.

7. Yousufzai S. Y. K. 3-Hydroxy-3-Methylglutaric Acid and Experimental Atherosclerosis in Rats / S. Y. K. Yousufzai, M. Siddiqi // Experientia. – 1976. – **32**, № 8. – P. 1033–1034.

И. М. Белай, А. А. Остапенко, Н. И. Романенко
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИЗУЧЕНИЕ АНТИАГРЕГАНТНОЙ И АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТИ 7-(2'-ГИДРОКСИ-3'-ИЗОПРОПОКСИ)ПРОПИЛ-3-МЕТИЛ-8-(4'-ФЕНИЛПИПЕРАЗИН-1'-ИЛ)-КСАНТИНА У КРЫС НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРЛИПИДЕМИИ

Резюме

Проведено исследование антиагрегантной и антикоагулянтной активности соединения 7-(2'-гидрокси-3'-изопропокси)пропил-3-метил-8-(4'-фенилпиперазин-1'-ил)-ксантина при гиперлипидемии. Это соединение влияет на первое и второе звенья гемостаза. В частности, антиагрегантная активность проявлялась за счет снижения индекса активации тромбоцитов, степени агрегации и увеличения времени агрегации, антикоагулянтное действие – за счет снижения аутокоагуляционного теста, протромбинового индекса и фибриногена. Причем по ряду показателей соединения 25 не уступало препаратам сравнения – синкумару, ацетилсалициловой кислоте и пентоксифиллину.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: соединение 7-(2'-гидрокси-3'-изопропокси)пропил-3-метил-8-(4'-фенилпиперазин-1'-ил)-ксантин, антиагрегантная и антикоагулянтная активность.

I. M. Bilay, A. O. Ostapenko, M. I. Romanenko
ZAPORIZHIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

STUDY OF THE ANTIADGESION AND ANTICOAGULATION ACTIVITY OF 7-(2'-HYDROXY-3'-ISOPROPOXY) PROPYL-3-METHYL-8-(4'-FENILPIPERAZIN-1'-YL)-XANTHINE IN RATS ON THE BACKGROUND OF THE EXPERIMENTAL HYPERLIPIDEMY

Summary

In the work the study of antiplatelet and anticoagulant activity of compound 7-(2'-hydroxy-3'-isopropoxy) propyl-3-methyl-8-(4'-fenilpiperazin-1'-yl)-xanthine at hyperlipidemia has been conducted. This compound affects the first and second hemostasis. In particular, antiplatelet activity has been shown by reducing the index of platelet activation, aggregation degree and the increase of time aggregation. Anticoagulant effect has been manifested by reducing of autocoagulation test, prothrombin index and fibrinogen. Moreover, a number of indicators compound 25 is not inferior to comparator products sinkumar, acetylsalicylic acid and pentoxifylline.

KEY WORDS: compound 7-(2'-hydroxy-3'-isopropoxy)propyl-3-methyl-8-(4'-fenilpiperazin-1'-yl)-xanthine, antiplatelet and anticoagulant activity.

Отримано 25.05.11

Адреса для листування: А. О. Остапенко, вул. Бородинська, 7, кв. 18, Запоріжжя, 69096, Україна.

ОЦІНКА МУТАГЕННОЇ АКТИВНОСТІ УРОКСАЛІНУ В КУЛЬТУРІ ЛІМФОЦИТІВ ЛЮДИНИ

Досліджено мутагенну активність нової субстанції – амідованого похідного (2-оксоіндолініліден-3) карбонових кислот з умовною назвою уроксалін, якому властива анаболічна активність. Тестування проводили в культурі лімфоцитів людини при дослідженнях in vitro. Отримані результати свідчать про те, що уроксалін не є мутагеном, не викликає індукції генних мутацій та хромосомних аберацій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: мутагенна активність, лімфоцити людини, хромосомні аберації, уроксалін.

ВСТУП. Перед тим як рекомендувати новий препарат для клінічних випробувань, обов'язковим є проведення доклінічного дослідження, при якому вивчають вплив субстанції на органи та системи організму, включаючи тести на гонадо- та ембріотоксичність, а також мутагенез. У Національному фармацевтичному університеті було синтезовано нові похідні (2-оксоіндолініліден-3) карбонових кислот. На різних експериментальних моделях білкового голодування встановлено анаболічний ефект уроксаліну, що стало основою подальшого вивчення його безпеки для живого організму [1–3].

Фармацевтична промисловість, на думку багатьох спеціалістів, є одним із головних факторів підвищення мутагенезу в людини [4]. При оцінці мутагенної активності мутагенезу має значення вибір тест-об'єкта. Багато експериментальних даних вказує на те, що мутагени (канцерогени) здатні метаболізуватися в клітинах, які культивуються поза організмом. У зв'язку з цим, культура лімфоцитів периферичної крові людини є зручним тест-об'єктом, оскільки дає можливість оцінювати дію речовин, що впливають на генетичний апарат людини [5].

Метою даної роботи було вивчити здатність нового похідного (2-оксоіндолініліден-3) карбонових кислот – уроксаліну індукувати мутагенну активність в культурі лімфоцитів у дослідках in vitro.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для вивчення здатності субстанції викликати пошкодження © М. О. Алексєєва, А. І. Березнякова, 2011.

хромосом оцінювали їх цитогенетичну активність в культурі лімфоцитів периферичної крові людини в дослідках in vitro. Для постановки культури використовували метод Хангерфорда з деякими модифікаціями [6]. Культурне середовище складалося з таких компонентів, як: середовище 199 – 75 % об'єму, сироватка великої рогатої худоби – 15 %, цільна кров – до 10 %, фітогемаглютинін вводили з розрахунку 0,2 мл на 10 мл культурного середовища. Досліджувану субстанцію вводили в культуру на 48-й годині культивування. Інкубацію без відмивання проводили до кінця культивування. Уроксалін розчиняли в стерильній воді. Терапевтичну дозу, розраховану на 1 кг середньої маси людини, приймали за концентрацію препарату на 1 л культурального середовища. Наступні концентрації субстанції були вищими в 10 чи 100 разів. Фіксація культури проходила на 72-й годині культивування. За 2,5–3 год до фіксації вводили колхіцин з метою зупинки ділення лімфоцитів на стадії метафази і скупчення метафазних пластинок. Для роз'єднання хромосомного набору використовували гіпертонічний розчин KCl (0,55 % розчин). Фіксатором слугували льодяна оцтова кислота та метиловий спирт (1:3). Зміну фіксатора проводили 2–3 рази. Готували висушені над спиртівкою препарати хромосом. Для рівномірного забарвлення використовували основні барвники азур та еозин. Отримані препарати хромосом аналізували на мікроскопі МБІ. Для аналізу вибирали метафазні пластинки круглої чи овальної форми з рівномірним розміщенням хромосом, в яких

міститься від 44 до 47 хромосом. На кожен концентрацію субстанції аналізували від 50 до 100 метафаз. Відмічали такі види аберацій: одиночні й парні фрагменти, хроматидні обміни, дицентричні хромосоми, кільця, атипичні хромосоми. Прогалини в якості аберацій не відмічали і реєстрували окремо [7].

Про ступінь мутагенного ефекту досліджуваної субстанції судили за підвищенням спонтанного рівня частоти аберацій хромосом в 2,5

і більше разів. Для оцінки статистичної значущості порівнюваних значень у дослідній і контрольній групах використовували критерій χ^2 -квадрат.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати оцінювання цитогенетичної активності уроксалину – нового амідованого похідного карбонових кислот в культурі лімфоцитів периферичної крові людини наведено в таблицях 1, 2.

Таблиця 1 – Вплив уроксалину на частоту хромосомних аберацій у культурі лімфоцитів периферичної крові людини в дозі 10,7 мг/кг

Варіант дослідів	Проаналізовано метафаз	Кількість клітин з абераціями	Кількість хромосомних аберацій, % (M±m)	Кількість хромосомних аберацій на 1 кл.	Тип аберацій	
					одиночні фрагменти (M±m)	парні фрагменти (M±m)
Контроль	300	5	1,66±0,33	0,016	1,33±0,36	0,33
Дослід	300	4	1,33±0,35	0,013	1,33±0,3	–

Таблиця 2 – Вплив уроксалину на частоту хромосомних аберацій у культурі лімфоцитів периферичної крові людини в дозі, збільшеній в 10 разів

Варіант дослідів	Проаналізовано метафаз	Кількість клітин з абераціями	Кількість хромосомних аберацій, % (M±m)	Кількість хромосомних аберацій на 1 кл.	Тип аберацій	
					одиночні фрагменти (M±m)	парні фрагменти (M±m)
Контроль	300	5	1,66±0,33	0,016	1,33±0,36	0,33
Дослід	300	6	2,00±0,67	0,02	2,00±0,68	–

Цитогенетичний аналіз 300 контрольних метафазних пластин дозволив виявити (1,66±0,33) та (1,66±0,35) % абераційних метафаз.

Спектр хромосомних аберацій у контролі був представлений одиночними та парними (0,33 %) фрагментами. Аберацій обмінного типу та дицентричних хромосом не виявлено.

Цитогенетичний аналіз 300 метафазних пластин, отриманих при дії уроксалину в дозі 10,7 мг/кг та дозі, збільшеній у 10 разів, дав змогу виявити (1,33±0,35) та (2,00±0,67) % абераційних метафаз. Типи аберацій були представлені одиночними (1,33 і 2,00 %) та парни-

ми (0,33 і 0,33 %) фрагментами. Порівняння отриманих результатів у дослідній та контрольній групах не виявило статистично значущих відмінностей (χ^2 -квадрат=0,112; $p>0,05$ і 0,092).

ВИСНОВКИ. 1. Уроксалин – новий амідований похідний (2-оксоіндолініліден-3) карбонових кислот – є перспективною субстанцією, оскільки не проявляє мутагенної активності в терапевтичних дозах і в дозах, збільшених у 10 разів.

2. Після завершення доклінічних досліджень уроксалин може бути рекомендований для клінічних випробувань.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дурнев А. Д. Мутагены – скрининг и фармакологическая профилактика воздействия / А. Д. Дурнев, С. Б. Середин. – М. : Медицина, 1998. – 397 с.
2. Дурнев А. Д. Общие вопросы изучения мутагенных свойств лекарственных средств / А. Д. Дурнев, Г. М. Волгарев, С. Б. Середин // Экспер. и клин. фармакол. – 1998. – № 2. – С. 4–12.

3. Оцінка мутагенних властивостей нових лікарських засобів. Доклінічні іспити лікарських засобів : метод. рекомендації / [І. Р. Бариліак, Л. В. Неумержицька, О. М. Дуган та ін.]. – К. : ФКМЗ України, 2000. – С. 166–186.

4. Сернов Л. Н. Элементы экспериментальной фармакологии / Л. Н. Сернов, В. В. Гацура. – М. :

Медицина, 2000. – 170 с.

5. Стефанов О. В. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рекомендації / О. В. Стефанов. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.

6. Hungerford D. A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of meta-

phase chromosomes by treatment with hypotonic KCl / D. A. Hungerford // Stain Techn. – 1995. – **40**. – P. 333–338.

7. Mutagenicity of antibiotics in microbes assay problems of evaluation / Mitchell I de G., P. A. Dixon, P. L. Gielbert, D. J. White // Mutat. Res. – 1988. – **79** (2). – P. 91–105.

М. О. Алексеева, А. И. Березнякова

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ОЦЕНКА МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ УРОКСАЛИНА В КУЛЬТУРЕ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА

Резюме

Исследована мутагенная активность новой субстанции – амидированного производного (2-оксоиндолинлиден-3) карбоновых кислот с условным названием уроксалин, которому свойственна анаболическая активность. Тестирование проводили в культуре лимфоцитов человека при исследованиях *in vitro*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что уроксалин не является мутагеном, не вызывает индукции генных мутаций и хромосомных aberrаций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мутагенная активность, лимфоциты человека, хромосомные aberrации, уроксалин.

M. O. Aleksieyeva, A. I. Bereznyakova

NATIONAL PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, KHARKIV

EVALUATION OF MUTAGENIC ACTIVITY OF UROKSALIN IN CULTURE OF HUMAN LYMPHOCYTES

Summary

It was investigated the mutagenic activity of a new substance – the amidation derivative (2-oxoindoliniliden-3) carboxylic acids with the provisional name uroksalin, which is characterized by anabolic activity. Testing was performed in a culture of human lymphocytes in studies *in vitro*. These results indicate that uroksalin is not a mutagen, does not cause induction of gene mutations and chromosomal aberrations.

KEY WORDS: mutagenic activity of human lymphocytes, chromosome aberrations, uroksalin.

Отримано 13.05.11

Адреса для листування: М. О. Алексеева, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, Харків, 61210, Україна.

СТРУКТУРА ЗВ'ЯЗАНОЇ ВОДИ В СКЛОПОДІБНОМУ ТІЛІ ЗА ДАНИМИ
¹H ЯМР-СПЕКТРОСКОПІЇ

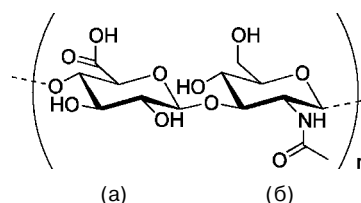
Методом низькотемпературної ¹H ЯМР-спектроскопії вивчено гідратацію склоподібного тіла великої рогатої худоби. Виявлено, що більша частина води може розглядатися як зв'язана. Незамерзаюча вода не є гомогенною, а існує у вигляді кластерів, розмір яких становить 0,9–50 нм. Її середня асоційованість (участь протонів у формуванні водневих зв'язків) перебуває в діапазоні 1,3–1,75 протона від кожної молекули води.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: склоподібне тіло, зв'язана вода, ¹H ЯМР-спектроскопія, гіалуронова кислота, кластери.

ВСТУП. Середовищем для деяких тканин організму є біологічні рідини, до складу яких входять біополімери білкової та полісахаридної природи. Завдяки високим гідратаційним властивостям біополімерні молекули здатні формувати гелеподібні структури, навіть коли їх концентрація в середовищі вимірюється лише кількома процентами. Тобто біологічні рідини можна розглядати як колігативну систему, властивості якої визначаються міжмолекулярними взаємодіями води з її біополімерною складовою. Супрамолекулярна структура біологічних рідин забезпечує можливість існування багатьох видів клітин, створюючи умови для їх розвитку та процесів метаболізму. Одним з різновидів гелеподібних біологічних рідин є склоподібне тіло, яке також можна віднести до особливого типу сполучної тканини. Склоподібне тіло займає близько 4/5 об'єму очного яблука, надає йому форму, забезпечує тургор (внутрішній тиск) і нестисливість. На 99 % склоподібне тіло складається з води, зв'язаної з молекулами протеогліканів і глікозаміногліканів, які представлені в основному гіалуроновою кислотою [2, 8].

Гіалуронова кислота належить до несольфонованих глікозаміногліканів і входить до складу сполучної, епітеліальної і нервової тканин, а також є одним з головних компонентів позаклітинного матриксу. Вона міститься у багатьох біологічних рідинах (слині, синовіальній рідині, слизових оболонках шлунково-кишкового тракту), відіграє важливу роль у проліфе-

рації та міграції клітин. У тілі людини масою 70 кг у середньому міститься близько 15 г гіалуронової кислоти, третина з якої відновлюється протягом доби. Гіалуронова кислота склоподібного тіла є полімерною сполукою, молекулярна маса якої дорівнює 33–61 кДа [2], а елементарна ланка складається з D-глюкуронової кислоти (а) та N-ацетилглюкозаміну (б) і може бути представлена у такий спосіб:



Вже перші досліді, виконані методом ЯМР-спектроскопії [6], показали, що склоподібне тіло містить значну кількість зв'язаної води, тобто такої води, яка замерзає при температурі, значно нижчій 273 К. В останні роки на основі методу низькотемпературної ¹H ЯМР-спектроскопії було розроблено ефективні способи вимірювання структурних і термодинамічних характеристик міжфазної води в гелях, твердих біологічних об'єктах і гідратованих твердих тілах з розвиненою поверхнею [3, 10, 11].

Оскільки на даний час медичні препарати, виготовлені на основі склоподібного тіла, активно використовують як біогенні стимулятори, а саме склоподібне тіло може слугувати моделлю для дослідження взаємодії нанорозмірних частинок ентеросорбентів зі слизовими секретами організму, метою роботи було вивчити параметри гідратної оболонки біопо-

лімерних складових склоподібного тіла, а також будову кластерів води, які формуються на міжфазних межах у процесі заморожування-відтавання.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Як об'єкт дослідження використовували склоподібне тіло великої рогатої худоби (виробництво Республіки Білорусь) з вмістом води 99,0–99,5 %, що було встановлено методом висушування при 105 °С до постійної маси. Свіжовиділений біоматеріал зберігали в холодильнику при температурі мінус 20 °С. Перед вимірюванням його розморожували і поміщали у 5 мм ампулу ЯМР.

Спектри ЯМР отримували на ЯМР-спектрометрі високої розподільчої здатності (Varian “Mercury”) з робочою частотою 400 МГц. Використовували 90° зонduючий імпульс тривалістю 3 мкс. Температуру в датчику регулювали за допомогою термоприставки Bruker VT-1000 з точністю ±1 град. Інтенсивність сигналів визначали шляхом вимірювання площі піків з використанням процедури розкладання сигналу на його складові у припущенні гаусівської форми лінії, оптимізації нульової лінії і фази з точністю, яка для добре розділених сигналів була не нижчою 5 %, а для сигналів, що перекриваються, – ±10 %. Для запобігання переохолодженню води в досліджуваних об'єктах вимірювання концентрації незамерзаючої води проводили при нагріванні зразків, попередньо охолоджених до температури 210 К. Концентрацію незамерзаючої води у зразках обчислювали шляхом порівняння інтенсивності сигналу води у зразках до і після їх заморожування. Методику ЯМР-вимірювань, визначення термодинамічних характеристик і розрахунку радіуса кластерів міжфазної води детально описано в роботах [3, 10, 11].

При аналізі міжфазних явищ для вивчення процесів, що проходять на межі розділу фаз тверде тіло-рідина-пара, використовують два основних підходи – метод надлишкових величин Гіббса і метод шару кінцевої товщини [5]. Відповідно до першого з цих підходів, припускають, що весь надлишок енергії, зумовлений формуванням межі розділу фаз, зосереджений у нескінченно тонкому поверхневому шарі, тоді як термодинамічні параметри решти рідини не відрізняються від об'ємних. При цьому для визначення геометричних розмірів нанорозмірних агрегатів рідини, обмежених твердою поверхнею, можна використати рівняння Гіббса–Томсона, що зв'яже радіус сферичного або циліндричного водного кластера (R) з величиною депресії температури замерзання:

$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl}T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R}, \quad (1)$$

де $T_m(R)$ – температура плавлення льоду, що локалізований у порах радіуса R; $T_{m,\infty}$ – температура плавлення об'ємного льоду; ρ – густина твердої фази; σ_{sl} – енергія взаємодії твердого тіла з рідиною; ΔH_f – об'ємна ентальпія плавлення. Це рівняння може бути використане для обчислення розподілу пор за розмірами з температурної залежності концентрації незамерзаючої води $C_{uw}(T)$, отриманої на основі методу ^1H ЯМР-спектроскопії з пошаровим заморожуванням води, для суспензій твердих тіл або гідратованих біологічних об'єктів, якщо застосування інших методів аналізу пористої структури є неможливим [3]. На практиці рівняння (1) можна застосовувати у вигляді $\Delta T_m = (k/R)$, де константа k для багатьох гетерогенних систем, що містять воду, близька до 50 [3, 9].

У методі шару кінцевої товщини [5] припускають, що вплив поверхні межі розділу фаз поширюється на кілька молекулярних шарів вглиб рідкої фази. Тоді процес замерзання (відтавання) міжфазної води, локалізованої у твердій пористій матриці, проходить відповідно до змін вільної енергії Гіббса, зумовлених впливом поверхні. Цей вплив тим менший, чим далі від поверхні досліджуваний шар води. При $T=273$ К замерзає вода, властивості якої не відрізняються від об'ємних, а з поступовим зниженням температури (без урахування ефекту переохолодження) замерзають шари води, які ближче розташовані до поверхні, причому для міжфазної води справедливе співвідношення:

$$\Delta G_{ice} = -0,036(273,15 - T), \quad (2)$$

де чисельний коефіцієнт являє собою параметр, пов'язаний з температурним коефіцієнтом зміни вільної енергії Гіббса для льоду [4]. За величиною інтенсивності сигналу визначають температурну залежність $C_{uw}(T)$ відповідно до методики, детально описаної в роботах [3, 10, 11], а далі обчислюють кількість сильно- і слабозв'язаної води, а також термодинамічні характеристики цих шарів.

Міжфазну енергію біополімерної складової склоподібного тіла визначали як модуль сумарного зниження вільної енергії води, що зумовлено наявністю межі розділу фаз [3], за формулою:

$$\gamma_s = -K \int_0^{C_{uw}^{max}} \Delta G(C_{uw}) dC_{uw}, \quad (3)$$

де C_{uw}^{max} – загальна кількість незамерзаючої води при $T=273$ К.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На рисунку 1, а наведено одержані при різній температурі спектри ^1H ЯМР-зразка склоподібного тіла в процесі підвищення температури від 210 до 280 K. У незамерзломому стані спектр складається з одного сигналу, хімічний зсув якого ($\delta_{\text{H}}=4,8$ м.ч.) близький до хімічного зсуву рідкої води. При заморожуванні інтенсивність сигналу води швидко зменшується зі зниженням температури, отже, спектри не можуть бути записані при постійній чутливості приладу. Крім того, вид спектрів ускладнюється, на них з'являється один або кілька сигналів, зміщених до більших величин δ_{H} (рис. 1, а).

Вода є сильноасоційованою рідиною [1, 7], тому хімічний зсув її протонів визначається здатністю води формувати поліасоціати, впорядковані сіткою водневих зв'язків. Граничними станами для молекул води можна вважати мономер і тетракоординовану воду, що входить до складу льодоподібних структур. У першому випадку жоден з протонів води не бере участі в утворенні водневозв'язаних комплексів, а в другому такий комплекс формує

кожен протон. При цьому слід враховувати, що одночасно з участю молекули води в асоціативних взаємодіях як протонодонора інша молекула виступає електронодонором, і загальна кількість водневих зв'язків у льоду (або льодоподібних структурах), що припадають на кожен протон, дорівнює чотирьом. Проте основним чинником, що впливає на сумарну величину хімічного зсуву води, є середнє число зв'язаних протонів (n) [12]. Саме його можна вводити як параметр асоційованості. Відповідно до результатів експериментальних визначень величин хімічного зсуву різних форм води, узагальнених в роботі [3], можна вважати, що мономерні молекули води мають хімічний зсув протонів, близький до 1 м.ч., а у складі льоду – 7 м.ч. У цьому наближенні кожному значенню хімічного зсуву води буде відповідати певне значення n . Опрацьовані таким чином спектри незамерзаючої води для склоподібного тіла наведено на рисунку 1, б.

З даних рисунка 1, б випливає, що для повністю відталого зразка $n=1,3$. Зі зменшенням частки незамерзаючої води величина n

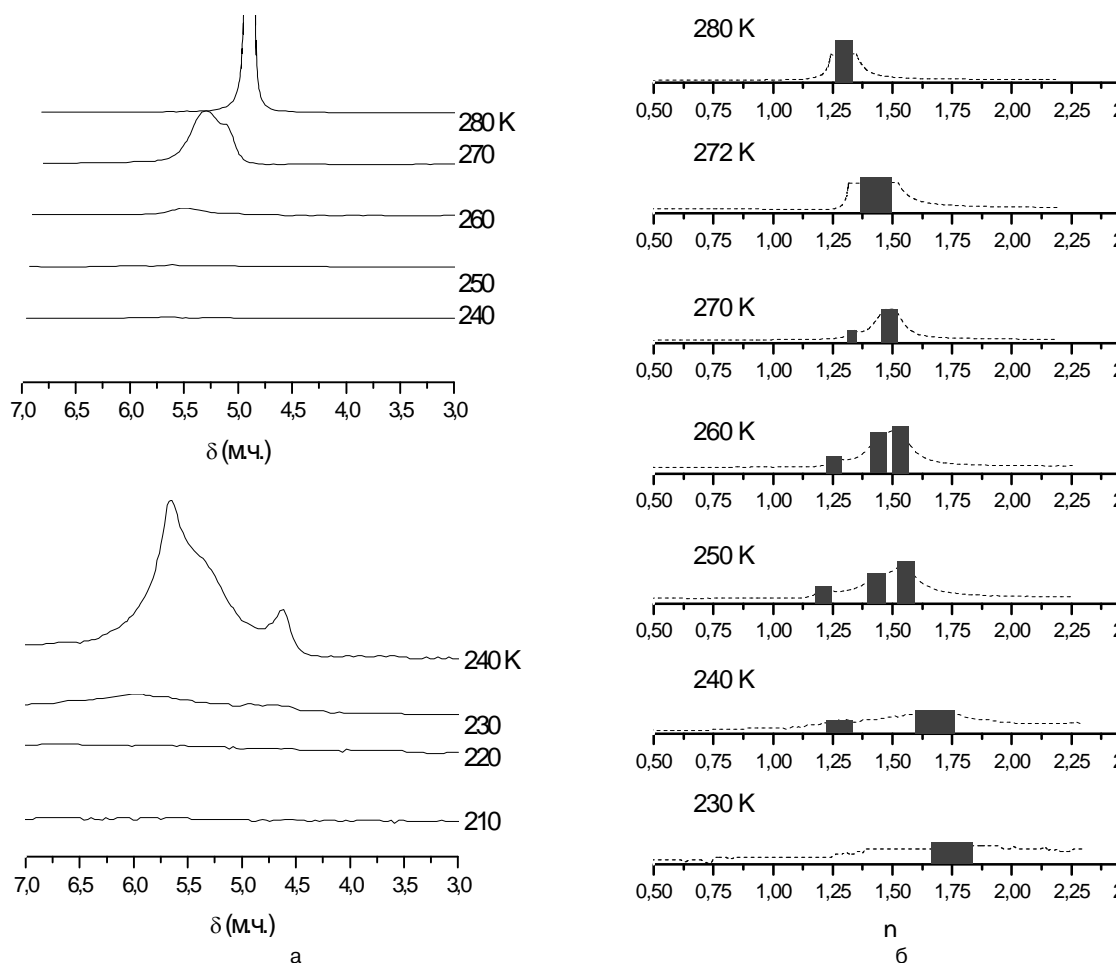


Рис. 1. Спектри ^1H ЯМР води у замороженому зразку склоподібного тіла при різних температурах (а) та її асоційованість (б).

зростає до 1,75 при 230 К. Слід зазначити, що зі зниженням температури завдяки вимерзанню води збільшується частка води, яка безпосередньо бере участь у взаємодіях з молекулами біополімерів.

На рисунку 2, а показано температурну залежність концентрації незамерзаючої води, розраховану за відповідними величинами інтенсивності сигналу води в спектрах ^1H ЯМР. Оскільки в температурному інтервалі $260 < T < 273$ К інтенсивність сигналу зростає дуже швидко, на кривій $C_{\text{uw}}(T)$, крім реально отриманих експериментальних точок (відзначених кружками), з інтервалом 2 град. проставлено віртуальні точки (відмічені квадратами). Віртуальні точки було введено з метою більш наочної візуалізації розподілів за радіусами й енергіями для кластерів міжфазної води, розрахованих згідно з рівняннями (1) і (2) (рис. 2, в і рис 2, б відповідно).

На залежності $C_{\text{uw}}(T)$ спостерігаються дві ділянки – швидкої і повільної змін з температурою величини C_{uw} . Відповідно до класифікації, наведеної в [3], вони можуть бути віднесені до слабо- і сильнозв'язаної води (WBW і SBW відповідно). Визначити концентрацію сильнозв'язаної води C_{uw}^s можна шляхом екстраполяції відповідної ділянки до 273 К (рис. 2, а). Величина C_{uw}^s виявилася дуже великою – 12 г/г у перерахунку на суху речовину біополімерної складової склоподібного тіла. Оскільки залежність $C_{\text{uw}}(T)$ має плавний характер, практично всю воду, що входить до складу склоподібного тіла, слід вважати зв'язаною, тобто в склоподібному тілі міститься 87 г/г слабозв'язаної води. Слабозв'язана вода входить до складу кластерів, розмір яких перевищує 3 нм (рис. 2, в), а зміна міжфазної енергії Гіббса, що зумовлена взаємодією з межами розділу фаз, менша 0,45 кДж/моль (рис. 2, б). Сильнозв'язана вода утворює досить великі кластери, радіус яких перебуває в діапазоні 0,9–2,2 нм. Міжфазна енергія біополімерної складової склоподібного тіла, яку визначали відповідно до рівняння (3), виявилася дуже великою ($\gamma_s = 1273$ Дж/г), що значно перевищує величини, отримані для водних розчинів білків крові або молекул полісахаридів [3, 11].

ВИСНОВКИ. Практично вся вода, що входить до складу склоподібного тіла, є зв'язаною, причому до сильнозв'язаної можна віднести 13 % загальної кількості води. При заморожуванні у спектрах ^1H ЯМР спостерігаються від 1 до 3 сигналів води з різним ступенем

асоційованості, що відповідає участі у водневих зв'язках в середньому від 1,3 до 1,75 протонів від кожної молекули води. Незамерзаюча вода має вигляд кластерів, розмір яких для сильнозв'язаної води становить 0,9–2,2 нм, а для слабозв'язаної – 2,8–50 нм.

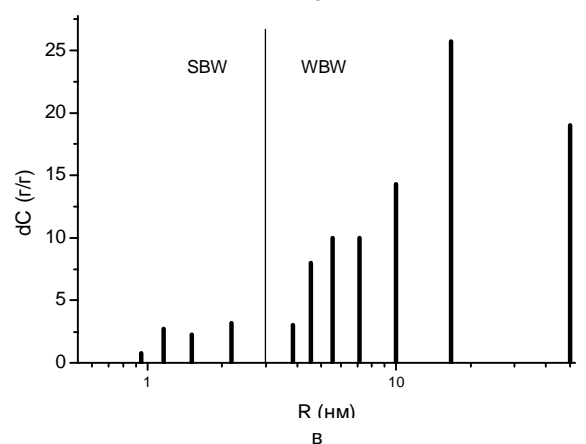
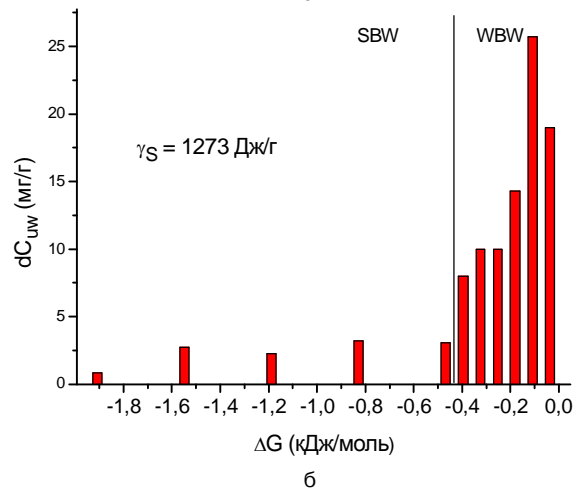
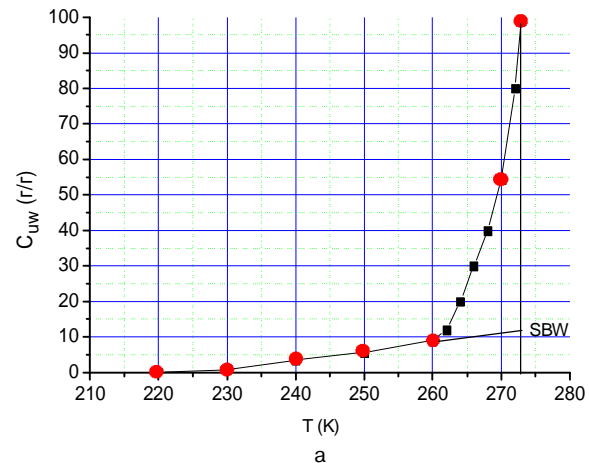


Рис. 2. Температурна залежність концентрації незамерзаючої води (а), розподіл за енергіями (б) і розподіл за радіусами (в) для кластерів води, зв'язаної в склоподібному тілі. SBW – strongly bound water (сильнозв'язана вода), WBW – weakly bound water (слабозв'язана вода).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антонченко В. Я. Основы физики воды / В. Я. Антонченко, А. С. Давыдов, В. В. Ильин. – К. : Наук. думка, 1991. – 668 с.
2. Вит В. В. Строение зрительной системы человека / В. В. Вит. – Одесса : Астропринт, 2003. – 664 с.
3. Гунько В. М. Вода на межфазной границе / В. М. Гунько, В. В. Туров, П. П. Горбик. – К. : Наук. думка, 2009. – 694 с.
4. Термодинамические свойства индивидуальных веществ / под ред. В. П. Глушкова. – М. : Наука, 1978. – 495 с.
5. Фролов Ю. Г. Курс коллоидной химии. Поверхностные явления и дисперсные системы / Ю. Г. Фролов. – М. : Химия, 1982. – 400 с.
6. Чередниченко В. М. Исследование методом ЯМР дегидратации стекловидного тела, вызванной криопротектором ПЭО-400 / В. М. Чередниченко, П. А. Бездетко, В. Д. Зинченко // Криобиология. – 1987. – № 4. – С. 45–46.
7. Эйзенберг Д. Структура и свойства воды / Д. Эйзенберг, В. Кауцман. – Л. : Гидрометеиздат, 1975. – 280 с.
8. Holmes M. W. A. Hyaluronic acid in human articular cartilage. Age-related changes in content and size / M. W. A. Holmes, M. T. Bayliss, H. Muir // Biochem. J. – 1988. – **250**. – P. 435–441.
9. Petrov O. V. NMR cryoporometry: Principles, application and potential / O. V. Petrov, I. Furo // Progr. In NMR. – 2009. – **54**. – P. 97–122.
10. Turov V. V. Application of ^1H NMR Spectroscopy Method for Determination of Characteristics of Thin Layers of Water Adsorbed on the Surface of Dispersed and Porous Adsorbents / V. V. Turov, R. Lebeda // Adv. Colloid. Interf. Sci. – 1999. – **79**, № 2–3. – P. 173–211.
11. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces / V. M. Gun'ko, V. V. Turov, V. M. Bogatyrev [et al.] // Adv. Colloid. Interf. Sci. – 2005. – **118**, № 1–3. – P. 125–172.
12. Yamaguchi Y. Theoretical Prediction of Proton Chemical Shift in Supercritical Water Using Gas-Phase Approximation / Y. Yamaguchi, N. Yasutake, M. Nagaoka // Chem. Phys. Lett. – 2001. – **340**. – P. 129–136.

И. И. Геращенко, А. И. Маркина, В. В. Туров

ИНСТИТУТ ХИМИИ ПОВЕРХНОСТИ ИМЕНИ А. А. ЧУЙКО НАН УКРАИНЫ, КИЕВ

СТРУКТУРА СВЯЗАННОЙ ВОДЫ В СТЕКЛОВИДНОМ ТЕЛЕ ПО ДАННЫМ ^1H ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Резюме

Методом низкотемпературной ^1H ЯМР-спектроскопии изучена гидратация стекловидного тела крупного рогатого скота. Обнаружено, что большая часть воды может рассматриваться как связанная. Незамерзающая вода не гомогенна, а присутствует в виде кластеров, размер которых составляет 0,9–50 нм. Её средняя ассоциированность (участие протонов в формировании водородных связей) находится в диапазоне 1,3–1,75 протона от каждой молекулы воды.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: стекловидное тело, связанная вода, ^1H ЯМР-спектроскопия, гиалуроновая кислота, кластеры.

I. I. Herashchenko, A. I. Markina, V. V. Turov

CHUIKO INSTITUTE OF SURFACE CHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE, KYIV

STRUCTURE OF BOUND WATER IN VITREOUS BODY BY ^1H NMR SPECTROSCOPY

Summary

The hydration of the vitreous body of cattle by low-temperature ^1H NMR spectroscopy was studied. It was found that major part of the water in vitreous body exists in bound state. Non-freezing water is not homogeneous and forms the clusters with a size of 0,9–50 nm. The average associativity of non-freezing water (part of the protons in hydrogen bonds formation) is in a range of 1,3–1,75 of protons from each molecule of water.

KEY WORDS: vitreous body, bound water, ^1H NMR spectroscopy, hyaluronic acid, clusters.

Отримано 25.05.11

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

ДЕСТРУКТИВНА РОЛЬ ЕЛАСАЗИ В ПАТОГЕНЕЗІ ОСТЕОПОРОЗУ ТА ІНГІБІЦІЯ ЇЇ АКТИВНОСТІ ФЛАВОНОЇДАМИ

На підставі результатів 9 експериментальних досліджень на щурах розкрита деструктивна роль еластази кісткової тканини при моделюванні остеопорозу різного генезу, фторидній інтоксикації і старінні тварин. Як інгібітори еластази розглядаються флавоноїди, які різною мірою пригнічують активність цієї сильної деструктивної протеїнази. Проведені дослідження розширюють уявлення про патогенетичну роль еластази і вказують напрям пошуку інгібіторів еластази, зокрема флавоноїдів, для підвищення ефективності профілактики і лікування остеопорозу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: експериментальний остеопороз, еластаза, флавоноїди.

ВСТУП. При розгляді патологічної ролі протеїнази особливу увагу привертає найбільш сильний деструктивний фермент – еластаза (КФ 3.4.21.36 і 37), зростання активності якої в позаклітинному просторі розглядають як основну ланку патогенезу захворювань, пов'язаних з інфільтрацією тканин активованими нейтрофілами [9].

Еластаза руйнує білки плазми і практично всі компоненти сполучної тканини, порушуючи процеси захисту й адаптації організму [2]. Крім того, еластаза шляхом обмеженого протеолізу активує ряд матриксних металопротеїназ, запускаючи каскад деградації структурних білків. Відомо, що ці протеїнази секретуються в латентній проформі й потребують активації для реалізації своєї протеолітичної діяльності. Так, при ревматоїдному запаленні синовіальними фіброblastами секретуються неактивні зимогени колагенази, желатинази і стромелізини, які еластаза перетворює на активні форми [9]. Деструкція органічного матриксу кісткової тканини здійснюється цим же "протеолітичним коктейлем", що діє в різних діапазонах рН, поетапно розщеплює молекули колагену і, можливо, є пусковим у патологічній резорбції кісткової тканини при розвитку остеопорозу [12]. Тому є актуальними дослідження початкових процесів резорбції кісткової тканини і пошук їх ефективних інгібіторів. Проведення цього дослідження зумовлене також значним поширенням остеопорозу

© О. А. Макаренко, 2011.

зу та інших захворювань з ураженням мінералізованих тканин та відсутністю переконливих даних про особливості лікувально-профілактичної дії препаратів флавоноїдів.

Тому метою даної роботи було розкрити деструктивну роль еластази в патологічній резорбції кісткової тканини при розвитку експериментального остеопорозу та дослідити інгібуючий вплив флавоноїдів на цю протеїназу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Проведено 8 експериментів на 180 щурах-самках лінії Вістар, у яких відтворювали остеопороз різного генезу (4 серії оваріоектомії [14], 2 серії – шляхом аліментарного дефіциту кальцію і білка [13], 1 серія – введення преднізолону [5], 1 серія – фторидна інтоксикація [3]), а також досліджували в онтогенезі вікові зміни кісткової тканини в 100 інтактних самців (вік – 6–24 місяці). Після моделювання патології щурів виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом (40 мг/кг) шляхом розтину магістральних судин. Виділяли стегнові кістки: в гомогенатах однієї (75 мг/мл цитратного буфера, рН 6,1) визначали активність еластази по гідролізу N-t-BOC-L-alanin-p-nitrophenyl ester ("Sigma", США) [18], а в другій – щільність кістки за методом, основаним на визначенні маси кістки та її об'єму при зануренні у воду [11].

Для визначення впливу флавоноїдів на еластазу виділяли цей ензим з перитонеального гнійного ексудату методом афінної хроматографії, використовуючи як афінний ліганд

інгібітор Баумана-Бірк з бобів сої [10]. Анти-еластазну активність флавоноїдів *in vitro* визначали за залишковою активністю еластази в реакції гідролізу N-t-BOC-L-alanin-p-nitrophenyl ester ("Sigma", США) [18]. В роботі використовували стандарти флавоноїдів: кверцетин, ціанідин, апігенін, лютеолін, нарингенін, геністеїн, дайдзеїн, гесперетин, рутин, катехін, гесперидин і нарингін ("Sigma", США) та рослинні флавоноїди: байкалін, флаволігнани, софорикозид (ДУ "Державний науковий центр лікарських засобів та медичної продукції", Харків). Концентрат ізофлавононів отримували із соєвого борошна шляхом триразової екстракції етанолом за методом [1]. Препарати флавоноїдів розчиняли в диметилсульфоксиді, а потім у воді в декількох концентраціях, що дозволяли визначити концентрацію речовини, яка викликає 50 % інгібування швидкості реакції (IC_{50}). Значення IC_{50} визначали з використанням рівнянь регресії і програми "MS Excel" та виражали в молях (M).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Про наявність остеодистрофії судили за щільністю стегнової кістки. Визначення цього показника в щурів після моделювання остеопорозу різного генезу або при фторидній інтоксикації показало, що залежно від патогенного чинника, віку тварин і тривалості відтворення моделі щільність стегнової кістки щурів знижувалася на 1,0–10,3 % (табл. 1). Дефіцит аліментарних факторів або оваріоектомія викликали більш суттєве зниження цього показника ($p < 0,001$), ніж преднізолон ($p < 0,05$) або високі дози фтору ($p > 0,4$).

Біохімічні дослідження показали різке підвищення активності кісткової еластази на 20,0–154,0 % при моделюванні патології. Після оваріоектомії в щурів встановлено, що чим більше знижується щільність кістки, тим значніше підвищується активність еластази в кіст-

ковій тканині. Глюкокортикоїдний остеопороз викликав зменшення щільності кістки, яке посилювалося з часом введенням преднізолону. При цьому ступінь підвищення активності кісткової еластази за 30 днів збільшився, потім знижувався, що розглядалось нами як компенсаторна реакція (табл. 1). Дослідження щільності кісток та активності еластази в кістковій тканині здорових щурів в онтогенезі визначило віковий період з максимальною і стабільною щільністю кісток – це 6–18 місяців. З 9-го місяця збільшувалась активність еластази в кістковій тканині, а в 21 місяць – зменшувалась щільність кісток. Отже, початкові вікові зміни в кістковій тканині пов'язані з активацією еластази.

Аналіз отриманих результатів показав, що зниження щільності кістки при експериментальному остеопорозі, фторидній інтоксикації або старінні супроводжується зростанням активності еластази в кістковій тканині. Проведені дослідження дозволяють зробити висновок про те, що еластаза відіграє деструктивну роль при патологічній і віковій резорбції кісткової тканини. Підтвердженням цього є специфічність еластази до колагену I типу, що становить основу білкової матриці кісток. Крім того, еластаза шляхом обмеженого протеолізу активує матриксні металопротеїнази: колагеназу, желатиназу і стромелізін [9], що беруть участь у деградації колагену кісткової тканини [12].

В літературі є поодинокі повідомлення про інгібуючу дію флавоноїдів на активність деяких протеїназ [4, 7, 16]. На підставі цього виникає питання про можливий вплив флавоноїдів на активність еластази, зі зростанням активності якої починається деструкція кісткової тканини. Щоб відповісти на дане питання, а також з метою пошуку ефективних інгібіторів еластази і резорбції кісткової тканини нами була виділена еластаза з гнійного перитонеального ексудату методом афінної хромато-

Таблиця 1 – **Щільність стегнової кістки та активність еластази при моделюванні остеопорозу в щурів**

Патогенний чинник	Тривалість	Зниження щільності кісток, %	Підвищення активності кісткової еластази, %
Оваріоектомія	1 міс.	6,4	68,2
		4,4	63,8
		1,1	40,6
		1,0	33,3
Аліментарний дефіцит	2,5 міс.	5,5	56,5
	4 міс.	10,3	25,9
Преднізолон	15 днів	1,4	20,0
	30 днів	2,3	154,0
	60 днів	6,1	46,9
Фторінтоксикація	1 міс.	1,0	21,9
Вікові зміни	6–24 міс.	1,4	146,4

графії. Вихід ферменту склав 94,3 % зі ступенем очищення в 69,9 раза. В дослідженнях *in vitro* за показником IC_{50} було визначено здатність стандартів і рослинних флавоноїдів інгібувати активність виділеної еластази (табл. 2).

Серед стандартів кверцетин найактивніше інгібував еластазу, незначно поступалися йому ціанідин, апігенін і лютеолін. Інгібіторна активність нарингеніну, геністеїну, дайдзеїну, гесперетину була в 4–6 разів нижчою порівняно з кверцетином. Препарати рутин, катехін і нарингін не впливали на еластазу. Інгібіторна активність рослинних флавоноїдів знижувалася у ряді байкалін > ізофлавоноїди > флаволігнани > софоригозид. Отримані нами результати суттєво розширили перелік флавоноїдів, що інгібують еластазу, який до наших досліджень, за даними I. Dell’Aica et al. [17] і F. Meloni et al. [15], складався з трьох речовин: еріодиктіолу, гіперозиду й епігалокатехінгалату.

При порівнюванні активності досліджених нами флавоноїдів і відомих інгібіторів лейкоцитарної еластази за рівнем IC_{50} важливо відзначити, що інгібуюча здатність найбільш активних інгібіторів еластази (кверцетин, лютеолін, апігенін, ціанідин, байкалін й ізофлавоноїди) приблизно в 60–100 разів нижча, ніж ендogenous α_1 -інгібітора протеїнази, який має вирішальне значення в інактивації еластази при запаленні. Але, з іншого боку, ці флавоноїди володіють вищою активністю, ніж деякі натуральні та синтетичні інгібітори лейкоцитарної еластази. Так, рівень IC_{50} кверцетину в 20 разів нижчий за цей показник в еластиналю, в 25–100 разів менший, ніж у цефалоспоринів, β -лактаму і трифлуорометилкетонів, які використовують для лікування запальних захворювань. Інгібування еластази кверцетином також більш виражене порівняно з дією

прийнятих стандартних інгібіторів серинових протеїназ, таких, як овомукоїд, фенілметилсульфонілфторид і апротинін.

З метою з’ясування типу інгібування флавоноїдами еластази було проведено дослідження за визначенням констант Міхаеліса, які визначали графічно за допомогою рівнянь регресії по залежності зворотних координат $1/V$ від $1/[S]$ (де V – швидкість реакції, а $[S]$ – концентрація субстрату) для реакцій, що перебігають за відсутності й присутності інгібітора (флавоноїду), – графіки Лайнуївера–Берка. Графічний аналіз і розрахунок константи Міхаеліса показали, що при взаємодії флавоноїду з еластазою графік і точка перетину з віссю абсцис зрушуються вправо. Константа Міхаеліса при цьому збільшується в 1,26–2,34 раза. Отримані результати свідчать про те, що флавоноїди проявляють ефект частково конкурентного (або змішаного) інгібування еластази. Тобто флавоноїди не з’єднуються з активним центром ферменту, але впливають на його структуру, зв’язуючись із поряд розташованою ділянкою настільки близько до активного центру, що відбувається його деформація, внаслідок чого спорідненість ферменту до субстрату зменшується і швидкість перебігу реакції знижується.

Таким чином, наші дослідження не тільки доповнили перелік флавоноїдів з антиеластазною властивістю 16 сполуками, але і вперше показали механізм взаємодії цих речовин з еластазою. Крім того, в численних експериментах на щурах нами підтверджено, що профілактичне введення препаратів флавоноїдів запобігає зниженню щільності стегнової кістки щурів і збільшенню активності еластази в кістковій тканині, викликаному моделюванням остеопорозу [6, 8].

Таблиця 2 – Інгібування флавоноїдами еластази

Флавоноїди		IC_{50} , М
Флавоноїди "Sigma"	Кверцетин	$0,799 \cdot 10^{-3}$
	Лютеолін	$1,390 \cdot 10^{-3}$
	Апігенін	$1,543 \cdot 10^{-3}$
	Ціанідин	$1,175 \cdot 10^{-3}$
	Нарингенін	$3,309 \cdot 10^{-3}$
	Гесперетин	$4,398 \cdot 10^{-3}$
	Геністеїн	$3,760 \cdot 10^{-3}$
	Дайдзеїн	$4,563 \cdot 10^{-3}$
	Гесперидин	$6,919 \cdot 10^{-3}$
	Рутин	Неактивний
	Нарингін	Неактивний
Препарати рослинних флавоноїдів	Катехін	Неактивний
	Ізофлавоноїди сої	$0,904 \cdot 10^{-3}$
	Байкалін	$1,921 \cdot 10^{-3}$
	Флаволігнани	$2,716 \cdot 10^{-3}$
	Софоригозид	$7,354 \cdot 10^{-3}$

ВИСНОВКИ. 1. Зниження щільності стегнової кістки в щурів при експериментальному остеопорозі, фторидній інтоксикації або старінні супроводжується зростанням активності еластази в кістковій тканині, що дозволяє говорити про деструктивну роль еластази в патологічній резорбції кісткової тканини.

2. Встановлено інгібуючу активність флавоноїдів відносно лейкоцитарної еластази людини. Кінетичні дослідження показали частково конкурентний тип інгібування.

3. На підставі проведених досліджень запропоновано для застосування в комплексному лікуванні й профілактиці остеопорозу препарати флавоноїдів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барышева И. А. Особенности выделения и анализа изофлавонов из растительного сырья / И. А. Барышева, О. А. Макаренко, А. П. Левицкий // Вісник стоматології. – 2006. – № 3 (53), спецвипуск. – С. 9.
2. Биць Ю. В. Роль еластази та її інгібіторів у патогенезі артеріосклерозу / Ю. В. Биць, В. Є. Досенко // Проблеми медицини. – 1999. – № 9–10. – С. 10–17.
3. Гороховский В. Н. Лечебно-профилактическое действие комплекса адаптогенных препаратов на стоматологический статус у детей в зоне эндемического флюороза : дис. ... канд. мед. наук / В. Н. Гороховский. – Одесса, 2001. – 191 с.
4. Калиман П. А. Влияние кверцетина на некоторые показатели системы протеиназа – ингибитор протеиназ у крыс при введении им хлорида кобальта / П. А. Калиман, А. А. Самохин, Л. М. Самохина // Укр. біохім. журн. – 2001. – **73**, № 6. – С. 127–130.
5. Кропотов А. В. Влияние экстракта элеутерококка и иприфлавона на развитие глюкокортикоидного остеопороза / А. В. Кропотов, О. Л. Колодняк, В. М. Колдаев // Бюл. exper. биологии и медицины. – 2002. – **133**, № 3. – С. 295–297.
6. Левицкий А. П. Використання препарату остеовіту для профілактики глюкокортикоїдного остеопорозу / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко // Ендокринологія. – 2008. – **13**, № 1. – С. 92–97.
7. Макаренко О. А. Антипротеиназная активность флавоноидов / О. А. Макаренко, А. П. Левицкий, И. В. Ходаков // Вісник Одеського нац. університету. – 2010. – **15**, вип. 17, Біологія. – С. 29–36.
8. Макаренко О. А. Перспективы применения биофлавоноидов для профилактики постменопаузального остеопороза / О. А. Макаренко // Фітотерапія. Часопис. – 2007. – № 4. – С. 28–33.
9. Металлопротеиназы матрикса нормальных тканей человека / П. З. Хасигов, О. В. Подобед, С. А. Кцоева [и др.] // Биохимия. – 2001. – **66**, вып. 2. – С. 167–179.
10. Соевый ингибитор Баумана-Бирк как аффинный лиганд для выделения лейкоцитарной эластазы. Ингибирование гидролиза эластина, катализируемого лейкоцитарной эластазой / Т. В. Тихонова, Н. И. Ларионова, И. П. Гладышева, Н. Ф. Казанская // Биохимия. – 1993. – **58**, вып. 11. – С. 1669–1676.
11. Ходаков І. В. Спосіб визначення щільності кісток лабораторних тварин / І. В. Ходаков // Досягнення біології та медицини. – 2004. – № 2 (4). – С. 38–41.
12. Щепёткин И. А. Остеокластическая резорбция кости / И. А. Щепёткин // Успехи соврем. биологии. – 1996. – **116**, № 4. – С. 474–492.
13. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза : метод. рекомендации / [А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, О. В. Деньга и др.]. – К. : ГФЦ МЗ Украины “Авиценна”, 2005. – С. 31–38.
14. Экспериментальный остеопороз / В. Фролькис, В. Поворознюк, О. Евтушенко, Н. Григорьева // Doctor. – 2003. – № 6. – С. 48–52.
15. Effects of 3'-hydroxyfarrerol (1dB 1031), a novel flavonoid agent, on phagocyte products / F. Meloni, P. Ballabio, M. Gorrini [et al.] // Inflammation. – 1995. – **19**. – P. 689–699.
16. Kuhad A. Highlights from the 3rd International Conference on Polyphenols and Health. Current trends in polyphenol research: from Mother Nature to Molecular mechanisms / A. Kuhad, K. Chopra // Drugs of the Future. – 2008. – **33** (3). – P. 249–287.
17. New phytoweapons to curb leukocyte elastase / I. Dell'Aica, R. Caniato, S. Biggin, S. Garbisa // Drugs of the Future. – 2006. – **31** (9). – P. 827–835.
18. Visser L. The use of p-nitrophenyl-N-test-butyl-oxy-carbonyl-L-alaninate as substrate for elastase / L. Visser, E. R. Blout // Biochem. Of biophys. Acta. – 1972. – **268**, № 1. – P. 275–280.

ДЕСТРУКТИВНАЯ РОЛЬ ЭЛАСТАЗЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТЕОПОРОЗА И ИНГИБИРОВАНИЕ ЕЁ АКТИВНОСТИ ФЛАВОНОИДАМИ

Резюме

На основании результатов 9 экспериментальных исследований на крысах раскрыта деструктивная роль эластазы костной ткани при моделировании остеопороза разного генеза, фтористой интоксикации и старении животных. В качестве ингибиторов эластазы рассматриваются флавоноиды, в различной степени подавляющие активность этой мощной деструктивной протеиназы. Проведенные исследования расширяют представления о патогенетической роли эластазы и указывают направление поиска ингибиторов эластазы, в частности флавоноидов, для повышения эффективности профилактики и лечения остеопороза.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **экспериментальный остеопороз, эластаза, флавоноиды.**

О. А. Makarenko
INSTITUTE OF DENTISTRY OF AMS OF UKRAINE, ODESSA

THE DESTRUCTIVE ROLE OF ELASTASE IN PATHOGENESIS OF OSTEOPOROSIS AND INHIBITION OF ITS ACTIVITY WITH FLAVONOIDS

Summary

On the basis of the results of 9 experimental studies with rats the destructive role of elastase of osseous tissue at simulation of osteoporosis of different genesis, fluoride intoxication and at rats aging, was disclosed. Flavonoids, depressing in different degree the activity of this powerful destructive proteinase, are observed like inhibitors of elastase. The held investigations widen the conception of the pathogenic role of elastase and show the direction of the search of elastase inhibitors, flavonoids in particular, for the raising the effectiveness of prevention and treatment of osteoporosis.

KEY WORDS: **experimental osteoporosis, elastase, flavonoids.**

Отримано 18.03.11

Адреса для листування: О. А. Макаренко, Інститут стоматології АМН України, вул. Рішельєвська, 11, Одеса, 65026, Україна.

ДИНАМІКА АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В РАНЬОМУ ПЕРІОДІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ТЯЖКОЇ ТРАВМИ

У патогенезі раннього етапу тяжкої травми ключову роль відіграє інтенсифікація вільнорадикального окиснення, яка проявляється значним підвищенням у плазмі крові вмісту ТБК-активних продуктів перекисного окиснення ліпідів. На цьому тлі настає виснаження антиоксидантного захисту, що супроводжується зниженням вмісту в плазмі крові SH-груп, активності каталази й антиоксидантно-прооксидантного індексу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **тяжка травма, антиоксидантний захист.**

ВСТУП. Дослідження патогенезу тяжкої травми відносять до актуальних проблем сучасності. Значна летальність, хвилеподібний перебіг, затратне лікування зумовлюють необхідність глибшого розуміння механізмів розвитку травматичної хвороби й переходу її до поліорганної недостатності [4]. Загальнобіологічною закономірністю відповіді організму в умовах травми є активація вільнорадикального окиснення, чому сприяють стрес, викид медіаторів запалення, гіпоксія, порушення мікроциркуляції не тільки в зоні ураження, але й у цілісному організмі [2]. З огляду на це, важливим аспектом для забезпечення життєдіяльності є стан антиоксидантного захисту.

Метою даної роботи було оцінити стан антиоксидантного захисту організму білих щурів через 2 год після моделювання тяжкої травми.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. В експериментах використано 26 нелінійних білих щурів-самців масою 180–200 г. Контрольну групу склали 20 тварин, дослідну – 6. У дослідній групі в умовах тіопентало-натрієвого знеболювання (40 мг/кг) моделювали тяжку травму (Д. В. Козак, 2011). Через 2 год тварин виводили з експерименту шляхом тотального кровопускання із серця. В одержаній крові визначали вміст ТБК-активних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [1], активність каталази [8], супероксиддисмутази (СОД) [5, 9], SH-груп [6] та розраховували антиоксидантно-прооксидантний індекс крові (АПІ = активність каталази / вміст ТБК-активних продуктів ПОЛ) [1], який належить до чутливих індикаторів стану антиоксидантного захисту, відображає баланс між антиоксидантами і прооксидантами [7]. Отриманий цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики з використанням критерію Стьюдента.

© Д. В. Козак, 2011.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як видно з таблиці, під впливом травми вже через 2 год відмічали значне підвищення інтенсивності вільнорадикального окиснення, про що свідчило зростання вмісту в крові ТБК-активних продуктів ПОЛ – на 75,5 % ($p < 0,001$).

Серед досліджуваних показників антиоксидантного захисту активність СОД плазми крові практично не змінювалася. Натомість статистично достовірно знижувалися активність каталази плазми крові – на 17,1 % ($p < 0,001$) та вміст SH-груп – на 26,0 % ($p < 0,001$). При цьому АПІ зменшувався більше ніж у 2 рази ($p < 0,001$).

Одержані результати свідчать про те, що вже через 2 год після тяжкої травми в організмі лабораторних білих щурів інтенсифікуються процеси вільнорадикального окиснення, що підтверджує існуючі патогенетичні механізми перебігу тяжкої травми [2]. Значну роль при цьому відіграє збільшення вмісту активних форм кисню. Разом із тим, цей процес відбувається на тлі істотного зниження антиоксидантного захисту. Як видно, перш за все виснажується система відновленого глутатіону, про що опосередковано свідчить зменшення

Таблиця – Стан ПОЛ та антиоксидантного захисту через 2 год після моделювання тяжкої травми ($M \pm m$)

Показник	Контрольна група (n=20)	Дослідна група (n=6)	p
ТБК-активні продукти ПОЛ, мкмоль/л	3,19±0,09	5,60±0,34	<0,001
Каталаза, %	43,32±1,10	35,85±1,46	<0,001
АПІ	13,43±0,67	6,60±0,65	<0,001
СОД, %	49,91±0,65	51,27±1,29	>0,05
SH-групи, ммоль/л	71,59±1,46	52,97±1,53	<0,001

вмісту в плазмі крові SH-груп, та знижується здатність нейтралізувати перекис водню [3], на що вказує зниження активності каталази плазми крові. З огляду на наведені дані, можна припустити, що одним з основних методів корекції тяжкої травми є посилення антиоксидантного захисту, яке слід розпочинати у перші години після травми.

ВИСНОВКИ. 1. У патогенезі раннього етапу тяжкої травми ключову роль відіграє інтенсифікація вільнорадикального окиснення, яка

проявляється значним підвищенням у плазмі крові вмісту ТБК-активних продуктів ПОЛ.

2. На тлі модельованої травми вже через 2 год настає виснаження антиоксидантного захисту, що супроводжується зниженням вмісту в плазмі крові SH-груп, активності каталази та АПІ.

У перспективі передбачаються з'ясування динаміки прооксидантно-антиоксидантного стану в пізніші терміни після травми та випробування різних схем антиоксидантної підтримки.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антиоксидантно-прооксидантний індекс сироватки крові щурів з експериментальним стоматитом і його корекція зубними еліксирами / А. П. Левицький, В. М. Почтар, О. А. Макаренко, Л. І. Гридін // Одеський мед. журн. – 2006. – № 1. – С. 22–25.
2. Избранные аспекты патогенеза и лечения травматической болезни / [В. Н. Ельский, В. Г. Климовицкий, С. Е. Золотухин и др.]. – Донецк : Либідь, 2002. – 360 с.
3. Клинико-диагностическое значение лабораторных показателей / [В. В. Долгов, В. Т. Морозова, Р. Л. Марцишевская и др.]. – М. : Медицина, 1995. – 211 с.
4. Надання медичної допомоги постраждалим з політравмою на догоспітальному етапі : методичні рекомендації / [Г. Г. Рошчін, Ю. О. Гайдаєв, О. В. Мазуренко та ін.]. – К., 2003. – 33 с.
5. Посібник до практичних занять з біологічної хімії / [І. Я. Гонський, О. П. Баган, А. К. Врублевський та ін.]. – Тернопіль : Укрмедкнига, 1992. – 802 с.
6. Практикум по биохимии / под ред. С. Е. Северина. – М. : Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
7. Сазонтова Т. Г. Значение баланса прооксидантов и антиоксидантов – равнозначных участников метаболизма / Т. Г. Сазонтова, Ю. В. Архипенко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – № 3. – С. 2–18.
8. Чевари С. Определение антиоксидантных параметров крови и их диагностическое значение в пожилом возрасте / С. Чевари, Т. Андял, Я. Итзунгер // Лаб. дело. – 1991. – № 1. – С. 9–10.
9. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, Й. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678–681.

ДИНАМИКА АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ В РАННЕМ ПЕРИОДЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЯЖЕЛОЙ ТРАВМЫ

Резюме

В патогенезе раннего этапа тяжелой травмы ключевую роль играет интенсификация свободнорадикального окисления, которая проявляется значительным повышением в плазме крови содержания ТБК-активных продуктов перекисного окисления липидов. На этом фоне наступает истощение антиоксидантной защиты, что сопровождается снижением содержания в плазме крови SH-групп, активности каталазы и антиоксидантно-прооксидантного индекса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **тяжелая травма, антиоксидантная защита.**

D. V. Kozak
TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I. YA. HORBACHEVSKY

THE DYNAMICS OF ANTIOXIDANT DEFENSE IN THE EARLY STAGE OF EXPERIMENTAL SEVERE INJURY

Summary

In the pathogenesis of early phase of severe injury intensification of free radical plays a key role that is shown by significant increase of MDA-active lipid per oxidation products in plasma. On this background antioxidant depletion appears that is shown by reducing of SH-groups in plasma, catalase activity alpha.

KEY WORDS: **severe injury, antioxidant protection.**

Отримано 17.05.11

Адреса для листування: Д. В. Козак, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, 46001, Україна.

Ю. В. Левачкова, О. А. Здорик
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

РОЗРОБКА ТА ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ МЕТРОНІДАЗОЛУ В ПЕСАРІЯХ

У результаті розробки методики кількісного визначення метронідазолу в песаріях методом абсорбційної спектрофотометрії було підібрано оптимальний розчинник та розведення, досліджено стабільність оптичної густини в часі, встановлено концентраційний діапазон ($0,7 \times 10^{-5}$ – $1,68 \times 10^{-5}$ г/мл), на якому виконується лінійна залежність оптичної густини від концентрації. Проведено валідацію розробленої методики за стандартизованою процедурою, що відповідає вимогам ДФУ.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: валідація аналітичних методик, абсорбційна спектрофотометрія, метронідазол.

ВСТУП. Метронідазол є сучасним та високоефективним антибактеріальним препаратом, що має широкий спектр дії відносно найпростіших (трихомонад, лямблій, дизентерійних амеб, балантидій, лейшманій), а також споро- та неспоруютьчих облигатних анаеробів, тому його часто призначають гінекологі при лікуванні бактеріальних вагінозів [8]. До того ж встановлено, що вагінальний шлях лікування бактеріального вагінозу не поступається пероральній терапії і має переваги через меншу вірогідність розвитку побічних реакцій [6, 9].

На сьогодні виведення на фармацевтичний ринок нового лікарського засобу потребує його стандартизації та валідації методів контролю якості відповідно до сучасних вимог ДФУ.

З огляду на вищенаведене, метою даної роботи були експериментальне обґрунтування розробки та валідація методики кількісного визначення метронідазолу в песаріях під умовною назвою “Меланізол” методом абсорбційної спектрофотометрії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для проведення досліджень використовували субстанцію метронідазолу (сертифікат аналізу № 0811232, LUOTIAN HONGYAN BIOCHEMICAL CO. LTD), що відповідає вимогам Британської фармакопеї 2005, мірний посуд класу А, реактиви, що відповідають вимогам ДФУ, аналітичні ваги AB 204 S/A METTLER TOLEDO, рН-метр PB-11

© Ю. В. Левачкова, О. А. Здорик, 2011.

“Sartorius AG”, спектрофотометр “SPECORD 200”, спектрофотометр 46 “Ломо”.

Приготування розведення в 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої. Близько 0,07 г (т.н.) субстанції метронідазолу відважували у м.к. 100,0 мл, доводили до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої. 1,0 мл отриманого розчину поміщали у м.к. 50,0 мл та доводили до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої.

Приготування розведення в 0,1 М розчині натрію гідроксиду. Близько 0,035 г субстанції метронідазолу відважували у м.к. 100,0 мл, доводили до мітки 0,1 М розчином натрію гідроксиду. 1,0 мл отриманого розчину поміщали у м.к. 50,0 мл та доводили до мітки 0,1 М розчином натрію гідроксиду.

Методика кількісного визначення метронідазолу в песаріях. Близько 3,0 г (т.н.) розтертої маси песаріїв переносять у мірну колбу 250,0 мл, додають 100,0 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої та нагрівають на водяній бані при 60 °С до повного розчинення основи. Розчин охолоджують та доводять тим самим розчинником до мітки. 1,00 мл отриманого розчину переносять у мірну колбу 100,0 мл та доводять до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої.

Розчин робочого стандарту (РРС). 0,07 г (т.н.) субстанції метронідазолу переносять у мірну колбу 100,0 мл, додають 70 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої, перемішують до повного розчинення субстанції, доводять до мітки тим же розчинником. 1,00 мл отримано-

го розчину переносять у мірну колбу 50,0 мл і доводять до мітки 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої.

Оптичну густина випробуваного розчину та РРС вимірювали за довжини (277±2) нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, як розчин порівняння використовували 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої.

Вміст метронідазолу в одному песарії, у грамах, на середню масу песарію розраховували за формулою:

$$X_{г} = \frac{A_i \cdot m_{ст} \cdot 250 \cdot 1 \cdot 100 \cdot m_{сер,20}}{A_{ст} \cdot 100 \cdot 1 \cdot 50 \cdot m_{д/а}} = \frac{A_i \cdot m_{ст} \cdot 5 \cdot m_{сер,20}}{A_{ст} \cdot m_{д/а}}$$

де A_i – оптична густина випробуваного розчину;

$A_{ст}$ – оптична густина розчину робочого стандарту;

$m_{сер,20}$ – середня маса двадцяти песаріїв (г);

$m_{ст}$ – маса наважки метронідазолу для приготування розчину робочого стандарту (г);

$m_{д/а}$ – маса наважки маси песаріїв, що беруть для аналізу (г).

Приготування модельних зразків песаріїв у концентраційному діапазоні 80–120 %. Склад: метронідазолу – 2,0000, 2,2500, 2,5000, 2,7500, 3,0000 г, олії чайного дерева – 1,0 г, твіну-80 – 0,86 г, ПЕО-1500 та ПЕО-400 (9:1) – до отримання супозиторної маси 30,00. Відважували наважку субстанції метронідазолу, подрібнювали у ступці, додавали ПЕО-400 та розтирали. До одержаної маси додавали розплавлений ПЕО-1500, перемішували до однорідності. У фарфоровій чашці змішували необхідну кількість твіну-80 та олії чайного дерева, додавали до отриманої маси і перемішували до однорідності.

Приготування песаріїв без метронідазолу. В ступку додавали ПЕО-400 та розтирали. До одержаної маси додавали розплавлений ПЕО-1500, перемішували до однорідності. У фар-

форовій чашці змішували необхідну кількість твіну-80 та олії чайного дерева, додавали до отриманої маси і перемішували до однорідності.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. При розробці методики кількісного визначення метронідазолу в песаріях методом спектрофотометрії до уваги брали публікації, присвячені вивченню спектральних характеристик залежно від природи розчинника та рН [3, 5, 7], згідно з якими у кислому та лужному середовищах спектри поглинання розчинів метронідазолу в діапазоні від 230–330 нм мають мінімуми та максимуми – останні можна використовувати для кількісного визначення. Літературні дані були підтверджені експериментально для розведень метронідазолу в 0,1 М кислоті хлористоводневій ($1,4 \times 10^{-5}$ г/мл) та 0,1 М розчині натрію гідроксиду ($0,7 \times 10^{-5}$ г/мл) (рис. 1).

У ході досліджень підбирали оптимальний розчинник, досліджували стабільність оптичної густини в часі, підбирали розведення метронідазолу таким чином, щоб показник поглинання був у межах 0,2–0,7, встановлювали концентраційний діапазон, на якому спостерігається лінійна залежність. Для обрання оптимального розчинника було вивчено *стабільність* оптичної густини розчинів метронідазолу в часі. Готували розчини субстанції метронідазолу в 0,1 М розчині кислоти хлористоводневої та 0,1 М розчині натрію гідроксиду і вимірювали оптичну густина при 277 та 317 нм відповідно (табл. 1).

За результатами таблиці 1, оптична густина розчину з рН 1,24 характеризується стабільністю протягом 60 хв (стандартне відхилення і довірчий інтервал не перевищують критерію максимальної систематичної похибки) на відміну від результатів для розведення метронідазолу в 0,1 М розчині натрію гідроксиду

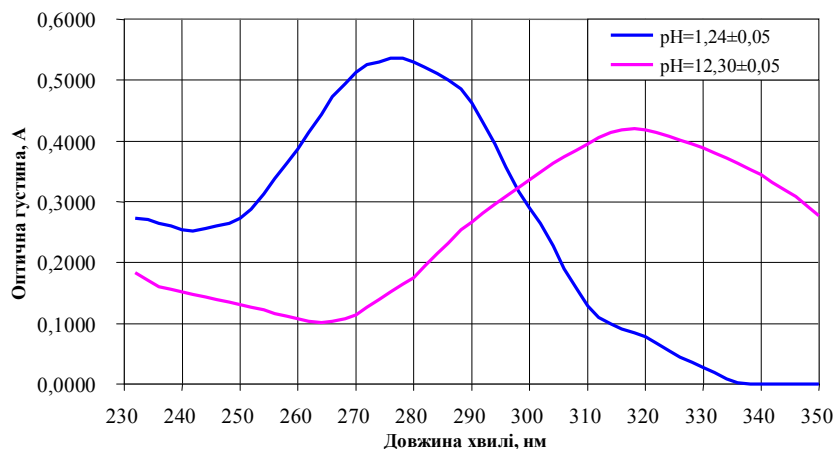


Рис. 1. Спектри поглинання метронідазолу в лужному та кислому середовищах

Таблиця 1 – Дослідження оптичної густини у часі

рН аналіт. розчину	$A_{\text{сер.}}$					RSD _t , %	Δ_t , %	δ_{max} , %
	0 хв	15 хв	30 хв	45 хв	60 хв			
12,30±0,05	0,4207	0,4297	0,4247	0,4167	0,4173	1,29	2,74	1,02
1,24±0,05	0,5457	0,5457	0,5443	0,5433	0,5443	0,18	0,39	1,02

Таблиця 2 – Метрологічні характеристики методики кількісного визначення метронідазолу методом спектрофотометрії

$Z_{\text{сер.}}$, %	S_z , %	Δ_z , %	δ , %	b	S_b	a	S_a	r
99,98	0,45	0,18	0,02	1,0066	0,0030	-0,5467	0,2623	0,9999

$\Delta_t=2,74 > \delta_{\text{max}}$, тому як розчинник було обрано 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої.

На модельних розчинах субстанції метронідазолу досліджували метрологічні характеристики спектрофотометричного методу методом стандарту, розрахунок отриманих експериментальних даних проводили у нормалізованих координатах (табл. 2). Лінійність методики досліджували у концентраційному діапазоні $0,7 \times 10^{-5}$ – $1,68 \times 10^{-5}$ г/мл, що відповідає діапазону застосування 50–120 % у нормалізованих координатах.

Нижню межу було розширено, оскільки у подальшому методику планується використовувати для визначення вивільнення метронідазолу з песаріїв (рис. 2). За 100 % брали розведення розчину стандарту $1,4 \times 10^{-5}$ г/мл. Проведені дослідження та отримані результати було покладено в основу розробки методики кількісного визначення метронідазолу в песаріях.

Перед проведенням валідації методики кількісного визначення метронідазолу в песаріях було розраховано критерії прийнятності методики (табл. 3) та повну невизначеність методики (табл. 4). Прогноз повної невизначеності аналізу не перевищує розрахованого критерію максимально допустимої невизначеності аналізу $1,17 \geq 3,2$ %, що свідчить про коректність запропонованої пробопідготовки.

Підтвердження специфічності для методу абсорбційної спектрофотометрії полягає у доведенні того, що відносна систематична похибка, яку вносять допоміжні речовини та інші компоненти пропису (олія чайного дерева, твін-80, ПЕО-1500 і ПЕО-400), є незначною порівняно з максимально допустимою невизначеністю аналізу [2]. Оцінку впливу компонентів пропису на оптичну густину проводили,

Таблиця 3 – Критерії прийнятності спектрофотометричної методики

Критерії прийнятності	Значення критичних величин, %
Допуски вмісту	±10
Повна невизначеність методики – $\max \Delta_{As}$	3,2
Систематична похибка – δ_{max}	1,02
Залишкове стандартне відхилення – S_0	1,81
Коефіцієнт кореляції – R_c	0,9924
Вільний член лінійної залежності – a	5,12

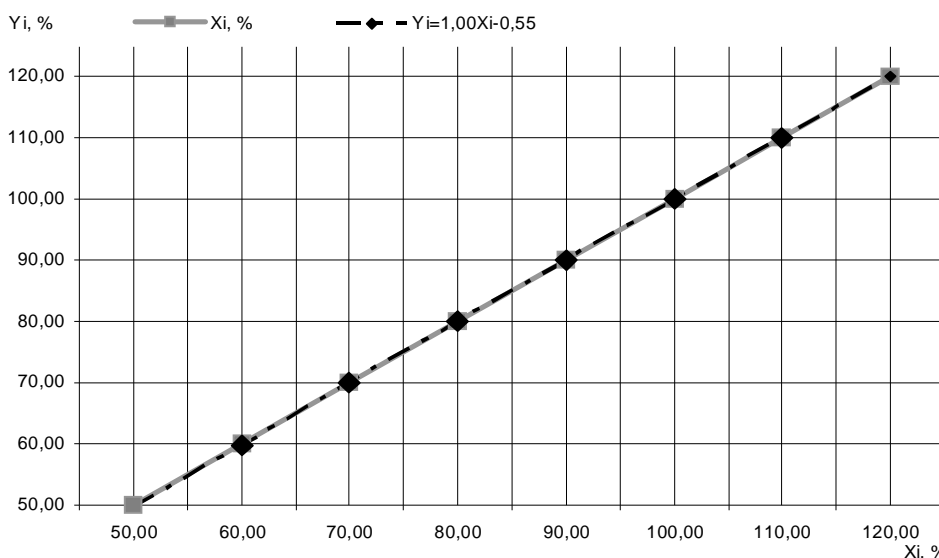


Рис. 2. Графік лінійної залежності оптичної густини від концентрації метронідазолу в нормалізованих координатах.

Таблиця 4 – Розрахунок повної невизначеності методики

Операція пробопідготовки	Невизначеність операції	Значення операції	Розрахунок невизначеності	Значення невизначеності операції, %
Приготування розчину робочого стандарту				
Зважування на аналітичних вагах $m_{\text{нав}}$ (метронідазолу)	0,2 мг	70,0 мг	0,2/70,0·100 %	0,29
Розведення у колбі 100,0 мл	–	100 мл	–	0,12
Відбір аліквоти піпеткою 1,00 мл		1 мл		0,6
Розведення у колбі 50,0 мл		50 мл	–	0,17
$\Delta_{\text{sp}} = \sqrt{0,29^2 + 0,12^2 + 0,6^2 + 0,17^2} \times 100 \% \approx 0,70 \%$				
Приготування випробовуваних розчинів				
Зважування на аналітичних вагах $m_{\text{нав}}$ (маси песаріїв)	0,2 мг	3,0 г	0,2/3000,0·100 %	0,0067
Розведення у колбі 250,0 мл	–	100 мл	–	0,08
Відбір аліквоти піпеткою 1,00 мл		1 мл		0,6
Розведення у колбі 100,0 мл		50 мл	–	0,12
Прогноз невизначеності пробопідготовки				
$\Delta_{\text{sp}} = \sqrt{0,0067^2 + 0,08^2 + 0,6^2 + 0,12^2} \times 100 \% \approx 0,62 \%$				
Прогноз повної невизначеності аналізу				
$\Delta_{\text{As}} = \sqrt{\Delta_{\text{SP}}^2 + \Delta_{\text{FAO}}^2} = 0,70^2 + 0,64^2 + 0,52^2 = 1,17 \%$				

вимірюючи оптичну густину розчину, приготованого за методикою для зразків песаріїв без метронідазолу (A_{blank}), і розчину субстанції метронідазолу в 0,1 $M_{\text{розчин}}$ розчині кислоти хлористоводневої з розведенням $1,07 \times 10^{-5}$ г/мл (A_{subst}), що за вмістом відповідає кількості метронідазолу в 3,0 г лікарського засобу. Середні значення трьох вимірювань оптичної густини склали: $A_{\text{blank}} = 0,0041$; $A_{\text{subst}} = 0,4097$. Систематична похибка складала:

$$\delta_{\text{exc}} = \frac{100 \cdot 0,0041}{0,4097} = 1,00 \%$$

Як видно, нерівність $\delta_{\text{exc}} \leq \delta_{\text{max}}$ (1,00 % ≤ 1,024 %) виконується, отже, фонове поглинання є незначущим і методика характеризується допустимою специфічністю. До того ж нерівність $\delta_{\text{exc}} \leq 0,32 \cdot \delta_{\text{max}}$ не виконується, таким чином, перевірку лінійності, прецизійності та правильності проводили з використанням модельних зразків песаріїв за присутності інших компонентів пропису.

Валідацію методики проводили у концентраційному діапазоні $0,86 - 1,3 \times 10^{-5}$ г/мл, що відповідає діапазону застосування 80–120 % відносно номінального вмісту метронідазолу в песаріях [1, 2, 4].

Отримані характеристики лінійності b , S_b , a , S_a , S_r , r (табл. 5, рис. 3) відповідають критеріям прийнятності, лінійність методики спостерігається на всьому діапазоні застосування (80–120 %).

Таблиця 5 – Валідаційні характеристики методики спектрофотометричного визначення метронідазолу в песаріях

Валідаційна характеристика	Спектрофотометричний метод	
	Лаб. 1	Лаб. 2
Вивчення правильності та збіжності		
Z, %	99,43	99,19
S_z , %	0,19	0,56
Δ_z , %	0,34	0,99
δ , %	0,57	0,81
Вивчення лінійності		
b	0,9973	1,0230
S_b	0,0033	0,0053
a	-0,2939	-3,0421
S_a	0,3365	0,5352
S_o	0,1828	0,2907
r	0,9999	0,9998
Вивчення відтворюваності		
Z_{intra} , %	99,31	
SD_z , %	0,38	
Δ_{intra} , %	0,69	

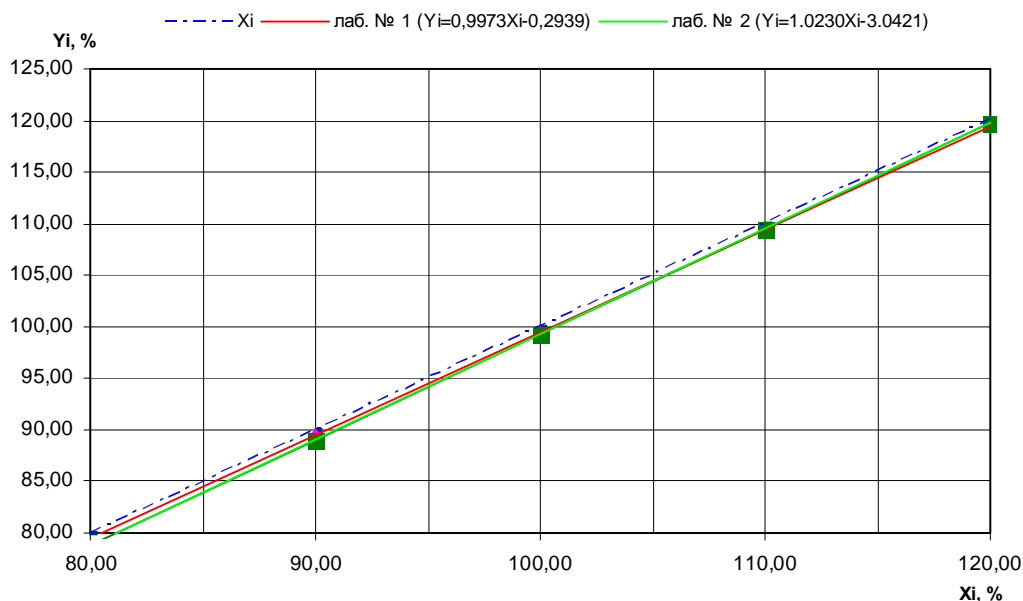


Рис. 3. Графік лінійної залежності у нормалізованих координатах.

Використовуючи підхід одночасного визначення валідаційних характеристик, *правильність та збіжність* визначали на тих же модельних зразках, що і лінійність (табл. 5). Дослідження впливу міжлабораторних варіацій – різне обладнання, різні аналітики – проводили за результатами аналізу 15 проб модельних зразків, величини Z_{intra} , RSD_z і Δ_{intra} наведено у таблиці 5.

ВИСНОВКИ. 1. За результатами вивчення стабільності оптичної густини розчинів метронідазолу в часі встановлено, що оптична гус-

тина розчину метронідазолу в 0,1 М кислоті хлористоводневій характеризується стабільністю протягом 60 хв.

2. Встановлено, що лінійна залежність оптичної густини від концентрації метронідазолу спостерігається у діапазоні $0,7 \times 10^{-5}$ – $1,68 \times 10^{-5}$ г/мл.

3. Проведено валідацію методики кількісного визначення метронідазолу в песаріях під умовною назвою “Меланізол” методом абсорбційної спектрофотометрії, за результатами якої встановлено, що методика відповідає вимогам ДФУ та може бути внесена до МКЯ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Державна Фармакопея України / Держ. п-во “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид., доп. 2. – Х. : РІПЕГ, 2008. – 620 с.
2. Евтифеева О. А. Стандартизованная процедура валидации методик количественного определения экстемпоральных лекарственных средств в условиях аптек и лабораторий по контролю качества / О. А. Евтифеева, В. А. Георгианц // Фармаком. – 2007. – № 1. – С. 69–81.
3. Сравнительная характеристика физико-химических методов контроля качества метронидазола / Е. Ф. Сафонова, А. И. Сливкин, Д. С. Вязова, В. Ф. Дзюба // Вестник ВГУ. – 2008. – № 1. – С. 159–162.
4. Стандартизованная процедура валидации методик количественного анализа лекарственных средств методом стандарта / А. И. Гризодуб, Д. А. Леонтьев, Н. В. Денисенко, Ю. В. Подпружников // Фармаком. – 2004. – № 3. – С. 3–17.

5. Теплых А. Н. Количественное определение метронидазола спектрофотометрическим методом / А. Н. Теплых, Е. А. Илларионова // Сибирский медицинский журнал. – 2009. – № 5. – С. 48–50.
6. Тихомиров А. Л. Бактериальный вагиноз: некоторые аспекты этиологии, патогенеза, клиники, диагностики лечения / А. Л. Тихомиров, Ч. Г. Олейник // Гинекология. – 2004. – № 2. – С. 62–65.
7. Clarke’s analysis of drugs and Poisons / edited by A. C. Moffat, M. D. Osselton and B. Widdop. – London : Pharmaceutical Press, 2004. – 1632 p.
8. Mead P. B. Epidemiology of bacterial vaginosis / P. B. Mead // Am. J. Obstet. Gynecology. – 2011. – **169**, № 2. – P. 446–449.
9. The association of Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy Text. / C. S. Bradshaw, S. N. Tabrizi, C. K. Fairley [et al.] // J. Infect. Dis. – 2006. – **194**, № 6. – P. 828–836.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТРОНИДАЗОЛА В ПЕССАРИЯХ

Резюме

В результате разработки методики количественного определения метронидазола в пессариях методом абсорбционной спектрофотометрии были подобраны оптимальный растворитель и разведения, исследована стабильность оптической плотности во времени, установлен концентрационный диапазон ($0,7 \times 10^{-5}$ – $1,68 \times 10^{-5}$ г/мл), на котором соблюдается линейная зависимость оптической плотности от концентрации. Проведена валидация разработанной методики по стандартизованной процедуре, которая соответствует требованиям ГФУ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: валидация аналитических методик, абсорбционная спектрофотометрия, метронидазол.

Yu. V. Levachkova, O. A. Zdoryk
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METRONIDAZOLE QUANTITATIVE DETERMINATION METHOD IN PESSARIES

Summary

As a result of the development assay method of metronidazole in pessaries by a method of an absorption spectrophotometry an optimum dissolvent and delutions have been picked up, stability of optical density in time has been investigated, the concentration range has been established ($0,7 \times 10^{-5}$ – $1,68 \times 10^{-5}$ the g/ml) on which linear dependence of optical density on concentration is observed. The validation of the developed method according to standardized procedure which corresponds to SPU has been carried out.

KEY WORDS: validation of analytical methods, absorption spectrophotometry, metronidazole.

Отримано 02.06.11

Адреса для листування: Ю. В. Левачкова, вул. Петровського, 34, кв. 12, Харків, 61024, Україна.

РОЗРОБКА МЕТОДИК ІЗОЛЮВАННЯ ДОНОРМІЛУ З БІОЛОГІЧНИХ РІДИН ОРГАНІЗМУ

Вивчено умови ізолювання донормілу з біологічних рідин на модельних сумішах з кров'ю і сечею за допомогою різних осаджувачів формених елементів крові та білків, які найчастіше застосовують у сучасному хіміко-токсикологічному аналізі. Встановлено, що з використаних методів найбільш ефективними є методи ізолювання донормілу з крові та сечі за умов обробки біологічних рідин 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої та використання для очищення "кислої" водної витяжки й екстракції препарату з "лужної" водної витяжки діетилового естеру та хлороформу відповідно.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: донорміл, тонкошарова хроматографія, високоефективна рідинна хроматографія, УФ-спектрофотометрія, фотоколориметрія, іонетрія, екстракція, ізолювання з крові та сечі.

ВСТУП. За інформацією, наведеною в науковій літературі, донорміл викликає інтерес з точки зору хіміко-токсикологічних досліджень. Розробники та компанії-виробники у своїх рекламних матеріалах вказували на практичну відсутність ознак розвитку фізичної залежності, відсутність летальних випадків при застосуванні донормілу, а також на окремі випадки передозування, що переважно не вимагають проведення підтримувальної терапії [6–8]. Але вже незабаром з'явилися відомості про випадки смертельних отруєнь донормілом у Німеччині, Франції, Великобританії, США [9–11, 14, 18]. У 1983 році повідомлялося про суїцидальне отруєння донормілом 20-річної жінки на фоні приймання алкоголю [18]. У 1987 році в Німеччині було зафіксовано 109 летальних отруєнь донормілом [14]. У період з 1985 по 1995 рік публікації про випадки гострих отруєнь, передозувань і летальних результатів у ході лікування препаратом, а також випадки суїциду і приймання на фоні алкоголю почали з'являтися все частіше [9–11, 14, 18].

За даними Національного медичного університету Великобританії в період з 1983 по 1999 рік, у Сполученому королівстві донорміл увійшов до першої сотні лікарських препаратів, отруєння якими найчастіше реєструють на території цієї держави [11]. У Фінляндії фіксують до 10 летальних отруєнь донормілом на рік [15–17]. Крім того, за умов тривалого приймання препарат негативно впливає на

© І. М. Іванчук, В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко, З. В. Шовкова, 2011.

пам'ять, пригнічує реакції організму і рухову активність, що, зокрема, призводить до автокатастроф за участю водіїв, які регулярно приймають донорміл [12, 13, 15]. У Швеції щорічно трапляється до 20 таких випадків [12, 13].

Потрібно зазначити, що летальні й токсичні дози донормілу в різних пацієнтів можуть відрізнятися в 10–20 разів, як і концентрації препарату в печінці, крові та сечі. Так, для сечі зафіксовано показники в діапазоні від 16 до 148 мг/л, для крові – від 7 до 120 мг/л, а для печінки – від 14 до 800 мг/кг [9–18].

Проте інформація щодо отруєнь донормілом на території України відсутня, не в останню чергу тому, що методи його хіміко-токсикологічного дослідження практично не розроблено.

Одним із найважливіших етапів хіміко-токсикологічного дослідження є проведення ізолювання препарату з біологічного матеріалу, зокрема з біологічних рідин, з максимально можливим виходом.

Метою даної роботи була розробка методів ізолювання донормілу з біологічних рідин організму – крові та сечі.

Попередні дослідження умов екстракції донормілу з водних розчинів органічними розчинниками показали, що хлороформ екстрагує донорміл із водних розчинів у лужному середовищі – при цьому при одноразовій екстракції в органічний шар переходить близько 90 % препарату. Ступінь одноразової екстракції донормілу з водних розчинів діетиловим естером сягає максимуму (75 %) при

pH=10–12. Гексан практично не екстрагує донормілі із водних розчинів ні з кислого, ні з лужного середовища.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. При дослідженні виділення донормілу з біологічних рідин використовували модельні суміші крові та сечі з препаратом. Для цього до 10 г відповідної біологічної рідини додавали 1,00 мл розчину донормілу у воді очищеній (1000 мкг препарату), ретельно перемішували і залишали на добу. Готували також контрольні суміші біологічних рідин із розчинником (вода очищена), дослідження яких проводили паралельно з основними.

Кількість донормілу, який використовували для виконання модельних дослідів, було розраховано, виходячи з даних наукової літератури [9, 10, 14, 18] щодо кількості препарату в біологічних рідинах людини при смертельних отруєннях.

Ізолювання донормілу з крові проводили за двома методиками, що відрізнялися використаним осаджувачем для формених елементів крові та білків.

У першому випадку до 10 г модельної суміші крові з донормілом додавали 5 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої, перемішували та перевіряли за універсальним індикаторним папером pH суміші (при необхідності по краплях додавали 6 М розчин кислоти хлористоводневої до pH=2), залишали на 2 год при постійному перемішуванні. Суміш центрифугували (протягом 5 хв при 5000 об./хв), зливали надосадову рідину і тричі екстрагували діетиловим естером порціями по 5 мл. Естерні витяжки відділяли та в подальшому не досліджували. Водний шар підлужували 50 % розчином натрію гідроксиду до pH=11 і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування (протягом 5 хв при 5000 об./хв)).

У другому випадку до 10 г модельної суміші крові з донормілом додавали 5 мл 10 % водного розчину кислоти трихлорацетатної, перемішували та залишали на 1 год при постійному перемішуванні. Суміш центрифугували (протягом 5 хв при 5000 об./хв), зливали надосадову рідину, перевіряли pH (повинен дорівнювати 2) і тричі екстрагували діетиловим естером порціями по 5 мл. Естерні витяжки відділяли та в подальшому не досліджували. Водний шар підлужували 50 % розчином натрію гідроксиду до pH=11 і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування (протягом 5 хв при 5000 об./хв)).

Ізолювання донормілу із сечі проводили таким чином. До 10 г модельної суміші сечі з донормілом додавали 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої до pH=2 і тричі екстрагували діетиловим естером порціями по 5 мл. Естерні витяжки відділяли та в подальшому не досліджували. Водний шар підлужували 50 % розчином натрію гідроксиду до pH=11 і тричі екстрагували хлороформом порціями по 10 мл (при утворенні стійких емульсій застосовували центрифугування (протягом 5 хв при 5000 об./хв)).

Одержані витяжки (“лужна” хлороформна витяжка) об’єднували та фільтрували через паперовий фільтр (“червона стрічка”) з 1 г натрію сульфату безводного в мірну колбу місткістю 25,0 мл, доводили об’єм хлороформом до позначки. Таким чином, отримували витяжки 1, 2 та 3.

По 5, 10 та 100 мкл отриманої хлороформної витяжки використовували для ідентифікації донормілу методом ТШХ [3].

Кількісне визначення донормілу проводили за УФ-спектрофотометричною, екстракційно-фотометричною, іонометричною та ВЕРХ-методиками в 10 мл одержаної хлороформної витяжки, що висвітлено нами в роботах [1, 2, 4, 5]. Дослідження методом ВЕРХ проводили після очистки отриманої хлороформної витяжки методом ТШХ.

Методика ТШХ-очистки витяжок із біологічних рідин. 10 мл хлороформної витяжки випаровували на водяній бані до сухого залишку, який розчиняли в 0,5 мл хлороформу та кількісно наносили на лінію старту хроматографічної пластини “Sorbfil” ПТСХ-ІІВ (пластини попередньо обробляли 0,1 М розчином калію гідроксиду в метанолі, а потім висушували при 110 °С протягом 30 хв) смугою шириною 2 см. Поряд наносили 10 мкл стандартного хлороформного розчину донормілу (концентрація 1 мкг/мкл).

Пластину елюювали в хлороформі з метою очистки від співекстрактивних речовин – один раз або, за необхідності, двічі. За цих умов донормілі залишається на лінії старту, а співекстрактивні речовини мігрують до лінії фінішу.

Після висушування елюювали пластину в системі розчинників хлороформ – метанол (90:10), висушували, проявляли смугу “свідка” реактивом Драгендорфа та спостерігали пляму коричневого кольору з $R_f=0,58$.

Хроматографування проводили в камері об’ємом 500 см³, в яку вносили 10 мл системи розчинників. Камеру насичували протягом 30 хв. Довжина шляху пробігу розчинників становить 5 см.

За допомогою скальпеля навпроти плями “свідка” з пластини ретельно знімали сорбент з площі 3 см×1 см у скляний флакон. У флакон додавали 10 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої (при наступному проведенні кількісного визначення за УФ-спектрофотометричною методикою) або 10 мл 0,01 М розчину кислоти хлористоводневої (при наступному проведенні кількісного визначення за екстракційно-фотометричною або ВЕРХ-методикою) та струшували протягом 5 хв, після чого фільтрували в мірну колбу місткістю 10,0 мл та доводили об’єм розчину через фільтр (“червона стрічка”) відповідним розчинником до позначки.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати кількісного визначення донормілу у витяжках із біологічних рідин наведено в таблиці.

Таблиця – **Результати ізолювання донормілу з біологічних рідин та їх метрологічні характеристики (n=3, α=0,95)**

Витяжка	Метод ізолювання	Виділено донормілу, %			
		УФ-спектрофотометрична методика	фотоколориметрична методика	іонометрична методика	ВЕРХ – пряме визначення (після ТШХ-очистки)
1	із крові (методика I)	75,53±1,72	76,79±2,22	75,01±1,20	75,30±4,13
2	із крові (методика II)	70,06±3,16	63,99±1,29	65,49±2,00	70,46±5,55
3	із сечі	89,85±3,09	91,07±5,87	90,97±4,76	91,59±6,63

ВИСНОВКИ. 1. Вивчено умови ізолювання донормілу з біологічних рідин на модельних сумішах з кров’ю і сечею за допомогою різних осаджувачів формених елементів крові та білків, що найчастіше застосовуються у сучасному хіміко-токсикологічному аналізі. Встановлено, що з використаних методів найбільш ефективними є методи ізолювання донормілу з крові та сечі за умов обробки біологічних рідин 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої і застосування для очистки “кислої” водної витяжки й екстракції препарату з “лужної”

Таким чином, потрібно зазначити, що найкращі результати ізолювання донормілу з крові та сечі було одержано за умов обробки біологічних рідин 0,1 М розчином кислоти хлористоводневої і використання для очистки “кислої” водної витяжки й екстракції препарату з “лужної” водної витяжки діетилового естеру та хлороформу відповідно.

За умов проведення ідентифікації позитивний результат одержано для всіх витяжок. За допомогою запропонованих ТШХ-методик ідентифікації можна виявити донорміл при його вмісті в пробі не менше 0,1 мкг. Слід зазначити, що співекстрактивні речовини при проведенні ідентифікації не заважають виявленню донормілу у витяжках із біологічних рідин.

Запропонована методика ТШХ-очистки дозволяє виділити з пластини не менш як 90 % препарату.

водної витяжки діетилового естеру та хлороформу відповідно.

2. Запропоновано умови ідентифікації донормілу у витяжках із біологічних рідин, а також очистки одержаних витяжок від співекстрактивних речовин з використанням методу ТШХ.

3. Експериментально доведено доцільність застосування розроблених спектрофотометричної, фотоколориметричної, іонометричної та ВЕРХ-методик для кількісного визначення донормілу у витяжках з біологічних рідин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болотов В. В. Вивчення методів ізолювання донормілу з об’єктів біологічного походження / В. В. Болотов, І. М. Іванчук, Л. Ю. Клименко // Вісник фармації. – 2008. – № 3 (55). – С. 20–22.
2. Болотов В. В. Застосування високоефективної рідинної хроматографії в аналізі донормілу / В. В. Болотов, І. М. Іванчук // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. – 2006. – 4, вип. 2 (14). – С. 74–77.
3. Болотов В. В. Застосування тонкошарової хроматографії в аналізі снодійних засобів зопікло-

- ну та донормілу / В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко, І. М. Іванчук // Вісник фармації. – 2005. – № 2 (42). – С. 7–12.
4. Болотов В. В. Розробка твердоконтактного електрода, селективного до донормілу / В. В. Болотов, І. М. Іванчук, Г. Л. Кобзар // Вісник фармації. – 2007. – № 2 (50). – С. 7–10.
5. Болотов В. В. Спектрофотометричне та екстракційно-фотометричне визначення донормілу / В. В. Болотов, І. М. Іванчук // Вісник фармації. – 2005. – № 4 (44). – С. 16–19.

6. Левин Я. И. Донормил в терапии инсомнии / Я. И. Левин, К. Н. Стрыгин // Лечение нервных болезней. – 2005. – **6**, № 2 (16). – С. 9–16.
7. Левин Я. И. Клиническая сомнология: проблемы и решения / Я. И. Левин // Неврологический журнал. – 2004. – **9**, № 4. – С. 4–13.
8. Левин Я. И. Снотворные в неврологии / Я. И. Левин // Лечение нервных болезней. – 2000. – № 2. – С. 9–14.
9. Bayley M. Fatal overdose from Bendectin / M. Bayley, F. M. Walsh, M. J. Valaske // Clin. Pediatr. (Phila). – 1975. – **14** (5). – P. 507–509, 514.
10. Bockholdt B. Suicide through doxylamine poisoning / B. Bockholdt, E. Klug, V. Schneider // Forensic Sci. Int. – 2001. – **119** (1). – P. 138–140.
11. Buckley N. A. Changes in fatalities due to overdose of anxiolytic and sedative drugs in the UK (1983–1999) / N. A. Buckley, P. R. McManus // Drug Saf. – 2004. – **27** (2). – P. 135–141.
12. Haga C. Poisonings with benzodiazepine-like drugs / C. Haga // Tidsskr Nor Laegeforen. – 2003. – **123** (4). – P. 473–474.
13. Jonsson A. Fatal intoxication in a Swedish forensic autopsy material during 1992–2002 / A. Jonsson, P. Holmgren, J. Ahlner // Forensic Sci. Int. – 2004. – **143**. – P. 53–59.
14. Koppel C. Poisoning with over-the-counter doxylamine preparations: an evaluation of 109 cases / C. Koppel, J. Tenczer, K. Ibe // Hum. Toxicol. – 1987.
15. Koski A. Interaction of alcohol and drugs in fatal poisonings / A. Koski, I. Ojanpera, E. Vuori // Hum. Exp. Toxicol. – 2003. – **22** (5). – P. 281–288.
16. Lahti R. A. Fatal alcohol poisoning: medicolegal practices and mortality statistics / R. A. Lahti, E. Vuori // Forensic Sci. Int. – 2002. – **126**. – P. 203–209.
17. Lahti R. A. Fatal drug poisoning: medico-legal reports and mortality statistics / R. A. Lahti, E. Vuori // Forensic Sci. Int. – 2003. – **136**. – P. 35–46.
18. The general toxicology unknown. II. A case report: doxylamine and pyrilamine intoxication / N. B. Wu Chen, M. I. Schaffer, R. L. Lin [et al.] // J. Forensic Sci. – 1983. – **28** (2). – P. 398–403.

И. М. Иванчук, В. В. Болотов, Л. Ю. Клименко, З. В. Шовковая
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ИЗОЛИРОВАНИЯ ДОНОРМИЛА ИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ОРГАНИЗМА

Резюме

Изучены условия изолирования доноرمила из биологических жидкостей на модельных смесях с кровью и мочой с помощью различных осадителей форменных элементов крови и белков, которые чаще всего применяют в современном химико-токсикологическом анализе. Установлено, что с использованных методов наиболее эффективными являются методы изолирования доноرمила из крови и мочи в условиях обработки биологических жидкостей 0,1 М раствором кислоты хлористоводородной и использования для очистки "кислого" водного извлечения и экстракции препарата из "щелочного" водного извлечения диэтилового эфира и хлороформа соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: доноرمил, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, УФ-спектрофотометрия, фотоколориметрия, ионометрия, экстракция, изолирование из крови и мочи.

I. M. Ivanchuk, V. V. Bolotov, L. Yu. Klymenko, Z. V. Shovkova
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

DEVELOPMENT OF DONORMIL ISOLATION METHODS FROM ORGANISM BIOLOGICAL LIQUIDS

Summary

The conditions of donormil isolation from biological liquids at model mixtures with blood and urine by different precipitants of hemocytes and albumens, which are more frequent than all used in the modern chemico-toxicological analysis have been studied. It has been set that among the used methods the most effective are methods of donormil isolation from blood and urine at the conditions of treatment of biological liquids by 0,1 M hydrochloric acid solution and the using diethyl ether and chloroform for purification of acid aqueous extraction and medicine extracting from alkaline aqueous extraction respectively.

KEY WORDS: donormil, thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography, UV-spectrophotometry, photocolormetry, ionometry, extraction, isolation from blood and urine.

Отримано 28.03.11

Адреса для листування: В. В. Болотов, просп. Гагаріна, 38, кв. 63, Харків, Україна.

С. М. Береговий, Г. М. Толстанова
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ЦЕНТР "ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ" КИЇВСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОГО
УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

EGR-1 – ФАКТОР ТРАНСКРИПЦІЇ ПРИ ПАТОЛОГІЯХ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ

Наведено аналіз наявних літературних даних щодо ролі зв'язаного з ендотелієм транскрипційного фактора ранньої відповіді Egr-1 в патогенезі виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки. Показано, що Egr-1 є одним із провідних транскрипційних факторів у механізмах регуляції транскрипції в клітинах за дії стресу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **транскрипційний фактор, Egr-1, виразкова хвороба, стрес, гіпоксія.**

Мікрovasкулярний ендотеліальний бар'єр – важливий компонент підтримання інтегральної та функціональної цілісності слизової оболонки шлунково-кишкового тракту, оскільки: 1) є основою капілярного кровотоку, а отже, регулює адекватне постачання поживних речовин, оксигенацію та видалення токсичних метаболітів; 2) перешкоджає пенетрації циркулюючих лейкоцитів, інших клітин запалення та протеїнів; 3) відіграє важливу роль в імунній відповіді організму шляхом синтезу прозапальних цитокінів [9, 17]. З огляду на це, ендотеліальні клітини є мішенню для органопротекції, тому що їх захист попереджує розвиток гіпоксії та оксидативного стресу. Крім того, вони відіграють важливу роль в ангиогенезі (утворення нових кровоносних судин), який є ключовим компонентом для утворення грануляційної тканини, що формує основу для проліферації та міграції епітеліальних клітин і, відповідно, загоєння виразок. З іншого боку, надмірний/патологічний ангиогенез сприяє хронізації процесу запалення за рахунок підвищення адгезії ендотеліальних клітин до лейкоцитів та тромбоцитів і збільшеної проникності новосформованих судин. Ураження ендотелію мікросудин, що спостерігається в патогенезі виразкової хвороби шлунка і дванадцятипалої кишки, призводить до зміни в системі регуляції транскрипції клітин і, як результат, запуску експресії генів, асоційованих з розвитком судинної патології [31].

Метою даної роботи був критичний аналіз наявних літературних даних щодо ролі зв'язаного з ендотелієм транскрипційного фактора ранньої відповіді Egr-1 (Early growth response-1) в патогенезі виразкової хвороби шлунка і дванадцятипалої кишки. Зважаючи на визначну роль стресу як патогенетичного чинника цієї патології, ми присвятили один із розділів обговоренню питання щодо участі Egr-1 в реалізації стрес-реакцій.

© С. М. Береговий, Г. М. Толстанова, 2011.

EGR-1 – ТРАНСКРИПЦІЙНИЙ ФАКТОР РАННЬОЇ ВІДПОВІДІ. Транскрипційний фактор Egr-1 (також відомий як krox-24, NGFI-A, zif268) – протеїн "ранньої відповіді", який вперше був відкритий як фактор, що стимулює ріст фібробластів у відповідь на компоненти сироватки крові. Ген Egr-1 локалізований на хромосомі 5q23-q31 і складається з двох екзонів. Протеїн Egr-1 складається з 533 амінокислот і має молекулярну масу 80–82 кДа [15]. Egr-1 швидко активується численними зовнішньоклітинними стимулами (фактори росту, цитокіни) та стресорами (оксидативний стрес, гіпоксія, іонізуюче випромінювання, механічне напруження, ураження судин) [13].

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 GCGG/TGGGCG. ДНК-зв'язуючий домен Egr-1 локалізований між амінокислотами в положеннях 332 та 416. Регуляторна активність Egr-1 залежить від збалансованої дії ко-активаторів та ко-репресорів. Зміни в амінокислотній послідовності протеїну Egr-1 виявили потужну зону активації транскрипції в положеннях між амінокислотами 1 та 281 [15]. Ко-

активатори транскрипції CBP та p300 можуть прямо взаємодіяти із зоною активації транскрипції Egr-1 та збільшувати його активність [5]. Ко-репресори, такі, як NAB-1 та NAB-2, негативно регулюють активність Egr-1 [23, 24] шляхом прямої взаємодії з інгібіторним доменом молекули Egr-1, що має назву R1. Видалення R1 призводить до значного підвищення регуляторної активності Egr-1 [23]. NAB-1 конститутивно експресується різними за типом клітинами, тоді як експресія NAB-2 швидко активується факторами, що запускають експресію Egr-1.

Регуляторна активність Egr-1 перебуває в тісному взаємозв'язку з іншим цинкзв'язаним транскрипційним фактором – Sp1, сайти зв'язування якого частково перекриваються в спільній (-GGGCGG-) зоні промотора [31]. У ході досліджень *in vitro* із застосуванням рекомбінантних протеїнів встановили, що ці транскрипційні фактори можуть конкурувати один з одним за центри зв'язування в промоторній ділянці залежно від їх концентрації в ядрі ендотеліальних клітин [21]. Дослідження механізму активації експресії гена PDGF-A в культурі ендотеліальних клітин показали, що пошкодження чи дія факторів росту викликає швидке підвищення вмісту Egr-1, який витісняє Sp1 із промоторної ділянки та збільшує транскрипцію PDGF-A. Автори зробили висновок, що Sp1 відіграє роль у регуляції конститутивної експресії, тоді як Egr-1 – індукційної [21].

Індукційна експресія Egr-1 гена, що спостерігається в різних за типом клітинах судинної системи, а саме: ендотеліальних та гладком'язових клітинах, фібробластах і лейкоцитах [13, 20, 31, 38], опосередковується різними підгрупами MAP-кіназ (ERK1/2, JNK, SAPK та p38) [1]. Активація цих сигнальних шляхів призводить до взаємодії між факторами TCF (Ternary complex factors) та SRF (Serum response factor). Дані фактори зв'язуються з ділянкою SRE (Serum response element) промотора Egr-1 гена та запускають його транскрипцію [31]. Також Egr-1 належить до групи редокс-чутливих транскрипційних факторів, активність яких залежить від внутрішньоклітинного балансу між прооксидантами та антиоксидантами [19]. Оксидація по тіолових (SH)-групах цистеїнових залишків ДНК-зв'язуючого домена Egr-1 призводить до порушення формування інтер-/інтрамолекулярних дисульфідних зв'язків, конформації молекули протеїну і, як наслідок, змін в його регуляторній активності [39].

Egr-1 запускає експресію генів багатьох факторів з ангиогенною активністю (bFGF, PDGF-A, PDGF-B, VEGF, VEGFR-1, ангиопоентин 1,

протеази), а також прозапальних медіаторів (ICAM-1, VCAM-1, TNF- α , ІЛ-1 β , ІЛ-2, хемотаксичний білок моноцитів-1, тканинний фактор, GM-CSF) шляхом безпосередньої взаємодії із сіс-регуляторними елементами проксимальної промоторної ділянки гена чи шляхом міжпротеїнової взаємодії з іншими транскрипційними факторами [10–12, 31].

В дослідженнях на ізольованих ендотеліальних клітинах аорти свині апоптоз клітин, зумовлений ліпопролісахаридами стінки бактерій, був пов'язаний зі значним підвищенням рівня Egr-1 та VEGF [27].

В дослідженнях атеросклеротичних змін, спричинених фруктозною дієтою у мишей з дефіцитом рецепторів ліпопротеїнів з низькою щільністю, та неоінтимальних уражень (потовщення шару гладком'язової тканини) аорти щурів продемонстровано ко-локалізацію прозапального цитокіну фактора некрозу пухлин- α (TNF- α), фосфорильованих ERK1/2 та Egr-1 [35]. В цій же роботі встановлено, що інкубація культури гладком'язових клітин аорти щура з TNF- α супроводжувалась швидким, але короточасним зростанням експресії Egr-1 з максимальною відповіддю через 1 год після початку інкубації.

Узагальнюючи наведене вище, необхідно сказати, що Egr-1 є ключовим регуляторним протеїном в запуску прозапальної відповіді на пошкоджувальні стимули при патології судин.

EGR-1 В ПАТОГЕНЕЗІ ВИРАЗКОВОЇ ХВОРОБИ ШЛУНКА ТА ДВНАДЦЯТИПАЛОЇ КИШКИ. Виразкова хвороба включає в себе групу гетерогенних захворювань, загальним проявом яких є локальний дефект або ерозії в слизовій оболонці шлунка та дванадцятипалої кишки. На сьогодні, разом із гіперсекрецією соляної кислоти, приймання нестероїдних протизапальних препаратів та інфікування *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) є основними патогенетичними факторами виразкової хвороби [28].

В дослідженнях на ізольованих епітеліальних клітинах шлунка лінії AGS встановлено підвищення вмісту Egr-1 протеїну та його транскокацію в ядро за умов зменшення pH з 7,4 до 6,4. Цей ефект асоціювався зі збільшенням активації ERK1/2-кіназ. Більше того, зниження pH призводило до зростання експресії потужного проангіогенного фактора росту ендотеліальних клітин судин (VEGF), яке знімалося при дії антисенс-олігонуклеотиду Egr-1 [4]. Інша група дослідників [36] встановила, що інфікування епітеліальних клітин шлунка лінії AGS чи MKN-28 патогенним штамом *H. pylori* (cag+) викликало підвищення Egr-1 мРНК та протеїну і його зв'язування з ДНК, тоді як штам *H. pylori*

(*src*-) був неефективним. Застосування інгібіторів міогенактивованих протеїнкіназ ERK1/2 (PD98059), p38 (SB203580) та JNK (SP600125) виявило провідну роль ERK1/2 в регуляції *H. pylori*-зумовленої активації *Egr-1*. Аналогічні дані були отримані М. М. Abdel-Latif та співавт. [18]. Автори показали підвищений вміст *Egr-1* протеїну в біоптатах слизової оболонки антрального відділу шлунка хворих, інфікованих *H. pylori*, порівняно з біоптатами, отриманими від неінфікованих пацієнтів з нормальною слизовою чи помірним хронічним гастритом. Крім того, інкубація AGS клітин з прозапальними цитокінами (TNF- α , інтерлейкін-1) супроводжувалась зростанням експресії *Egr-1*. Встановлено, що *Egr-1* опосередковує *H. pylori*-зумовлене підвищення експресії CD44 та ICAM-1.

В дослідженнях на ізольованих ендотеліальних клітинах людини (HMEC) показано, що нестероїдні протизапальні препарати індометацин і селективний COX-2 інгібітор NS-398 вірогідно пригнічували VEGF-стимульовану експресію *Egr-1* мРНК та протеїну [25]. Відомо, що *cis*-регуляторні елементи до *Egr-1* знайдено в промоторних ділянках генів проангіогенних факторів, які, у свою чергу, здатні стимулювати експресію *Egr-1* [10, 12, 31]. Зважаючи на це, побічна виразкоутворювальна дія нестероїдних протизапальних препаратів (наприклад ібупрофену) та затримка ними гоєння виразок гастродуоденальної зони зумовлені пригніченням ангиогенезу [30], можливо, за рахунок зменшення експресії *Egr-1*.

Всебічне дослідження можливої участі *Egr-1* в ангиогенезі було проведено R. G. Fahmy та співавт. [37]. Автори показали, що зменшення вмісту *Egr-1*, за допомогою DNazymes (ДНК-ензими), які знижують експресію протеїну *Egr-1* за рахунок зв'язування зі специфічним мотивом 5'-нетрасльованої ділянки мРНК *Egr-1*, супроводжувалось пригніченням міграції ендотеліальних клітин мікросудин людини та формування мікротубул на базальній мембрані матриксу. DNazymes блокували ангиогенез у підшкірно введеної мишам пластині матригелю. Аналогічні дані було отримано в дослідіах на мишах з дефіцитом *Egr-1*. Зниження вмісту *Egr-1* супроводжувалось зменшенням розміру злоякісних пухлин за рахунок блокади ангиогенезу та пригніченням VEGF-викликаного неоваскуляризації рогівки щура.

В дослідженнях на моделі цистеамінзумовленої виразки дванадцятипалої кишки (ДПК) було продемонстровано зниження парціального тиску кисню та підвищення редокс-потенціалу і вмісту потужного вазоконстриктора

ендотеліну-1 в слизовій оболонці ДПК за умов розвитку хвороби. Ці зміни асоціювались із зростанням експресії *Egr-1*, його транслокацією в ядро та зв'язуванням з ДНК [8]. Крім того, розвиток уражень, зумовлених цистеаміном, супроводжувався посиленням фосфорилування ERK1/2-кіназ, які беруть участь в активації регуляторної активності *Egr-1*, та підвищенням вмісту проангіогенних факторів bFGF, PDGF, VEGF в слизовій оболонці ДПК. Введення щурам антисенс-олігонуклеотиду *Egr-1* призводило до розвитку більш агресивних експериментальних виразок ДПК. Механізм даного ефекту був пов'язаний з пригніченням рівня проангіогенних факторів bFGF, PDGF, VEGF та зменшенням фосфорилування ERK1/2 [33]. Дослідники припустили, що *Egr-1* є ключовим геном в мультифакторних механізмах розвитку дуоденальної виразки та її гоєння, оскільки *Egr-1* протеїн регулює експресію проангіогенних факторів росту.

Група проф. А. Тарнавського [3] розширила дані щодо ролі *Egr-1* в механізмах виразкоутворення гастродуоденальної зони. Вона провела порівняльні дослідження стану слизової оболонки шлунка молодих та літніх щурів і виявила зниження кровотоку на 60 % та виражену гіпоксію у літніх щурів відносно молодих. Гіпоксичні зміни в слизовій оболонці шлунка літніх щурів супроводжувались підвищенням експресії *Egr-1* мРНК та протеїну і зростанням його регуляторної активності. До того ж, літні щури були більш вразливими до розвитку експериментальних виразок шлунка.

Залишається відкритим питання щодо ролі *Egr-1* в механізмах стресзумовлених виразок шлунка, адже стрес є одним з основних чинників патогенезу виразкової хвороби шлунка, який опосередковує свою дію через розвиток ішемії/гіпоксії [6].

EGR-1 ТА СТРЕСЗУМОВЛЕНІ РЕАКЦІЇ ОРГАНІЗМУ. Стрес – це невід'ємна частина життя кожної людини, яка запускає захисні реакції організму, а за умов його хронічного впливу може бути чинником патологічних, іноді незворотних, змін у функціонуванні організму. Основними механізмами адаптації до дії патологічних стресорів є підвищення синтезу та секреції кортикотропін-релізінг фактора, активація центральної та периферичної норадренергічної систем, збудження чи десенситизація глюкокортикоїдних рецепторів та вивільнення адренкортикотропного гормону [22].

Почуття страху, що виникало в щурів за умов 5-хвилинного пред'явлення kota, супроводжувалось підвищенням експресії мРНК *Egr-1* в паравентрикулярних ядрах гіпотала-

муса, які належать до інтегративних структур мозку відповіді на стрес [29].

В серії робіт L. P. Filaretova та співавт. [7, 14] встановлено, що підвищення ендогенного рівня глюкокортикоїдів запускає захисні механізми за умов стресзумовлених виразок шлунка та сприяє їх загоєнню. J. Revest та співавт. [34] показали, що глюкокортикоїди, через взаємодію з глюкокортикоїдними рецепторами нейронів гіпокампа, можуть підвищувати експресію Egr-1 при стресових впливах, залучаючи два незалежних механізми: 1. Швидкий, у межах 30 хв, не залежить від активації ERK1/2-кіназного шляху. Запускається на фоні збільшеного рівня глюкокортикоїдів та пригнічується його зниженням. 2. Повільний, у межах 2 год, ERK1/2-залежний. Запускається на фоні підвищеного рівня глюкокортикоїдів, не змінюється за умов його зниження, але пригнічується інгібіторами фосфорилування ERK. Інші дослідники [16], за допомогою методу *in situ* гібридизації, встановили зростання експресії Egr-1 в зоні зубчастої звивини гіпокампу через 24 год після введення адренкортикостероїдного гормону, кортикостерону.

Повторювана, або хронічна, експозиція стресора супроводжується підвищенням біосинтезу норадреналіну в нейронах блакитної плями та клітинах мозкової речовини надниркових залоз і, як результат, активацією експресії тирозингідроксилази, яка є ключовим ферментом у синтезі катехоламінів (норадреналін, дофамін). Cis-регуляторний елемент

Egr-1, що частково перекривається із Sp1, було знайдено в промоторі гена тирозингідроксилази. Імобілізаційний стрес зумовлював зв'язування Egr-1 з промотором гена тирозингідроксилази клітин мозкової речовини надниркових залоз щура за рахунок витіснення Sp1 [26]. Водночас M. A. Hebert та співавт. [32] встановили, що за умов одноразової або повторюваної експозиції імобілізаційного стресу експресія Egr-1 не змінювалась у тирозингідроксилаза-імунореактивних нейронах блакитної плями. Хоча його рівень зростав у трійчастому мезенцефальному ядрі, прилеглому до блакитної плями.

В дослідженнях D. L. Wong та співавт. [2] було показано, що Egr-1 також бере участь в регуляції експресії адреналінсинтезуючого ферменту фенілетаноламін N-метилтрансферази (PNMT) мозковою речовиною надниркових залоз за дії імобілізаційного стресу. Підвищення експресії мРНК та протеїнів Egr-1 і Sp1, а також формування їх міжпротеїнового комплексу передували в часі збільшенню експресії мРНК та протеїну PNMT. Автори встановили, що гіпоксія, з наступним підвищенням вмісту гіпоксія-індуцибельного фактора HIF-1 α , лежить в основі запуску транскрипції PNMT, залучаючи транскрипційні фактори Egr-1 та Sp1.

Отже, наведені дані свідчать про те, що стресові впливи зумовлюють зміни в транскрипційній активності клітин, а Egr-1 є одним із провідних транскрипційних факторів у механізмах її регуляції.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Activation of MAP kinase *in vivo* follows balloon overstretch injury of porcine coronary and carotid arteries / J. M. Pyles, K. L. March, M. Franklin [et al.] // *Circ. Res.* – 1997. – **81**. – P. 904–910.
2. Adrenergic responses to stress: transcriptional and post-transcriptional changes / D. L. Wong, T. C. Tai, D. C. Wong-Fill [et al.] // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – **1148**. – P. 249–256.
3. Aging gastropathy-novel mechanisms: hypoxia, up-regulation of multifunctional phosphatase PTEN, and proapoptotic factors / A. Tarnawski, R. Pai, X. Deng [et al.] // *Gastroenterology.* – 2007. – **133**, № 6. – P. 1938–1947.
4. A new mechanism of gastric epithelial injury induced by acid exposure: the role of Egr-1 and ERK signaling pathways / M. M. Abdel-Latif, H. J. Windle, A. Davies [et al.] // *J. Cell. Biochem.* – 2009. – **108**, № 1. – P. 249–260.

5. cAMP-response-element-binding-protein-binding protein (CBP) and p300 are transcriptional co-activators of early growth response factor-1 (Egr-1) / E. S. Silverman, J. Du, A. J. Williams [et al.] // *Biochem. J.* – 1998. – Vol. 336, Pt. 1. – P. 183–189.
6. Choung R. S. Epidemiology and clinical presentation of stress-related peptic damage and chronic peptic ulcer / R. S. Choung, N. J. Talley // *Curr. Mol. Med.* – 2008. – **8**, № 4. – P. 253–257.
7. Contribution of glucocorticoids to protective influence of preconditioning mild stress against stress-induced gastric erosions / L. P. Filaretova, T. R. Bagaeva, K. Amagase, K. Takeuchi // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2008. – Vol. 1148. – P. 209–212.
8. Cysteamine alters redox state, HIF-1 α transcriptional interactions and reduces duodenal mucosal oxygenation: novel insight into the mechanisms of duodenal ulceration / T. Khomenko, X. Deng, Z. Sandor

- [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – **317**, № 1. – P. 121–127.
9. Danese S. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation / S. Danese, E. Dejana, C. Focchi // *J. Immunol.* – 2007. – **178**. – P. 6017–6022.
 10. Early Growth Response-1 Induces and Enhances Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression in Lung Cancer Cells / H. Shimoyamada, T. Yazawa, H. Sato [et al.] // *Am. J. Pathol.* – 2010. – **177**, № 1. – P. 70–83.
 11. Early growth response-1 regulates angiopoietin-1-induced endothelial cell proliferation, migration, and differentiation / N. A. Abdel-Malak, M. Mofarrah, D. Mayaki [et al.] // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – Vol. 29, №2. – P. 209–216.
 12. Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress / S. F. Yan, T. Fujita, J. Lu [et al.] // *Nature Medicine.* – 2000. – Vol. 6. – P. 1355–1361.
 13. Egr-1-induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury / L. M. Khachigian, V. Lindner, A. J. Williams, T. Collins // *Science.* – 1996. – **271**, № 5254. – P. 1427–1431.
 14. From gastroprotective to proulcerogenic action of glucocorticoids on the gastric mucosa / L. Filaretova, O. Morozova, T. Bagaeva, T. Podvigina // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2009. – **60**, Suppl. 7. – P. 79–86.
 15. Gashler A. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors / A. Gashler, V. P. Sukhatme // *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* – 1995. – Vol. 50. – P. 191–224.
 16. Hansson A. C. Time-course of immediate early gene expression in hippocampal subregions of adrenalectomized rats after acute corticosterone challenge / A. C. Hansson, K. Fuxe // *Brain. Res.* – 2008. – **1215**. – P. 1–10.
 17. Hatoum O. A. The vascular contribution in the pathogenesis of inflammatory bowel disease / O. A. Hatoum, H. Miura, D. G. Binion // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2003. – **285**. – P. 1791–1796.
 18. Helicobacter pylori activates the early growth response 1 protein in gastric epithelial cells / M. M. Abdel-Latif, H. J. Windle, K. A. Fitzgerald [et al.] // *Infect. Immun.* – 2004. – **72**, № 6. – P. 3549–3560.
 19. Huang 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 / R. P. Huang, E. D. Adamson // *DNA Cell. Biol.* – 1993. – **12**, № 3. – P. 265–273.
 20. Khachigian L. M. Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology / L. M. Khachigian // *Circ. Res.* – 2006. – **98**, № 2. – P. 186–191.
 21. Khachigian L. M. Interplay of Sp1 and Egr-1 in the proximal PDGF-A promoter in cultured vascular endothelial cells / L. M. Khachigian, A. J. Williams, T. Collins // *J. Biol. Chem.* – 1995. – **270**. – P. 27679–27686.
 22. Mayer E. A. The neurobiology of stress and gastrointestinal disease / E. A. Mayer // *Gut.* – 2000. – **47**, № 6. – P. 861–869.
 23. Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain / A. H. Swirnoff, E. D. Apel, J. Svaren, B. R. Sevetson // *Mol. Cell. Biol.* – 1998. – **18**, № 1. – P. 512–524.
 24. NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli / J. Svaren, B. R. Sevetson, E. D. Apel [et al.] // *Mol. Cell. Biol.* – 1996. – **16**, № 7. – P. 3545–3553.
 25. NSAIDs inhibit the activation of egr-1 gene in microvascular endothelial cells. A key to inhibition of angiogenesis? / I. L. Szabo, R. Pai, B. Soreghan [et al.] // *J. Physiol. Paris.* – 2001. – **95**, № 1–6. – P. 379–383.
 26. Papanikolaou N. A. Sp1/Egr1 motif: a new candidate in the regulation of rat tyrosine hydroxylase gene transcription by immobilization stress / N. A. Papanikolaou, E. L. Sabban // *J. Neurochem.* – 1999. – **73**, № 1. – P. 433–436.
 27. Protective effect of carbon monoxide preconditioning on LPS-induced endothelial cell stress / C. Bernardini, A. Zannoni, M. L. Bacci, M. Forni // *Cell. Stress. Chaperones.* – 2010. – **15**, № 2. – P. 219–224.
 28. Ramakrishnan K. Peptic ulcer disease / K. Ramakrishnan, R. C. Salinas // *Am. Fam. Physician.* – 2007. – **76**, № 7. – P. 1005–1012.
 29. Rosen J. B. Expression of egr-1 (zif268) mRNA in select fear-related brain regions following exposure to a predator / J. B. Rosen, R. E. Adamec, B. L. Thompson // *Behav. Brain. Res.* – 2005. – **162**, № 2. – P. 279–288.
 30. Sanchez-Fidalgo S. Angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in gastric ulcer healing. Effect of a selective cox-2 inhibitor / S. Sanchez-Fidalgo, I. Martin-Lacave, M. Illanes // *Eur. J. Pharmacol.* – 2004. – **505**, № 1–3. – P. 187–194.
 31. Silverman E. S. Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology / E. S. Silverman, T. Collins // *Am. J. Pathol.* – 1999. – **154**, № 3. – P. 665–670.
 32. Single and repeated immobilization stress differentially trigger induction and phosphorylation of several transcription factors and mitogen-activated protein kinases in the rat locus coeruleus / M. A. Hebert, L. I. Serova, E. L. Sabban [et al.] // *J. Neurochem.* – 2005. – Vol. 95. – P. 484–498.
 33. Suppression of early growth response factor-1 with egr-1 antisense oligodeoxynucleotide aggravates experimental duodenal ulcers / T. Khomenko, S. Szabo, X. Deng [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* – 2006. – **290**. – P. 1211–1218.
 34. The MAPK pathway and Egr-1 mediate stress-related behavioral effects of glucocorticoids / J. Revest, B. Francesco, K. Pierre [et al.] // *Nature Neuroscience.* – 2005. – **8**. – P. 664–672.
 35. TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2 / S. Goetze, U. Kintscher, K. Kaneshiro [et al.] // *Atherosclerosis.* – 2001. – **159**. – P. 93–101.
 36. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by cag+ Helicobacter pylori induces upregulation of the early growth response gene Egr-1 in gastric epithelial cells / S. Keates, A. C. Keates, S. Nath [et al.] // *Gut.* – 2005. – **54**, № 10. – P. 1363–1369.
 37. Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth / R. G. Fahmy, C. R. Dass, L. Q. Sun [et al.] // *Nat. Med.* – 2003. – **9**, №8. – P. 1026–1032.

38. Wang C. C. Early growth response gene-1 expression in vascular smooth muscle cells effects of insulin and oxidant stress / C. C. Wang, G. Sharma, B. Draznin // Am. J. Hypertens. – 2006. – **19**, № 4. – P. 366-372.

39. Webster K. A. Oxidation of zinc finger transcription factors: physiological consequences / K. A. Webster, H. Prentice, N. H. Bishopric // Antioxid. Redox. Signal. – 2001. – **3**, №4. – P. 535–548.

С. М. Береговой, А. Н. Толстанова
УЧЕБНО-НАУЧНЫЙ ЦЕНТР “ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ” КИЕВСКОГО НАЦИОНАЛЬНОГО
УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ ТАРАСА ШЕВЧЕНКО

EGR-1 – ФАКТОР ТРАНСКРИПЦИИ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Резюме

Приведен анализ существующих литературных данных касательно роли связанного с эндотелием транскрипционного фактора раннего ответа Egr-1 в патогенезе язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Показано, что Egr-1 является одним из ведущих транскрипционных факторов в механизмах регуляции транскрипции клеток под действием стресса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: транскрипционный фактор, Egr-1, язвенная болезнь, стресс, гипоксия.

S. M. Berehovyi, H. M. Tolstanova
EDUCATIONAL-SCIENTIFIC CENTER “INSTITUTE OF BIOLOGY” OF TARAS SHEVCHENKO
KYIV NATIONAL UNIVERSITY

EGR-1 -TRANSCRIPTION FACTOR IN PATHOGENESIS OF GASTROINTESTINAL TRACT

Summary

We reviewed available data on the role of endothelium-associated transcription factor early response Egr-1 in the pathogenesis of gastric and duodenal ulcer disease. We showed that Egr-1 is one of the main transcription factor in the regulation of cell transcriptional activity during stress response.

KEY WORDS: transcription factor, Egr-1, ulcer disease, stress, hypoxia.

Отримано 22.04.11

Адреса для листування: Г. М. Толстанова, вул. Кіквідзе 15-16, Київ, 03022, Україна.