

Академія медичних наук України

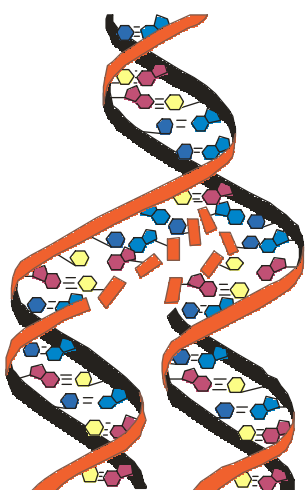
Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця

Українська Академія наук

МЕДИЧНА ХІМІЯ

НАУКОВИЙ ЖУРНАЛ



Academy of Medical Sciences of Ukraine

Ternopil State Medical University by I.Ya. Horbachevsky

National Medical University by O.O. Bogomolets

Ukrainian Academy of Sciences

MEDICAL CHEMISTRY

SCIENTIFIC JOURNAL

2 TOM 9
2007

- ❖ *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 з 1999 року
Published since 1999

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

Передплатний індекс: 22869
Subscription index: 22869

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

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

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) 52-78-54
(0352) 52-44-92

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"
поширення на журнал обов'язкове.

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

Зміст

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

- Ковальов Г.О., Черкашина Д.В., Петренко О.Ю. (Харків)
ВПЛИВ ХРОНІЧНОГО ОТРУЄННЯ АЛКОГОЛЕМ НА
ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМУ
ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ 5
- Ганусова Г.В., Каліман П.А. (Харків) АКТИВНІСТЬ
ДЕЯКИХ NADP-ЗАЛЕЖНИХ ДЕГІДРОГЕНАЗ ТА
ВМІСТ ЦИТОХРОМІВ P-450 I b₅ У ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ
ПРИ ВВЕДЕННІ ХЛОРИДУ РТУТІ 10
- Демків І.Я., Гонський Я.І., Кліщ І.М. (Тернопіль)
СТАН ЗАХИСНИХ СИСТЕМ ОРГАНІЗМУ ПРИ
КОМБІНОВАНОМУ ВВЕДЕННІ СПИРТУ ЕТИЛОВОГО
ТА СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ 14
- Чорна В.І., Лянна О.Л., Тарковська А.В., Татаровський О.П.
(Дніпропетровськ) ОСОБЛИВОСТІ КІНЕТИКИ
ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛІЗУ ЛІЗОСОМНОГО
ЦИСТЕЇНОВОГО КАТЕПСИНУ Н ПРИ
КАНЦЕРОГЕНЕЗІ 20
- Целевич М.В., Мандзинець С.М., Санагурський Д.І.
(Львів) КАТІОННА СПЕЦИФІЧНІСТЬ Na⁺, K⁺-АТФази
МЕМБРАН ЗАРОДКІВ В'ЮНА 24
- Комаревцева І.О., Андросова М.Є. (Луганськ) ВПЛИВ
АКТИВАЦІЇ ПЕРИФЕРИЧНИХ ОПІАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ
НА ВМІСТ СТАБІЛЬНИХ МЕТАБОЛІТІВ ОКСИДУ
АЗОТУ, ВІЛЬНОГО СФІНГОЗИНУ, ОКСИДАНТНО-
АНТИОКСИДАНТНИЙ СТАН ПРИ ЕКСПЕРИМЕН-
ТАЛЬНОМУ ОКИСНОМУ СТРЕСІ МІОКАРДА 29
- Швець В.М. (Запоріжжя) ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЗМІНИ
СТАНУ ПУЛУ ПІРИДИНОВИХ КОФЕРМЕНТІВ У СЕРЦІ
ЩУРІВ ПРИ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОМУ СТРЕСІ 34
- Бойків А.Б., Мисула І.Р. (Тернопіль) АКТИВНІСТЬ
ТРАНСАМІНАЗ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ПІДДОСЛІДНИХ
ГРУП ТВАРИН З АДРЕНАЛІНОВОЮ МІОКАРДІО-
ПАТІЄЮ ПРИ РІЗНИХ ТИПАХ ЗАПАЛЬНОЇ РЕАКЦІЇ 38
- Владимирова І.М., Кисличенко В.С. (Харків) ВИВЧЕННЯ
ЛІПОФІЛЬНИХ ФРАКЦІЙ КАПУСТИ БРОККОЛІ
СОРТІВ ТОНУС, КАЛАБРАЙЗЕ, ВІТАМІННА 42
- Білець М.В., Леонтьєва Ф.С., Тарасенко Л.М. (Харків)
МЕТАБОЛІЗМ ПРОТЕОГЛІКАНІВ КІСТКОВОЇ
ТКАНИНИ РІЗНИХ ВІДДІЛІВ СКЕЛЕТА ЗА УМОВ
ЕМОЦІЙНОГО СТРЕСУ, НЕДОСТАТНОСТІ ГОНАД
ТА ЇХ ПОЄДНАНОГО ВПЛИВУ 46
- Галиця В.В., Воскобойнік О.Ю., Кривошей О.В.,
Беленічев І.Ф., Коваленко С.І., Карпенко О.В.
(Запоріжжя) ПОХІДНІ [1,2,4]-ТРИАЗИНО[2,3-с]-
ТА [1,2,4]-ТРИАЗИНО[4,3-с]-ХІНАЗОЛІНІВ –
ПЕРСПЕКТИВНІ СПОЛУКИ З АНТИОКСИДАНТНОЮ
І НООТРОПНОЮ ДІЯМИ 50
- Романовська І.І. (Одеса) ІММОБІЛІЗАЦІЯ ЛІЗОЦИМУ
В ПОЛІ-N-ВІНІЛПІРОЛІДОН 55
- Головенко М.Я., Борисюк І.Ю., Ларіонов В.Б., Ліхота О.Б.
(Одеса) ОСОБЛИВОСТІ ФАРМАКОКІНЕТИКИ ЕТАНОЛУ
В ОРГАНІЗМІ БІЛИХ МИШЕЙ 60
- Корнет М.М., Бражко О.А., Завгородній М.П., Омелян-
чик Л.О. (Запоріжжя) БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ
ДЕЯКИХ S-(ХІНОЛІН-4-ІЛ) ЗАМІЩЕНИХ ЦИСТЕЇНУ 65
- Міхєєв А.О., Горбань Є.М. (Чернівці, Київ)
ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ПРОТЕОЛІЗУ,
ФІБРИНОЛІЗУ ТА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ
ЛІПІДІВ У КІРКОВІЙ РЕЧОВИНІ НИРОК ЩУРІВ
РІЗНОГО ВІКУ 70

Contents

ORIGINAL INVESTIGATIONS

- Kovalyov H.O., Cherkashyna D.V., Petrenko O.Yu.
(Kharkiv) INFLUENCE OF CHRONIC ALCOHOL
POISONING ON PROOXIDANT/ANTIOXIDANT
SYSTEM OF RAT BRAIN 5
- Hanusova H.V., Kaliman P.A. (Kharkiv) ACTIVITY OF SOME
NADP-DEPENDENT DEHYDROGENASES AND CYTO-
CHROME P-450 AND b₅ CONTENTS IN THE RAT
LIVER AFTER INJECTION OF MERCURY CHLORIDE 10
- Demkiv I.Ya., Honsky Ya.I., Klishch I.M. (Ternopil)
CONDITION OF PROTECTIVE SYSTEMS OF
ORGANISM AT COMBINED INTRODUCTION OF ETHYL
ALCOHOL AND SALTS OF HEAVY METALS 14
- Chorna V.I., Lyanna O.L., Tarkovska A.V., Tatarovsky O.P.
(Dnipropetrovsk) FEATURES OF KINETICS OF
FERMENTATIVE CATALYSIS OF LYSOSOMAL
CYSTEINE CATHEPSIN H FROM THYROID
TUMORS 20
- Tselevych M.V., Mandzynets S.M., Sanahursky D.I. (Lviv)
Na⁺, K⁺-ATPase CATIONIC SPECIFICITY OF THE LOACH
EMBRYO MEMBRANES 24
- Komarevtseva I.O., Androsova M.Ye. (Luhansk) INFLUENCE
OF PERIPHERAL OPIOID RECEPTORS ACTIVATION
ON THE NITROGEN OXIDE STABLE METABOLITES
CONTENTS, FREE SPHINGOSINE LEVEL, ACTIVITY OF
oxidant-ANTIOXIDANT SYSTEM IN EXPERIMENTAL
OXIDIZING STRESS OF MYOCARDIUM 29
- Shvets V.M. (Zaporizhyan) AGE-SPECIFIC PECULIARITIES
OF CHANGE OF PYRIDINE COENZYMES POOL STATE
IN RAT HEART AT IMMOBILIZATION STRESS 34
- Boykiv A.B., Mysula I.R. (Ternopil) ACTIVITY OF TRANS-
AMINASES IN BLOOD SERUM OF EXPERIMENTAL
ANIMAL GROUPS WITH ADRENALIN MYOCARDIO-
PATHY AT DIFFERENT TYPES OF INFLAMMATORY
REACTION 38
- Vladymyrova I.M., Kyslychenko V.S. (Kharkiv) STUDY
OF LIPOPHILIC FRACTIONS OF BROCCOLI CABBAGE
SPECIES TONUS, KALABRAYZE AND VITAMINIC 42
- Bilets M.V., Leontyeva Fh.S., Tarasenko L.M. (Kharkiv)
METABOLISM OF PROTEOGLYCANS OF BONE
TISSUE IN DIFFERENT PARTS OF THE SKELETON
UNDER EMOTIONAL STRESS, GONADE DEFICIENCY
AND THEIR COMBINED ACTION 46
- Halytsya V.V., Voskoboynik O.Yu., Kryvoshey O.V.,
Belenichev I.F., Kovalenko S.I., Karpenko O.V.
(Zaporizhyan) [1,2,4]-TRIAZINO[2,3-c]- AND [1,2,4]-
TRIAZINO[4,3-c]-QUINAZOLINES DERIVATIVES ARE
PERSPECTIVE COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT
AND NOOTROPIC ACTIVITY 50
- Romanovska I.I. (Odesa) LYSOCYME IMMOBILIZATION
IN POLY-N-VINYL PYRROLIDONE 55
- Holovenko M.Ya., Borysyuk I.Yu., Larionov V.B., Likhota O.B.
(Odesa) FEATURES OF PHARMACOKINETICS OF
ETHANOL IN THE ORGANISM OF WHITE MICE 60
- Kornet M.M., Brazhko O.A., Zavorodniy M.P., Omelyan-
chik L.O. (Zaporizhyan) BIOLOGICAL ACTIVITY OF SOME
S-(CHINOLIN-4-IL)SUBSTITUTES OF CYSTEIN 65
- Mikheev A.O., Horban Ye.M. (Chernivtsi, Kyiv)
PECULIARITIES OF PROTEOLYSIS, FIBRINOLYSIS
AND LIPID PEROXIDATION IN RENAL CORTICAL
SUBSTANCE AT DIFFERENT-AGED RATS 70

Підгірний В.В. (Тернопіль) ГЕПАТОТОКСИЧНІ ПРОЯВИ
ЛАНСОПРАЗОЛУ, МЕТРОНІДАЗОЛУ
І КЛАРИТРОМІЦИНУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

74

Криклива І.О., Грудько В.О., Рубан О.А. (Харків)
КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЕКОНАЗОЛУ ТА
КСЕРОФОРМУ В СКЛАДІ МАЗІ НА ПЕО-ОСНОВІ

78

Георгіянц В.А., Шиньова Н.В., Перехода Л.О., Сич І.А.
(Харків, Донецьк) СИНТЕЗ ПОХІДНИХ ОКСАНИЛОВИХ
КИСЛОТ ЯК НАПІВПРОДУКТІВ У СИНТЕЗІ
БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

82

Рехлецька О.В., Калинюк Т.Г., Гудзь Н.І., Федущак Н.К.
(Львів) КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ
У ЛОСЬЙОНАХ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ІНФЕКЦІЙНИХ
ЗАХВОРЮВАНЬ ШКІРИ

87

МЕТОДИ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Юкало В.Г., Сторож Л.А. (Тернопіль) ВИДІЛЕННЯ
ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНО ГОМОГЕННОЇ ФРАКЦІЇ
β-CN-5P-КАЗЕІНУ КОРОВ'ЯЧОГО МОЛОКА

91

Маковик Ю.В., Книш Є.Г., Панасенко О.І. (Запоріжжя)
СИНТЕЗ, ПЕРЕТВОРЕННЯ, ПРОТИМІКРОБНА ТА
ПРОТИГРИБКОВА АКТИВНІСТЬ У РЯДІ 5-(ПІРИДИН-
3-ІЛ)-4-R-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТІОНІВ

95

Герашченко І.І., Гунько В.М., Гацький О.О. (Київ)
КІЛЬКІСНИЙ ОПИС ВЗАЄМОДІЇ НАНОРОЗМІРНОГО
КРЕМНЕЗЕМУ З ЕРИТРОЦИТАМИ

99

Каплаушенко А.Г., Книш Є.Г., Панасенко О.І. (Запо-
ріжжя) СИНТЕЗ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ
У РЯДІ 5-БЕНЗИЛІДЕН-2-(2-,3-,4-НІТРОФЕНІЛ)
ТІАЗОЛ[3,2-b][1,2,4]ТІАЗОЛ-6-(5Н)-ОНІВ

103

ОГЛЯДИ

Влізло В.В., Вербицький П.І. (Львів) ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК
МІЖ ТРАНСМІСИВНИМИ СПОНГІФОРМНИМИ
ЕНЦЕФАЛОПАТІЯМИ ТВАРИН ТА ЛЮДИНИ

107

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

Набока О.І. (Харків) ГІПОТЕНЗИВНА ДІЯ КАРБОРЕНУ
В УМОВАХ ІНДОМЕТАЦІЙНОЇ І ВАЗОРЕНАЛЬНОЇ
ГІПЕРТЕНЗІЇ

112

Упир Л.В., Кисличенко В.С., Тартинська А.С. (Харків)
ВИВЧЕННЯ МІКРОЕЛЕМЕНТНОГО СКЛАДУ
ЛИСТЯ АБРИКОСА ЗВЧАЙНОГО

115

Вринчану Н.О. (Київ) ВПЛИВ ХЕЛАТУЮЧОГО АГЕНТА
НА ЧУТЛИВІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ PSEUDOMONAS
ДО НОВОГО ПОХІДНОГО АДАМАНТАНУ

118

Марчишин С.М., Калушка О.Б. (Тернопіль) ХІМІЧНІ
ТА ТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПИРІУ
ПОВЗУЧОГО

121

Красюк Е.К., Алексєєва Н.Г., Брюзгіна Т.С. (Київ)
ВИВЧЕННЯ ЗМІН ЖИРНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ
ЛІПІДІВ КРОВІ У ХВОРИХ ІЗ ХРОНІЧНОЮ
НИРКОВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ

124

Андрейчин С.М., Лихацька Т.В. (Тернопіль) МАРКЕРИ
КІСТКОВОГО МЕТАБОЛІЗМУ ТА ДЕСТРУКЦІЇ
СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ
ЗАПАЛЬНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ГАСТРОДУОДЕНО-
ПАНКРЕАТИЧНОЇ ЗОНИ І ПЕЧІНКИ

127

Ільченко О.В., Пентюк О.О., Заїчко Н.В., Азаров О.С.
(Вінниця) КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМІЗОНУ В ПЛАЗМІ
КРОВІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ
ХРОМАТОГРАФІЇ

130

Pidgirnyy V.V. (Ternopil) HEPATOTOXIC INFLUENCE
OF LANSOPRAZOLE, METRONIDAZOLE
AND CLARITHROMYCINE IN EXPERIMENT

Kryklyva I.O., Hrudko V.O., Ruban O.A. (Kharkiv)
QUANTITATIVE DETERMINATION OF ECONASOL
AND XEROFORM IN THE OINTMENT COMPOSITION
ON THE BASE OF MACROGOL

Georgiyants V.A., Shynyova N.V., Perekhoda L.O., Sych I.A.
(Kharkiv, Donrsk) SYNTHESIS OF DERIVATIVES OF
OXALIC ACIDS AS SEMI-PRODUCTS IN THE
SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

Rekhletska O.V., Kalynyuk T.G., Hudz N.I., Feduschak N.K.
(Lviv) QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOID
IN LOTIONS INTENDED TO INFECTIOUS SKIN
DISEASES TREATMENT

METHODS OF BIOCHEMICAL INVESTIGATIONS

Yukalo V.H., Storozh L.A. (Ternopil) ISOLATION
OF ELECTROPHORETICAL HOMOGENOUS
β-CN-5P FRACTION OF COW MILK CASEIN

Makovyk Yu.V., Knysh Ye.H., Panasenko O.I.
(Zaporizhyan) SYNTHESIS, TRANSFORMATION,
ANTIMICROBIAL AND ANTIFUNGUS ACTIVITY OF 5-
(PYRIDIN-3-IL)-4-R-1,2,4-TRIAZOLE-3-THIONS

Herashchenko I.I., Hunko V.M., Hatskiy O.O. (Kyiv) QUANTI-
TATIVE DESCRIPTION OF INTERACTION BETWEEN
SILICA NANOPARTICLES AND RED BLOOD CELLS

Kaplaushenko A.H., Knysh Y.H., Panasenko O.I. (Zapori-
zhyan) THE SYNTHESIS AND PHARMACOLOGIC ACTIVI-
TY IN THE LINE 5-BENZYLIDENE-2-(2-,3-,4-NITRO-
PHENYL)THIAZOLO[3,2-b][1,2,4-TRIAZOL-6-(5H)-ONES

REVIEWS

Vlizlo V.V., Verbytsky P.I. (Lviv) INTERRELATIONSHIP
BETWEEN TRANSMISSIBLE SPONGIFORM
ENCEPHALOPATHIES OF ANIMALS AND HUMAN

BRIEF REPORTS

Naboka O.I. (Kharkiv) HYPOTENSIVE ACTION
OF KARBOREN UNDER CONDITIONS
OF INDOMETACIN AND VASORENAL HYPERTENSION

Upr L.V., Kyslychenko V.S., Tartynska A.S. (Kharkiv)
STUDY OF MICROELEMENT COMPOSITION
OF APRICOT LEAVES

Vrynchanu N.O. (Kyiv) INFLUENCE OF CHELATIRING
AGENT ON SENSITIVITY OF PSEUDOMONAS GENUS
BACTERIA TO ADAMANTINE DERIVATIVE

Marchyshyn S.M., Kalushka O.B. (Ternopil) CHEMICAL
AND TECHNOLOGICAL ASPECTS OF THE COUCH-
GRASS RESEARCH

Krasyuk E.K., Alekseyeva N.H., Bryuzgina T.S. (Kyiv)
INVESTIGATION OF CHANGES OF FATTY-ACID
STRUCTURE OF BLOOD LIPIDS AT PATIENTS WITH
CHRONIC RENAL INSUFFICIENCY

Andreychyn S.M., Lykhatska T.V. (Ternopil) MARKERS
OF BONE METABOLISM AND DESTRUCTION OF
CONNECTIVE TISSUE IN PATIENTS WITH CHRONIC
INFLAMMATORY DISEASE OF GASTRODUODENO-
PANCREATIC AREA AND LIVER

Ilchenko O.V., Pentyuk O.O., Zaichko N.V., Azarov O.S.
(Vinnytsia) QUANTITATIVE DETERMINATION OF AMIZONE
IN BLOOD PLASMA BY HIGHLY-EFFECTIVE LIQUID
CHROMATOGRAPHY METHOD

УДК 615.099:577.151.042:599.323.4-148.11

ВПЛИВ ХРОНІЧНОГО ОТРУЄННЯ АЛКОГОЛЕМ НА ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНУ СИСТЕМУ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ

Г.О. Ковальов, Д.В. Черкашина, О.Ю. Петренко
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

Вивчено вплив хронічного отруєння алкоголем на показники прооксидантно-антиоксидантного стану головного мозку щурів-самиць. Показано, що тривале приймання етанолу у високих дозах призводить до порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу головного мозку, зокрема до активації ПОЛ (збільшення кількості ТБК-активних продуктів, підвищення інтенсивності індукованого ПОЛ) і пригнічення антиоксидантної системи (зменшення глутатіонпероксидазної і каталазної активності).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хронічне отруєння алкоголем, головний мозок, щури-самиці, перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантна система.

ВСТУП. Процеси вільнорадикального окиснення у нормі перебігають в усіх органах та тканинах організму, зокрема у головному мозку, однак їх надмірна активація є універсальним механізмом деградації біомембран при багатьох патологічних станах [5]. У відповідь на вплив пошкоджувального чинника відбувається порушення прооксидантно-антиоксидантного балансу, яке у подальшому може набути генералізованої форми [1]. Гематоенцефалічний бар'єр легко пропускає етанол, який гарно сорбується тканиною мозку, що пояснюється високим вмістом води та інтенсивною васкуляризацією. Систематичне вживання алкогольних напоїв – значно поширене у сучасному суспільстві явище [4, 9]. Згідно з доповіддю ВООЗ, вживання алкоголю у світі, зокрема в Європі, в останні десятиріччя зростає [19]. Так, на початку нового тисячоліття серед працездатної частини населення України відсоток алкоголезалежних складав 8,8 [10]. Крім того, є дані про посилення клінічної картини алкогольної патології [13]. Оксидативний стрес є важливим механізмом реалізації деструктивних ефектів етанолу на головний мозок [16, 17, 20].

Традиційно моделювання патологічних процесів, які супроводжуються розвитком оксидативного стресу, виконують на самцях. Відомості про вплив етанолу на стан пере-

кисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у головному мозку самиць розрізнені та рідко зустрічаються. Беручи до уваги зростання хронічного зловживання алкоголем серед жінок [14] та враховуючи той факт, що у них швидше формується пристрасть до алкоголю [22], уточнення механізмів його впливу на окиснювально-антиоксидантний гомеостаз головного мозку самиць може мати важливе значення для сучасної клініки.

Метою роботи була оцінка впливу етанолу на інтенсивність ПОЛ і активність ферментів системи антиоксидантного захисту (АОЗ) головного мозку щурів-самиць при хронічному отруєнні алкоголем (ХОА).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти проводили згідно із “Загальними принципами експериментів на тваринах”, схваленими на I Національному конгресі з біоетики (Київ, Україна, 2001) та узгодженими з положеннями “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, Франція, 1985). У роботі використовували білих безпородних щурів-самиць (n=14). На момент початку експерименту вік тварин складав 3 місяці. До контрольної групи ввійшли щури тієї ж статі та віку, вони одержували аналогічну дієту, але без етанолу. Моделювали

© Г.О. Ковальов, Д.В. Черкашина, О.Ю. Петренко, 2007.

ХОА, як було описано нами раніше [12]. Модель включала три етапи: I етап – відбір тварин, схильних до алкоголізації, II етап – звикання до алкоголю (2 тижні), III етап – інтенсивна алкоголізація (11 тижнів). У цей час замість звичайної дієти щури одержували 96 % розчин етанолу на стандартних шматочках білого хліба, 2 рази на тиждень – пагони вівса. Прийнята кожною твариною доза алкоголю складала 14-18 г/кг маси тіла на добу.

В останній день експерименту тварин декапітували, готували 25 % гомогенат на 50 mM *tris*-HCl буфері, що містив 50 mM NaCl (pH-7,4). У гомогенатах головного мозку вивчали базальний рівень ТБК-активних продуктів згідно з методом [1], показник виражали у пмоль МДА/мг білка. Також досліджували інтенсивність індукованого ПОЛ. Для цього гомогенат інкубували 10 хв у середовищі (pH-7,4), що містило 50 mM *tris*-HCl, 50 mM NaCl, 0,25 mM аскорбату й 12 mM FeSO_4 . Швидкість накопичення ТБК-активних продуктів вивчали згідно з методом [3], виражали у пмоль МДА/мг білка за 1 хв. Активність каталази досліджували за зменшенням вмісту перекису водню при довжині хвилі 240 нм [6], виражали у мкмоль H_2O_2 /мг білка за 1 хв. Активність глутатіонпероксидази визначали за зниженням вмісту відновленого глутатіону, виражали у мкмоль GSSG/мг білка за 1 хв [21]. Вміст білка у гомогенаті головного мозку оцінювали за допомогою біуретового методу. Інтенсивність поглинання зразків визначали на спектрофотометрі "Cary-50" (Австралія).

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерного пакета програм "Statistica v.5.5", вивчаючи U-критерій Манна-Уїтні ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Прооксидантний статус клітин головного мозку оціню-

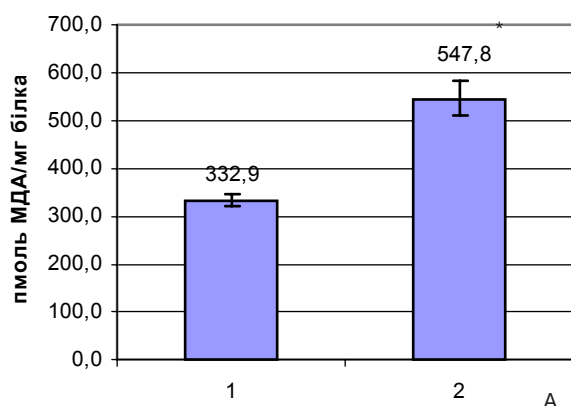


Рис. 1. Базальний рівень ТБК-активних продуктів (А) та інтенсивність індукованого ПОЛ (Б) у головному мозку тварин контрольної (1) та експериментальної (2) груп.

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

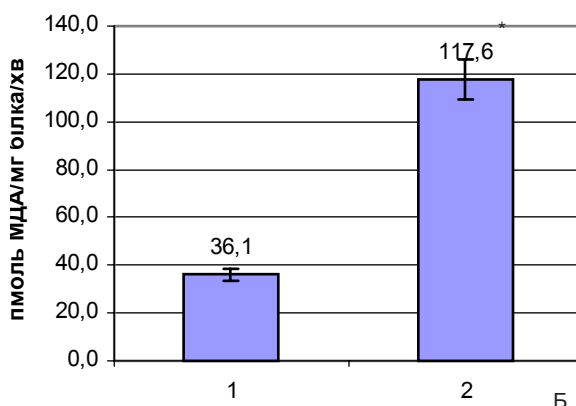
вали за базальним рівнем ТБК-активних продуктів та інтенсивністю неферментативного Fe^{2+} -аскорбатіндукованого ПОЛ. Базальний рівень ТБК-активних продуктів у експериментальній групі складав ($547,8 \pm 36,7$), у контрольній – ($332,9 \pm 12,8$) пмоль МДА/мг білка. Швидкість накопичення ТБК-активних продуктів у експериментальній і контрольній групах становила ($117,6 \pm 8,3$) і ($36,1 \pm 5,5$) пмоль МДА/мг білка за 1 хв відповідно (рис. 1).

Таким чином, спостерігалось збільшення базального рівня в 1,7 раза та швидкості накопичення ТБК-активних продуктів у 3,3 раза, що свідчить про стимуляцію процесів ПОЛ.

Стан системи АОЗ головного мозку алкоголізованих щурів характеризували за зміною активності її основних ферментативних складників. Так, глутатіонпероксидазна активність у головному мозку тварин експериментальної групи складала ($0,188 \pm 0,012$), контрольної – ($0,309 \pm 0,014$) мкмоль GSSG/мг білка за 1 хв. Разом із тим, каталазна активність була на рівні ($11,7 \pm 0,5$) і ($16,3 \pm 0,7$) мкмоль H_2O_2 /мг білка за 1 хв відповідно (рис. 2).

Наведені результати демонструють зниження глутатіонпероксидазної активності в 1,6 раза, каталазної – в 1,4 раза, що свідчить про пригнічення роботи системи АОЗ під впливом етанолу.

В усіх живих системах існують прооксидантні чинники та механізми, стримування яких відбувається за рахунок системи АОЗ. Для пояснення причин розвитку оксидативного стресу при ХОА необхідно коротко зупинитися на особливостях метаболізму етанолу. Відомо, що при тривалому надходженні алкоголю у високих дозах значна його кількість руйнується за альтернативним, алкогольдегідрогеназа-незалежним шляхом з участю мітосомальної системи, що окиснює алкоголь. Окиснення за цим шляхом відбувається під впливом цито-



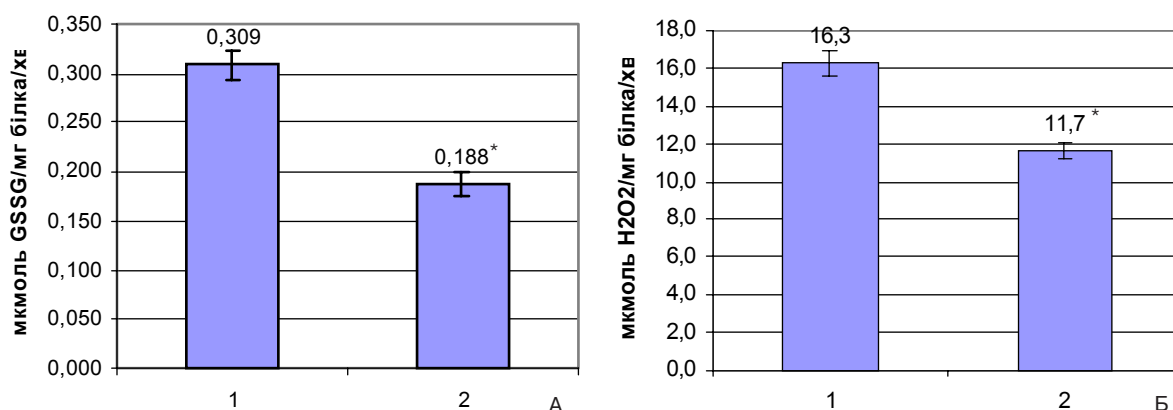


Рис. 2. Глутатіонпероксидазна (А) та каталазна активність у головному мозку тварин контрольної (1) та експериментальної (2) груп (Б).

Примітка. * – $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

хрому Р-450, при цьому як побічні продукти утворюються активні форми кисню, що залучаються до ланцюгових реакцій ПОЛ [8]. Цікаво, що система цитохрому Р-450 широко представлена у головному мозку [11]. Отже, цитохром Р-450-залежний шлях генерації вільних радикалів у клітинах головного мозку при ХОА може робити значний внесок у розвиток оксидативного стресу. Незалежно від шляху окиснення етанолу проміжним продуктом його метаболізму завжди виступає ацетальдегід, при утилізації якого також утворюються активні форми кисню (АФК) [15]. Розвиток перекисних процесів викликає руйнування молекул антиоксидантів, зміну фосфоліпідного складу мембран, внаслідок чого порушується їх структурно-функціональна цілісність. Підвищення проникності мембран клітинних органел призводить до вивільнення гідролітичних ферментів, порушення іонного гомеостазу, зниження мембранного потенціалу, що, у свою чергу, супроводжується роз'єднанням окиснювального фосфорилування у мітохондріях, що є критичним фактором для енергетичного стану клітини [2]. Ці події підсилюються тим, що як різноманітні продукти ПОЛ, так і ацетальдегід здатні ковалентно взаємодіяти з окремими функціональними групами білків, що зумовлює їх полімеризацію та пошкодження амінокислотних залишків. Глутатіонпероксидаза, локалізована у цитоплазмі, ядрі та мітохондріях, є гомотетрамером, містить в активному центрі 4 атоми селену, що пов'язані з цистеїном, основна функція ферменту – нейтралізація перекису водню і гідроперекисів ліпідів [7]. Каталаза – гемовмісний білок, що локалізується у пероксисомах та діє у сполученій системі із супероксиддисмутазою, нейтралізує H_2O_2 . Надмолекулярна структура стабілізується 4 молекулами НАДФН [18]. Таким чином, обидва ферменти мають досить склад-

ну структуру, зміна якої при взаємодії з продуктами ПОЛ або ацетальдегідом може призводити до порушення їх активності. Зв'язуючись з ДНК та білками ядерного хроматину, активні форми кисню можуть впливати на їх структуру і функцію, що зумовлює порушення зчитування генетичної інформації, це проявляється зниженням активності синтетичних процесів у клітині. Таким чином, у розвитку оксидативного стресу в головному мозку експериментальних тварин важливу роль відіграє як посилене утворення активних форм кисню, так і блокування функціональної активності ферментів системи АОЗ, зокрема глутатіонпероксидази та каталази, крім того, можливим є пригнічення біосинтезу вказаних ферментів.

Лікування уражень головного мозку алкогольного генезу є складним завданням. Це зумовлено низкою причин, однією з яких можна назвати відсутність лікарських препаратів, що активно впливають на патогенез захворювання, зокрема на розвиток оксидативного стресу. Поява ліків, здатних пригнічувати перекисні процеси, може стати ефективним методом зменшення тяжкості пошкодження головного мозку при ХОА. Одержані у нашій роботі результати демонструють підвищення інтенсивності процесів ПОЛ у головному мозку щурів-самиць під впливом етанолу, що супроводжується зниженням активності ферментів системи АОЗ – глутатіонпероксидази та каталази. Ці дані свідчать про розвиток вільнорадикального пошкодження головного мозку – одного з головних механізмів реалізації деструктивного впливу алкоголю та, ймовірно, можуть вказувати на тяжкість перебігу процесу.

ВИСНОВКИ. Хронічне отруєння алкоголем щурів-самиць супроводжується порушенням прооксидантно-антиоксидантного балансу в головному мозку, що проявляється активацією

ПОЛ (збільшенням кількості ТБК-активних продуктів, підвищенням інтенсивності індукованого ПОЛ) та пригніченням антиоксидантної системи (зменшенням глутатіонпероксидазної і каталазної активності).

Одержані у роботі дані можуть бути використані для розробки та оцінки ефективності нових методів лікування уражень головного мозку алкогольного генезу на етапі їх доклінічних випробувань.

ЛІТЕРАТУРА

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Жибина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. – С.Пб.: ИКС “Фолиант”, 2000. – 200 с.
2. Барабой В.А., Сутковой Д.А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и патологии / Под ред. Ю.А. Зозули. – К.: Наук.думка, 1997. – 420 с.
3. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
4. Ерышев О.Ф., Рыбакова Т.Г., Шабанов П.Д. Алкогольная зависимость: формирование, течение, противорецидивная терапия. – С.Пб.: ЭЛБИ-СПб, 2002. – 192 с.
5. Казимирко В.К., Мальцев В.И., Бутылин В.Ю., Горобец Н.И. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия. – К.: Морион, 2004. – 160 с.
6. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
7. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. Структура, свойства, биологическая роль и регуляция глутатіонпероксидазы // Усп. совр. биол. – 1993. – **113**, № 1. – С. 107-122.
8. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К. и др. Активированные кислородные метаболиты в монооксигеназных реакциях // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – **118**, № 4. – С. 7-12.
9. Марута Н.О., Минько О.І. Емоційні порушення при пограничних психічних розладах та алкогольний залежності. – Харків: ІНПН АМН України, 2003. – 20 с.
10. Мінко О.І., Лінський І.В., Болотова З.М. та ін. Деякі епідеміологічні параметри вживання алкоголю та наркотиків в Україні // Актуальні питання неврології, психіатрії та наркології у світлі концепції розвитку охорони здоров'я населення України. – Тернопіль: Укрмедкнига, 2001. – С. 555-559.
11. Падалко В.И., Севастьянова Т.В. Клинические аспекты функционирования системы цитохрома Р-450 микросом печени // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. Серія: Медицина. – 2005. – № 705, Вип. 11. – С. 110-21.
12. Петренко А.Ю., Ковалёв Г.А., Грищенко В.И. Внутривенное введение эмбриональных нервных клеток крысам с хроническим отравлением алкоголем // Проблемы криобиологии. – 2005. – **15**, № 1. – С. 71-78.
13. Сосин И.К., Куприенко И.В., Куприенко И.Ф. Влияние финлепсина на продолжительность и качество ремиссий у больных с запойной формой алкоголизма // Архив психіатрії. – 2000. – № 3-4. – С. 70-72.
14. Шерлок Ш., Дули Дж. Заболевания печени и жёлчных путей: Практическое руководство: Пер. с англ. / Под ред. З.Г. Апросиной, Н.А. Мухина. – М.: ГОЭТАР-МЕД, 2002. – 864 с.
15. Albano E., Clot P., Comoglio A. et al. Free radical activation of acetaldehyde and its role in protein alkylation // FEBS Letters. – 1994. – **348**. – P. 65-69.
16. Calabrese V., Scapagnini G., Latteri S. et al. Long-term ethanol administration enhances age-dependent modulation of redox state in different brain regions in the rat: protection by acetyl carnitine // Int. J. Tissue React. – 2002. – **24**, № 3. – P. 97-104.
17. Herrera D., Yagu A., Johnsen-Soriano S. et al. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: Protective effects of an antioxidant // PNAS. – 2003. – **100**, № 13. – P. 7919-7924.
18. Kirkman H.N., Ferraris M.R., Gaetani G.F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH: kinetics and stoichiometry // J. Biol. Chem. – 1999. – **274**, № 20. – P. 13908-13914.
19. Living dangerously: The World Health Report // Brundtland: Globe. – 2002. – № 4. – P. 3-4.
20. Muscoli C., Fresta M., Cardile V. et al. Ethanol-induced injury in rat primary cortical astrocytes involves oxidative stress: effect of idebenone // Neurosci. Lett. – 2002. – **329**, № 1. – P. 21-24.
21. Rotruck J., Pope A., Ganther H. et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase // Science. – 1973. – **179**, № 73. – P. 588-590.
22. Schenker S. Medical consequences of alcohol abuse: is gender a factor? // Alcohol Clin. Exp. Res. – 1997. – № 21. – P. 179-181.

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ОТРАВЛЕНИЯ АЛКОГОЛЕМ НА ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНУЮ СИСТЕМУ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Г.А. Ковалёв, Д.В. Черкашина, А.Ю. Петренко
ИНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРИОБИОЛОГИИ И КРИОМЕДИЦИНЫ

Резюме

Изучено влияние хронического отравления алкоголем на показатели прооксидантно-антиоксидантного состояния головного мозга крыс-самок показано, что длительное употребление этанола в высоких дозах приводит к нарушению прооксидантно-антиоксидантного баланса головного мозга, в частности к активации свободнорадикальных процессов (увеличению количества ТБК-активных продуктов, повышению интенсивности индуцированного ПОЛ) и угнетению антиоксидантной системы (уменьшению глутатионпероксидазной и каталазной активности).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хроническое отравление алкоголем, головной мозг, крысы-самки, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система.

INFLUENCE OF CHRONIC ALCOHOL POISONING ON PROOXIDANT/ANTIOXIDANT SYSTEM OF RAT BRAIN

H.O. Kovalyov, D.V. Cherkashyna, O.Yu. Petrenko
INSTITUTE FOR PROBLEMS OF CRYOBIOLOGY AND CRYOMEDICINE

Summary

The influence of chronic alcohol poisoning on the characteristics of brain prooxidant-antioxidant state of brain of female rats was studied. It was shown that high-dose ethanol consumption for a long time results in the disturbance of prooxidant-antioxidant balance of the brain, namely, in the strengthening of lipid peroxidation – (the increase of TBA-active product level and intensity of induced lipid peroxidation) and the depression of antioxidant system (decrease of catalase and glutathione peroxidase activity).

KEY WORDS: chronic alcohol poisoning, brain, female rats, lipid peroxidation, antioxidant system.

Отримано 26.12.2006 р.

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

Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua

АКТИВНІСТЬ ДЕЯКИХ NADP-ЗАЛЕЖНИХ ДЕГІДРОГЕНАЗ ТА ВМІСТ ЦИТОХРОМІВ P-450 I_b у ПЕЧІНЦІ ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ ХЛОРИДУ РТУТІ

Г.В. Ганусова, П.А. Каліман

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. В.Н. КАРАЗІНА

Вивчено активність цитоплазматичних NADPH-генеруючих ферментів: глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, 6-фосфоглюконатдегідрогенази, NADP-малатдегідрогенази і NADP-ізоцитратдегідрогенази, а також вміст цитохромів P-450 і b₅ у печінці щурів при введенні HgCl₂. Встановлено підвищення активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та зменшення вмісту мікосомальних цитохромів P-450 і b₅ через 24 год після введення солі. Триразове введення HgCl₂ супроводжується зниженням активності глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, NADP-малатдегідрогенази і NADP-ізоцитратдегідрогенази відносно одноразового введення, а також вмісту мікосомальних і мітохондріальних цитохромів P-450 та b₅. Обговорюються механізми регуляції NADP-залежних дегідрогеназ при оксидативному стресі, спричиненому іонами ртуті.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хлорид ртуті, цитохром P-450, цитохром b₅, NADP-залежні дегідрогенази, печінка.

ВСТУП. Ртуть – високотоксичний важкий метал, що при надходженні в організм спричиняє розвиток різних патологій нервової і серцево-судинної систем, а також нирок і печінки. Клітинні механізми дії іонів ртуті пов'язують з оксидативним стресом, що супроводжується утворенням активних форм кисню, зниженням концентрації відновленого глутатіону, порушенням сульфгідрильного гомеостазу [10, 12, 22]. У відповідь на появу активних форм кисню відбувається активація ферментативних систем антиоксидантного захисту клітини. На першому етапі проходять дисмутація O₂⁻ до H₂O₂ за участі супероксиддисмутази і перетворення H₂O₂ до H₂O за участі глутатіонпероксидази і каталази. На другому етапі активується генерація NADPH для відновлення глутатіону в глутатіонредуктазній реакції і формування активного тетрамеру каталази [3]. У цитозолі клітин печінки NADPH синтезується за участі NADPH-залежних дегідрогеназ, але роль цих ферментів при оксидативному стресі залишається невизначеною.

У зв'язку з цим, метою даної роботи було дослідження впливу HgCl₂ на активність цитоплазматичних NADPH-генеруючих ферментів: глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г6ФДГ) (КФ 1.1.1.49), 6-фосфоглюконатдегідрогенази (6ФГДГ) (КФ 1.1.1.44), NADP-малатдегідрогенази (NADP-МДГ) (КФ 1.1.1.40) і NADP-ізо-

цитратдегідрогенази (NADP-ІЦДГ) (КФ 1.1.1.42), а також вміст цитохромів P-450 і b₅ в мікосомах та мітохондріях печінки щурів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на білих щурах лінії Вістар масою 180-220 г, яким внутрішньочеревно вводили HgCl₂ (0,7 мг/100 г маси тіла). Контрольним тваринам вводили відповідний об'єм 0,9 % NaCl. Щурів декапітували під легким ефірним наркозом через 24 год після одноразового й останнього триразового (один раз на добу) введення HgCl₂. Печінку перфузували охолодженим фізіологічним розчином *in situ*. Мітохондріальну, мікосомальну та цитозольну фракції одержували методом диференціального центрифугування. Вміст цитохромів P-450 та b₅ у мітохондріях і мікосомах печінки визначали шляхом диференціальної спектрофотометрії за методом Т. Омуро [16], використовуючи коефіцієнт молярної екстинції для цитохрому b₅ – 164·10⁻³ М⁻¹·см⁻¹ та цитохрому P-450 – 91·10⁻³ М⁻¹·см⁻¹, і виражали в нмоль/мг білка. Активність Г6ФДГ і 6ФГДГ визначали за методом Глок і Мак-Лін у модифікації [6], активність NADP-МДГ – за методом Очоа в модифікації [2], NADP-ІЦДГ – за методом Плаут і Санг, як описано [4]. Інтенсивність накопичення NADPH визначали на СФ-46 при 340 нм і виражали в нмоль NADPH/хв/мг білка. Концентрацію білка визначали за методом Лоурі в

модифікації Міллера [15] і виражали в мг/мл. Статистичну обробку результатів проводили методом Стюдента [1].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Одноразове введення HgCl_2 призводило до підвищення активності Г6ФДГ на 58 % і незначного – NADP-ІЦДГ у печінці щурів. Активність 6ФГДГ і NADP-МДГ не змінювалась (табл. 1). При оксидативному стресі, викликаному введенням важких металів та інших токсичних речовин, збільшення активності Г6ФДГ, напевно, пов'язане з активацією ферментів антиоксидантного захисту. Показано, що після інтоксикації HgCl_2 у печінці суттєво знижувалося співвідношення GSH/GSSG , підвищувалася активність супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази, а також глутатіонредуктази і Г6ФДГ [3, 20]. При пошкодженні клітин печінки щурів внаслідок введення тіоацетаміду також спостерігались активація перекисного окиснення ліпідів, зниження співвідношення GSH/GSSG , різке підвищення активності Г6ФДГ (48 год) і малік-ферменту (96 год), що збігалось з активацією мітосомальної детоксикації та регенерації печінки [9]. Встановлено, що при оксидативному стресі експресія Г6ФДГ у культурі гепатоцитів модулювалася (підвищувалася) активними формами кисню [8]. Механізми регуляції експресії Г6ФДГ пов'язані із збільшенням швидкості транскрипції і концентрацією відновленого глутатіону. Так, максимальна активність Г6ФДГ спостерігалась при мінімальній концентрації відновленого глутатіону [19, 23].

При розвитку оксидативного стресу суттєво зростала активність NADH/NADP^+ -трансгідрогепази, NADPH -залежної пероксидази і Г6ФДГ, а також клітинне співвідношення NADPH/NADH [7]. Г6ФДГ відносять до важливих цитозольних антиоксидантних ферментів, але мало відомо про роль NADP-ІЦДГ у функціонуванні антиоксидантного захисту клітини. У цитозолі печінки активність NADP-ІЦДГ у 10 разів перевищувала активність інших NADPH -генеруючих ферментів (див. табл. 1). Експериментально показано, що високий рівень перекисного окиснення ліпідів, оксидативних пошкоджень DNA і білків у клітинах корелював з низькою активністю NADP-ІЦДГ [13]. Можливо, ІЦДГ відіграє важливу роль у захисті клітин печінки від оксидативних пошкоджень.

При введенні важких металів підвищення активності NADPH -генеруючих ферментів не пов'язане з активацією мітосомальної системи детоксикації ксенобіотиків. Встановлено, що вміст мітосомальних цитохромів P-450 і b_5 у печінці щурів знижувався через 24 год після введення HgCl_2 на 22 і 25 % відповідно (табл. 2). Можливо, зниження каталітичної активності й часткова денатурація цитохрому P-450 відбуваються за рахунок зв'язування SH -груп апоцитохрому іонами ртуті або зв'язування альдегідних продуктів перекисного окиснення ліпідів з вільними аміногрупами цього білка [5]. Відомо, що в печінці цитохром P-450 може брати участь у генерації активних форм кисню і посилювати оксидативні пошкодження клітин [11]. Так, підвищення активності цитохрому

Таблиця 1 – **Активність глюкозо-6-фосфатдегідрогенази, 6-фосфоглюконатдегідрогенази, NADP-малатдегідрогенази і NADP-ізоцитратдегідрогенази у цитозолі печінки щурів через 24 год після введення HgCl_2 ($M \pm m$, $n=5-10$)**

Фермент	Контроль	HgCl_2	
		одноразово	триразово
Г6ФДГ	$21,7 \pm 2,7$	$34,4 \pm 3,4^*$	$17,6 \pm 2,1^{**}$
6ФГДГ	$30,7 \pm 2,2$	$30,7 \pm 4,3$	$26,4 \pm 2,0$
NADP-МДГ	$21,9 \pm 2,1$	$20,5 \pm 2,1$	$7,5 \pm 0,8^{***}$
NADP-ІЦДГ	$212,5 \pm 11,8$	$237,6 \pm 8,9$	$182,3 \pm 15,0^{**}$

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно контролю; ** – $p < 0,05$ відносно одноразового введення HgCl_2 .

Таблиця 2 – **Вміст мітосомальних та мітохондріальних цитохромів P-450 і b_5 у печінці щурів через 24 год після введення HgCl_2 ($M \pm m$, $n=5-10$)**

Цитохроми	Контроль	HgCl ₂	
		одноразово	триразово
Мікосоми			
P-450	0,79±0,04	0,62±0,05*	0,59±0,02*
b ₅	0,57±0,04	0,43±0,03*	0,38±0,03*
Мітохондрії			
P-450	0,42±0,03	0,34±0,03	0,31±0,02*
b ₅	0,40±0,03	0,30±0,02	0,27±0,01*

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно контролю.

P-450 2E1 посилює гепатотоксичність, що розвивається при введенні цисплатини, завдяки активації перекисного окиснення ліпідів і розвитку оксидативного стресу [14]. Тому зниження вмісту мікросомальних цитохромів можна вважати одним з механізмів захисту клітин печінки від оксидативних пошкоджень.

Після триразового введення HgCl_2 (див. табл. 1) активність Г6ФДГ, NADP-ІЦДГ і NADP-МДГ знижувалась на 49, 23 та 63 % відповідно відносно одноразового введення, а активність NADP-МДГ – на 65 % відносно контролю. Зменшення активності NADPH-генеруючих ферментів супроводжувалось низьким рівнем мікросомальних, а також мітохондріальних цитохромів P-450 і b_5 в печінці щурів (див. табл. 2). Мітохондріальний цитохром P-450 в клітинах печінки бере участь у метаболізмі холестеролу і вітаміну D_3 , деяких ксенобіотиків [17]. Зниження вмісту мітохондріальних цитохромів P-450 і b_5 , можливо, пов'язане з накопиченням HgCl_2 в клітинах, активацією перекисного окиснення

ліпідів мембран мітохондрій та зміною ліпідного оточення цих білків.

Нетривала дія низьких концентрацій HgCl_2 викликає активацію ферментів антиоксидантного захисту, індукцію синтезу металотіонеїнів [18, 21], що зв'язують іони ртуті та активні форми кисню, а високі концентрації призводять до часткового виснаження цієї системи і, напевно, до апоптозу клітин печінки.

ВИСНОВКИ. 1. При оксидативному стресі, викликаному введенням HgCl_2 , посилення синтезу NADPH за участі NADP-залежних дегідрогеназ необхідне для функціонування системи антиоксидантного захисту в печінці щурів.

2. При введенні HgCl_2 зменшення вмісту мікросомальних та мітохондріальних цитохромів P-450 і b_5 , можливо, пов'язане зі зменшенням оксидативних пошкоджень у печінці щурів і супроводжується низьким рівнем біотрансформації ліпофільних речовин ендо- та екзогенного походження.

ЛІТЕРАТУРА

1. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая школа, 1973. – 360 с.
2. Усатенко М.С., Цончева А.В. Влияние инсулиновой недостаточности и гидрокортизона на активность НАДФ- и НАД-зависимых малатдегидрогеназ в печени и коре почек крыс // Вопр. мед. химии. – 1974. – **20**, № 4. – С. 401-406.
3. Bando I., Reus M.I., Andres D., Cascales M. Endogenous antioxidant defence system in rat liver following mercury chloride oral intoxication // J. Biochem. Mol. Toxicol. – 2005. – **19**, № 3. – P. 154-161.
4. Bauman D.E., Brown R.E., Davis C.L. Pathways of fatty acid synthesis in mammary gland of rat, sow and cow // Arch. Biochem. Biophys. – 1970. – **140**, № 1. – P. 237-244.
5. Bestervelt L.L., Vaz A.D.N., Coon M.J. Inactivation of ethanol-inducible cytochrome P-450 and other microsomal P-450 isozymes by trans-4-hydroxy-2-nonenal, a major product of membrane lipid peroxidation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – **92**, № 9. – P. 3764-3768.
6. Bottomley R.H., Pilot H.C., Potter V.R., Morris H.P. Metabolic adaptations in rat hepatomas. Reciprocal relationship between threonine dehydrase and glucose-6-phosphate dehydrogenase // Canc. Res. – 1963. – **23**, № 1. – P. 400-409.
7. Brumaghim J.L., Li Y., Henle E., Linn S. Effects of hydrogen peroxide upon nicotinamide nucleotide metabolism in Escherichia coli: changes in enzyme levels and nicotinamide nucleotide pools and studies of the oxidation of NAD(P)H by Fe(III) // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**, № 43. – P. 42495-42504.
8. Cramer C.T., Cooke S., Ginsberg L.C. et. al. Upregulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in response to hepatocellular oxidative stress: studies with diquat // J. Biochem. Toxicol. – 1995. – **10**, № 6. – P. 293-298.
9. Diez-Fernandez C., Sanz N., Cascales M. Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme gene expression in acute hepatic injury induced by thioacetamide // Biochem. Pharmacol. – 1996. – **51**, № 9. – P. 1159-1163.
10. Ercal N., Gurer-Orhan H., Aykin-Burns N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage // Curr. Top. Med. Chem. – 2001. – **1**, № 6. – P. 529-539.
11. Gong P., Cederbaum A.I., Nieto N. Increased expression of cytochrome P450 2E1 induces heme oxygenase-1 through ERK MARK pathway // J. Biol. Chem. – 2003. – **278**, № 32. – P. 29693-29700.
12. Kaliman P.A., Barannik T.V. Regulation of delta-aminolevulinic synthase activity during the development of oxidative stress // Biochemistry (Mosc). – 1999. – **64**, № 6. – P. 699-704.
13. Lee S.M., Koh H.J., Park D.C. et al. Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells // Free Radic. Biol. Med. – 2002. – **32**, № 11. – P. 1185-1196.
14. Lu Y., Cederbaum A.I. Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1 // Toxicol. Sci. – 2006. – **89**, № 2. – P. 515-523.
15. Miller G.L. Protein determination for large number of samples // Anal. Chem. – 1959. – **31**, № 5. – P. 964-966.
16. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes // J. Biol. Chem. – 1964. – **239**, № 7. – P. 2379-2385.
17. Raza H., Avadhani N.G. Hepatic mitochondrial cytochrome P-450 system. Purification and characteri-

zation of two distinct forms of mitochondrial cytochrome P-450 from beta-naphthoflavone-induced rat liver // J. Biol. Chem. – 1988. – **263**, № 19. – P. 9533-9541.

18. Reus I.S., Bando I., Andres D., Cascales M. Relationship between expression of HSP70 and metallothionein and oxidative stress during mercury chloride induced acute liver injury in rats // J. Biochem. Mol. Toxicol. – 2003. – **17**, № 3. – P. 161-168.

19. Salvemini F., Franze A., Iervolino A. et al. Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression // J. Biol. Chem. – 1999. – **274**, № 5. – P. 2750-2757.

20. Sarkar S., Yadav P., Trivedi R. Cadmium-induced lipid peroxidation and the status of the antioxidant

system in rat tissues // J. Trace Elem. Med. Biol. – 1995. – **9**, № 3. – P. 144-149.

21. Sato M., Kondoh M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals // Tohoku J. Exp. Med. – 2002. – **196**, № 1. – P. 9-22.

22. Valko M., Morris H., Cronin M.T. Metals, toxicity and oxidative stress // Curr. Med. Chem. – 2005. – **12**, № 10. – P. 1161-1208.

23. Xu J., Maki D., Stapleton S.R. Mediation of cadmium-induced oxidative damage and glucose-6-phosphate dehydrogenase expression through glutathione depletion // J. Biochem. Mol. Toxicol. – 2003. – **17**, № 2. – P. 67-75.

АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ NADP-ЗАВИСИМЫХ ДЕГИДРОГЕНАЗ И СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОХРОМОВ P-450 И b_5 В ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ ВВЕДЕНИИ ХЛОРИДА РТУТИ

Г.В. Ганусова, П.А. Калиман

ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. В.Н. КАРАЗИНА

Резюме

Изучено активность цитоплазматических NADP-зависимых ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, NADP-малатдегидрогеназы и NADP-изоцитратдегидрогеназы, а также содержание цитохромов P-450 и b_5 в печени крыс при введении $HgCl_2$. Установлено повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и уменьшение содержания микросомальных цитохромов P-450 и b_5 через 24 часа после введения соли. Трехкратное введение $HgCl_2$ сопровождается снижением активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, NADP-малатдегидрогеназы и NADP-изоцитратдегидрогеназы относительно однократного введения, а также содержания микросомальных и митохондриальных цитохромов P-450 и b_5 . Обсуждаются механизмы регуляции NADP-зависимых дегидрогеназ при оксидативном стрессе, который вызван ионами ртути.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хлорид ртути, цитохром P-450, цитохром b_5 , NADP-зависимые дегидрогеназы, печень.

ACTIVITY OF SOME NADP-DEPENDENT DEHYDROGENASES AND CYTOCHROME P-450 AND b_5 CONTENTS IN THE RAT LIVER AFTER INJECTION OF MERCURY CHLORIDE

H.V. Hanusova, P.A. Kaliman

KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY BY V.N. KARAZIN

Summary

Activity of cytosolic NADP-dependent dehydrogenases: glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, NADP-malate dehydrogenase and NADP-isocitrate dehydrogenase as well as cytochrome P-450 and b_5 contents was investigated in the rat liver after action of mercury chloride. It was revealed that activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase increased and microsomal cytochrome P-450 and b_5 contents decreased in a day after injection of salt. After 3-fold injection of $HgCl_2$, the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADP-malate dehydrogenase and NADP-isocitrate dehydrogenase as well as microsomal and mitochondrial cytochrome P-450 and b_5 contents decreased. The mechanisms of regulation of NADP-dependent dehydrogenases activity during oxidative stress caused by mercury chloride are discussed.

KEY WORDS: mercury chloride, cytochrome P-450, cytochrome b_5 , NADP-dependent dehydrogenases, liver.

Отримано 14.09.2006 р.

Адреса для листування: П.А. Каліман, Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, біологічний факультет, кафедра біохімії, пл. Свободи, 4, Харків, 61077, Україна.

СТАН ЗАХИСНИХ СИСТЕМ ОРГАНІЗМУ ПРИ КОМБІНОВАНОМУ ВВЕДЕННІ СПИРТУ ЕТИЛОВОГО ТА СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

І.Я. Демків, Я.І. Гонський, І.М. Кліщ

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Досліджено вплив роздільного і поєднаного введення етанолу та солей важких металів на показники антиоксидантної та імунної систем. Встановлено, що прогресування патологічного процесу в печінці супроводжується інтенсифікацією процесів вільнорадикального окиснення, спричиняє істотне порушення пристосувально-компенсаторних механізмів, особливо стану ферментативної та неферментативної антиоксидантної систем, спостерігаються порушення імунорегуляторних функцій організму експериментальних тварин та напруження системи загального імунітету. Комбіноване ураження етанолом, хлоридом кадмію та ацетатом свинцю супроводжується достовірним зростанням пероксидазної активності крові, супероксиддисмутази, церулоплазміну, малонового діальдегіду, циркулюючих імунних комплексів та імуноглобулінів M, G відносно ізольованого введення даних токсикантів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: антиоксидантна система, імунна система, солі важких металів, етиловий спирт.

ВСТУП. У зв'язку з інтенсивним науково-технічним прогресом в останні десятиліття, значно зросло хімічне забруднення біосфери, що призвело до виникнення нових форм патології людини та змін перебігу деяких захворювань. Швидкий розвиток хімізації народного господарства і побуту, поширення алкоголізму, наркоманії, використання хімії в побуті – далеко не весь перелік джерел токсикантів у повітрі, воді, їжі [5, 18, 19]. Потрапляючи в організм людини, хімічні сполуки викликають пошкодження різних органів і тканин.

Основним бар'єром, що нейтралізує токсичні речовини в організмі людини, є печінка. Дуже часто цей орган зазнає токсичного впливу етилового спирту, який головним чином окиснюється в печінці [14, 21]. Це, у свою чергу, призводить до розвитку алкогольного ураження печінки. Ураження печінки, які виникають під впливом гепатотоксичних ксенобіотиків, у більшості випадків супроводжуються порушенням білосинтезуючої, детоксикуючої та інших функцій організму [4].

З усіх металів періодичної системи хімічних елементів кадмій і свинець є найбільш токсичними та найпоширенішими у природі. Солі кадмію мають мутагенні та канцерогенні властивості й потенційно небезпечні в генетичному відношенні. Кадмій [16] блокує роботу ряду важливих для життєдіяльності організму

ферментів. Крім того, він уражає печінку, нирки, підшлункову залозу. Має властивість кумулювати в цих органах та тканинах [13, 24]. Не менш токсичний свинець – тіолова отрута, що блокує сульфгідрильні, а також карбоксильні й амініні групи ферментів. Органами-мішенями у нього є нервова система, кров, кровотворні органи, також він безпосередньо діє на еритроцити, скорочуючи термін їх життя [18, 19].

У літературі є дані про значну кількість досліджень, що стосуються токсичної дії на організм етилового спирту та важких металів [2, 6, 16]. Однак експериментальних робіт, в яких досліджували б вплив токсичних доз етилового спирту за дії на організм допорогових доз солей кадмію та свинцю, в доступній нам літературі не зустрічалося, хоча такі поєднання зустрічаються часто. З огляду на вищезазначене, метою нашого дослідження було вивчити стан антиоксидантної та імунної систем при гострому токсичному ураженні печінки етиловим спиртом на фоні хронічної інтоксикації солями свинцю і кадмію.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на білих статевозрілих щурах-самцях масою 180-200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію.

Хронічне токсичне ураження важкими металами викликали шляхом внутрішньошлункового введення тваринам водного розчину хлориду

© І.Я. Демків, Я.І. Гонський, І.М. Кліщ, 2007.

кадмію в дозі 3,3 мг/кг маси тіла ($0,05 LD_{50}$) та оцтовокислого свинцю в дозі 11 мг/кг ($0,05 LD_{50}$) протягом 30 днів.

Гостре алкогольне отруєння моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення етанолу, який попередньо розводили в 0,9 % розчині натрій хлориду, з розрахунку 12,5 мл 40 % розчину етанолу на 1 кг маси на 31-й день експерименту [22].

Гостре ураження етиловим спиртом моделювали шляхом одноразового внутрішньочеревного введення спирту в аналогічній дозі на 31-й день експерименту, після місячного введення відповідної кількості 0,9 % натрій хлориду. Інтактним тваринам вводили відповідну кількість 0,9 % розчину натрій хлориду.

Піддослідних щурів поділили на 3 групи: 1-ша – інтактні (контроль); 2-га – уражені етиловим спиртом; 3-тя – уражені хлоридом

кадмію, оцтовокислим свинцем та етиловим спиртом. Тварин виводили з експерименту на 1-шу, 2-гу та 5-ту доби 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" [7].

Досліджували цільну кров, сироватку крові й гомогенат печінки. Ступінь інтоксикації організму оцінювали за еритроцитарним індексом інтоксикації (EII) – за кількістю поглинутого барвника (метиленового синього) еритроцитарними мембранами [17]. Загальну пероксидазну активність крові визначали за методом Т. Попова (1972) [15], рівні малонового діальдегіду (МДА) [1], дієнових кон'югат (ДК) [9], церулоплазміну (ЦП) [8] – згідно із вказаними методиками. Концентрацію каталази (КТ)

Таблиця 1 – Показники антиоксидантної системи білих щурів за токсичного ураження печінки етиловим спиртом та при поєднанні етилового спирту із солями свинцю і кадмію, різні терміни ($M \pm m$)

Показник	Група тварин						
	Контроль, n=18	Ураження етиловим спиртом			Ураження солями свинцю і кадмію та етиловим спиртом		
		1-ша доба	2-га доба	5-та доба	1-ша доба	2-га доба	5-та доба
EII, %	7,45±0,46	24,38±2,63 $p_1 < 0,001$	20,33±2,75 $p_1 < 0,001$	29,45±2,49 $p_1 < 0,001$	40,69±5,75 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	23,59±6,01 $p_1 < 0,001$	16,69±2,53 $p_1 < 0,001$
ПАК, мкмоль/(хв·л)	36,19±12,04	16,27±1,56	17,91±2,39	13,85±1,35	51,11±8,75 $p_2 < 0,001$	47,03±1,34 $p_2 < 0,001$	25,15±1,53 $p_2 < 0,001$
СОД, ум.од./мг	0,336±0,037	0,182±0,026 $p_1 < 0,001$	0,114±0,024 $p_1 < 0,001$	0,167±0,015 $p_1 < 0,001$	0,127±0,003 $p_1 < 0,001$	0,297±0,029 $p_2 < 0,001$	0,208±0,012 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Каталаза сироватки, мкат/л	0,042±0,004	0,108±0,022 $p_1 < 0,001$	0,249±0,026 $p_1 < 0,001$	0,152±0,021 $p_1 < 0,001$	0,180±0,054 $p_1 < 0,05$	0,199±0,021 $p_1 < 0,05$	0,125±0,020 $p_1 < 0,05$
Каталаза печінки, мкат/кг	5,765±0,354	1,024±0,157 $p_1 < 0,001$	1,493±0,076 $p_1 < 0,001$	2,505±0,315 $p_1 < 0,001$	1,308±0,247 $p_1 < 0,001$	2,479±0,396 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	1,029±0,271 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Церулоплазмін, мг/л	8,31±3,42	23,68±0,89 $p_1 < 0,001$	34,28±1,35 $p_1 < 0,001$	32,07±2,11 $p_1 < 0,001$	23,68±1,84 $p_1 < 0,001$	28,42±1,87 $p_1 < 0,001$	40,99±0,43 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
МДА сироватки, мкмоль/л	4,89±0,26	8,31±0,66 $p_1 < 0,001$	9,37±0,39 $p_1 < 0,001$	6,92±0,48 $p_1 < 0,001$	5,38±0,58 $p_2 < 0,001$	7,53±0,27 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	5,28±0,16 $p_2 < 0,001$
МДА печінки, мкмоль/кг	0,41±0,04	0,59±0,09 $p_1 < 0,05$	0,68±0,04 $p_1 < 0,001$	0,67±0,09 $p_1 < 0,001$	0,31±0,02	0,57±0,06 $p_1 < 0,05$	0,58±0,01 $p_1 < 0,05$
ДК сироватки, ум.од. / мл	0,61±0,09	1,01±0,14 $p_1 < 0,05$	1,42±0,12 $p_1 < 0,001$	1,55±0,22 $p_1 < 0,001$	0,72±0,19	1,11±0,21 $p_1 < 0,05$	0,86±0,16 $p_2 < 0,05$
ДК печінки, ум.од. / г	0,81±0,04	1,05±0,12	1,12±0,06 $p_1 < 0,001$	1,35±0,15 $p_1 < 0,001$	0,59±0,08 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$	0,69±0,05 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$	0,42±0,02 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
ГП печінки, ммоль/(хв·кг)	0,036±0,015	0,025±0,005	0,046±0,007	0,029±0,002	0,009±0,002 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	0,024±0,002 $p_2 < 0,001$	0,028±0,005
ГР печінки, ммоль/(хв·кг)	0,083±0,005	0,021±0,002 $p_1 < 0,001$	0,029±0,005 $p_1 < 0,001$	0,036±0,002 $p_1 < 0,001$	0,007±0,001 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	0,012±0,002 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	0,097±0,018 $p_2 < 0,001$
ВГ печінки, ммоль/г	0,41±0,05	1,05±0,06 $p_1 < 0,001$	1,17±0,11 $p_1 < 0,001$	0,61±0,16	0,22±0,05 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$	0,26±0,06 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$	0,25±0,03 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примітка. Тут і в таблиці 2: p_1 – різниця достовірна порівняно з контролем; p_2 – різниця достовірна порівняно з етиловим спиртом.

досліджували за методикою М.А. Королюка і співавт. (1988) [10]. Активність супероксиддисмутази (СОД) визначали за методикою [20], активність глутатіонпероксидази (ГП) та глутатіонредуктази (ГР) у гомогенатах печінки – спектрофотометрично за зниженням рівня NADPH при 340 нм, як описано в [11]. Вміст відновленого глутатіону (Г-SH) досліджували згідно з методикою G.L. Ellman (1976) [23]. У сироватці крові визначали концентрації імунoglobulinів класів А, М, G (Ilg A, M, G) біохімічним методом [12] та вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) шляхом їх преципітації в поліетиленгліколі 6000 [3]. Кількісні показники обробляли статистично. Достовірність різниці між порівнюваними величинами визначали за t-критерієм Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати досліджень показали, що інтоксикація тварин етиловим спиртом супроводжується активацією вільнорадикального окиснення ліпідів у сироватці крові та печінці щурів, про що свідчить достовірне збільшення вмісту МДА у сироватці крові на 1-шу, 2-гу та 5-ту доби експерименту (відповідно, в 1,7, 1,9 та 1,4 раза) порівняно з контролем. У печінці спостерігалось зростання вмісту МДА протягом всього експерименту (табл. 1). Також збільшувався вміст ДК у сироватці крові (на 1-шу, 2-гу та 5-ту доби на 40, 57 і 61 % відповідно) та печінці (на 1-шу, 2-гу та 5-ту доби на 23, 28 40 % відповідно) відносно контрольної групи тварин.

Дослідження еритроцитарного індексу інтоксикації дало такі результати. На 1-шу, 2-гу та 5-ту доби експерименту даний показник зростав у 3,3, 2,7 і 4 рази порівняно з контролем, що є наслідком токсичного впливу етилового спирту на організм піддослідних тварин. У 2-й групі щурів спостерігалися достовірне підвищення активності каталази у сироватці крові та зниження її у печінці протягом всього експерименту (див. табл. 1). За даного ураження, ймовірно, зменшувалась пероксидазна активність крові на 1-шу ($16,27 \pm 1,56$), 2-гу ($17,91 \pm 2,39$) та 5-ту ($13,85 \pm 1,35$) доби експерименту, тоді як цей показник у контрольній групі тварин становив ($36,19 \pm 12,04$) мкмоль/(хв • л). Активність СОД у печінці за дії етилового спирту знижувалась відносно контролю на 1-шу, 2-гу та 5-ту доби експерименту в 1,8, 2,9 та 2 рази відповідно (див. табл. 1). Зменшення активності СОД, ймовірно, є ознакою пригнічення синтезу ферменту. Важлива роль у знешкодженні супероксиданіонрадикалів у плазмі крові належить церулоплазміну, вміст якого, за даними нашого

дослідження, достовірно зростав протягом всього експерименту (див. табл. 1). Це є наслідком адаптивної активації синтезу даного ферменту, спрямованої на збільшення загального фонду антиоксидантів.

Останньою ланкою захисту клітин від перекиснення є система глутатіону, яка включає ферменти – глутатіонпероксидазу та глутатіонредуктазу, а також неферментний компонент – відновлений глутатіон. За дії етанолу активність ГП, ймовірно, зменшувалась на 1-шу та 5-ту доби експерименту відносно контрольних тварин в 1,4 й 1,2 раза відповідно. Достовірне зниження спостерігалось відносно ГР протягом всього експерименту, причому до закінчення терміну дослідження активність ферменту поступово збільшувалась (див. табл. 1). У печінці за дії етилового спирту концентрація відновленого глутатіону перевищувала цей показник здорових щурів, відповідно, у 2,6 та 2,9 раза на 1-шу та 2-гу доби експерименту. Даний факт можна пояснити тим, що за умов інтоксикації етиловим спиртом різко підвищується концентрація відновлених нікотинамідних коферментів, оскільки при окисненні однієї молекули C_2H_5OH до оцтової кислоти утворюється 2 молекули НАДН₂. А вміст відновленого глутатіону, як відомо, визначається співвідношенням НАДН₂/НАД⁺. Отже, це можна вважати компенсаторною реакцією організму на надлишок відновлених нікотинамідних коферментів. Аналізуючи отримані результати, було зроблено висновок, що за умов інтоксикації етиловим спиртом зміни компонентів антиоксидантного захисту мають компенсаторний характер і спрямовані на знешкодження продуктів вільнорадикального окиснення.

Комбіноване введення солей свинцю і кадмію та етилового спирту призводило до більш глибоких змін досліджуваних показників. Так, вміст МДА зростав у сироватці крові (9 % на 1-шу, 35 % на 2-гу, 7 % на 5-ту доби експерименту), хоча даний показник був достовірним лише на 2-гу добу дослідження, та печінці 28 % на 2-гу, 29 % на 5-ту доби експерименту) порівняно з контролем. Вміст ДК збільшувався у сироватці крові (5 % на 1-шу, 45 % на 2-гу ($p_1 < 0,05$), 29 % на 5-ту доби дослідження), в печінці знижувався (на 27, 15 та 48 % на 1-шу, 2-гу і 5-ту доби відповідно) відносно контролю та протягом всього експерименту відносно щурів 2-ї групи (див. табл. 1). Спостерігалось різке зростання ЕІІ протягом всього дослідження, особливо на 1-шу добу експерименту (82 %) відносно контролю, а також у відповідну добу на 40 % відносно групи тварин, уражених етанолом, що вказує на

посилення токсичної та пошкоджувальної дій свинцю і кадмію за дії етилового спирту. 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 у печінці, яка достовірно знижувалась відносно контролю протягом всього експерименту (див. табл. 1). Зростання пероксидазної активності крові було достовірним відносно інтактних, зате достовірним відносно отруєних етанолом тварин протягом всього експерименту. Активність СОД знижувалась протягом всього дослідження, проте достовірними показники були лише на 1-шу та 5-ту доби експерименту відносно контролю. Це можна пояснити як пригніченням регуляторного впливу сульфгідрильних груп, так і пошкодженням активного центру СОД, що зумовлено незворотним зв'язуванням іонів міді та окисненням тіолових груп. На 2-гу та 5-ту доби експерименту спостерігалось достовірне зростання активності СОД у 2,6 й 1,2 раза відповідно відносно 2-ї групи експериментальних тварин. Що стосується церулоплазміну, то його концентрація достовірно підвищувалась протягом всього експерименту порівняно з інтактними щурами. Цікавий феномен зафіксовано відносно ГП, коли зниження показників було достовірним відносно інтактних лише на 1-шу добу і відносно отруєних етанолом тварин на 1-шу та 2-гу доби експерименту. Даний факт можна трактувати як реверсію пошкоджувальної дії комбінації токсичних агентів порівняно з ізольованим впливом важких металів та етилового спирту. Можливо, це відбувається за рахунок більш швидкого виснаження резерву ферменту, а також внаслідок порушень обміну селену, який є складовим компонентом глутатіонпероксидази. Активність ГР достовірно

знижувалась на 1-шу та 2-гу доби дослідження у 12 і 7 разів відносно контролю, а також у 3 та 2,4 раза у відповідні доби порівняно з групою щурів, уражених етиловим спиртом. За комбінованої дії свинцю, кадмію та етилового спирту спостерігалось зменшення вмісту відновленого глутатіону на 1-шу ($0,22 \pm 0,05$), 2-гу ($0,26 \pm 0,06$) та 5-ту ($0,25 \pm 0,03$) доби експерименту, тоді як у контрольній групі тварин він становив ($0,41 \pm 0,05$) ммоль/г. Достовірне зниження вмісту пептиду відмічали на 1-шу, 2-гу та 5-ту доби експерименту у 4,7, 4,5 та 2,5 раза відповідно відносно щурів, уражених етиловим спиртом (див. табл. 1).

Імунологічну реактивність організму експериментальних тварин оцінювали за станом показників гуморального імунітету (вміст IgG, A, M, G та ЦІК). При ураженні щурів етиловим спиртом протягом всього експерименту порівняно з контролем спостерігалися достовірне зростання вмісту Ig A та зменшення вмісту Ig M (табл. 2). Вміст Ig G збільшувався протягом всього експерименту відносно контрольної групи тварин, але даний показник не був достовірним. Також за дії токсиканту рівень ЦІК різко зростав на 1-шу, 2-гу та 5-ту доби дослідження у 2,6, 2,9 та 1,5 раза порівняно з інтактними тваринами.

За поєднаного ураження солями свинцю, кадмію та етилового спирту спостерігалось зменшення вмісту Ig M відносно контролю, хоча він достовірно зростав на 1-шу, 2-гу та 5-ту доби експерименту тільки відносно групи тварин, уражених етанолом (у 4,5, 2,6 та 1,9 раза відповідно). Також збільшувався вміст Ig A протягом всього дослідження відносно контрольної групи щурів. Що стосується Ig G, то його вміст достовірно зростав на 1-шу, 2-гу та 5-ту доби експерименту відносно контролю (в 1,8, 1,3 та 2,5 раза відповідно) та групи тварин, уражених етанолом (в 1,6, 1,2 та 2,7 раза відповідно). Варто зазначити, що значне

Таблиця 2 – Показники імунної системи білих щурів за токсичного впливу етилового спирту та при поєднанні етилового спирту з солями свинцю і кадмію, різні терміни ($M \pm m$)

Показник	Група тварин						
	Контроль, n=16	Ураження етиловим спиртом			Ураження солями свинцю і кадмію та етиловим спиртом		
		1-ша доба	2-га доба	5-та доба	1-ша доба	2-га доба	5-та доба
ЦІК, ум.од.	$9,83 \pm 1,97$	$26,31 \pm 0,81$ $p_1 < 0,01$	$28,11 \pm 3,91$ $p_1 < 0,001$	$15,11 \pm 1,11$ $p_1 < 0,05$	$24,14 \pm 2,95$ $p_1 < 0,001$	$25,51 \pm 2,51$ $p_1 < 0,001$	$32,01 \pm 3,15$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Ig A, г/л	$0,125 \pm 0,039$	$0,735 \pm 0,049$ $p_1 < 0,001$	$0,585 \pm 0,071$ $p_1 < 0,001$	$0,861 \pm 0,036$ $p_1 < 0,001$	$0,605 \pm 0,077$ $p_1 < 0,001$	$0,647 \pm 0,047$ $p_1 < 0,001$	$0,769 \pm 0,119$ $p_1 < 0,001$
Ig M, г/л	$0,796 \pm 0,098$	$0,148 \pm 0,047$ $p_1 < 0,001$	$0,138 \pm 0,045$ $p_1 < 0,001$	$0,401 \pm 0,021$ $p_1 < 0,001$	$0,671 \pm 0,111$ $p_2 < 0,001$	$0,353 \pm 0,088$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	$0,789 \pm 0,187$ $p_2 < 0,05$
Ig G, г/л	$1,295 \pm 0,133$	$1,425 \pm 0,044$	$1,423 \pm 0,078$	$1,201 \pm 0,041$	$2,306 \pm 0,156$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	$1,744 \pm 0,041$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$	$3,228 \pm 0,272$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$

збільшення вмісту Ig G спостерігалось саме за поєданого ураження двома токсикантами протягом всіх термінів дослідження (див. табл. 2). Наведена динаміка імуноглобулінів свідчить про напруження системи загального імунітету при хронічному та гострому ураженні печінки даними токсикантами. Також значно токсичнішими були солі свинцю і кадмію за впливу етилового спирту, коли рівень ЦІК зростав не тільки на 1-шу та 2-гу доби експерименту у 2,6 раза, а й на 5-ту – в 3,3 раза порівняно з контрольною групою тварин (див. табл. 2) та у 2,1 раза порівняно з групою щурів, уражених етиловим спиртом. Утворення ЦІК – один з механізмів нормальної імунної відповіді, тому збільшення їх вмісту в сироватці крові при гострому ураженні етиловим спиртом на фоні інтоксикації солями свинцю і кадмію вказує на порушення імунорегуляторних функцій організму експериментальних тварин.

ВИСНОВКИ. 1. Результати проведених досліджень свідчать про те, що гостре алкогольне отруєння супроводжується інтенсифікацією процесів вільнорадикального окиснення, спричиняє істотне порушення пристосувально-компенсаторних механізмів, особливо стану ферментативної та неферментативної антиоксидантної систем. Так, нами виявлено суттє-

ве збільшення вмісту МДА, ДК, церулоплазміну, відновленого глутатіону, підвищення активності каталази і зниження активності ГП, ГР у піддослідних тварин. Ураження етанолом призводить до порушень імунітету, зокрема до зростання рівня ЦІК та IgG A, G.

2. Гостре ураження етиловим спиртом на фоні хронічної інтоксикації солями свинцю і кадмію має глибше виражену токсичну дію і супроводжується інтенсивнішими біохімічними, імунологічними змінами в організмі експериментальних тварин. Спостерігається порушення співвідношення в системі ПОЛ/АОС, що проявляється активацією процесів ліпідної пероксидації та пригніченням окремих компонентів системи антиоксидантного захисту, знижується активність ферментів монооксигеназної системи мікросом, що беруть участь у детоксикаційних процесах, зростає проникність цитоплазматичних мембран та порушується функція мембран мітохондрій. Значне збільшення вмісту IgG A, G свідчить про напруження системи загального імунітету, а зростання рівня ЦІК у сироватці крові вказує на порушення імунорегуляторних функцій організму експериментальних тварин. Отже, етиловий спирт потенціює пошкоджувальну дію гепатотропних токсичних агентів і сприяє розвитку більш виражених структурно-функціональних порушень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Медицина, 1972. – 252 с.
2. Гонський Я.І., Головка Л.Л. Стан захисних систем організму за умов поєднаної дії солей кадмію та свинцю // Мед. хімія. – 2004. – **6**, № 1. – С. 13-15.
3. Гриневич Ю.А., Алферов А.М. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело. – 1981. – № 8. – С. 493-495.
4. Гріднев О.Є. Перекисне окислення ліпідів і печінка // Сучасна гастроентерологія. – 2005. – № 5 (25). – С. 80-83.
5. Егоров Ю.Л., Кирилов В.Ф. Экологическая значимость и гигиеническая регламентация свинца и кадмия в различных средах (обзор литературы) // Медицина труда и промышленная экология. – 1996. – № 10. – С. 18-24.
6. Ковалев Г.А., Черкашина Д.В., Петренко А.Ю. Показатели прооксидантно-антиоксидантной системы печени самок крыс при алкогольном поражении // Сучасна гастроентерологія. – 2005. – № 4 (24). – С. 51-53.
7. Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А. та ін. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. – К.: Авіцена, 2002. – 156 с.
8. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. – М.: Минск, 1982. – 311 с.
9. Колесова О.Е., Маркин А.А., Федорова Т.Н. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах // Лаб. дело. – 1984. – № 9. – С. 540-546.
10. Короліюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-18.
11. Круглікова Г.О., Штутман У.М. Методи визначення активності глутатіонпероксидази та глутатіонредуктази // Укр. біохім. журн. – 1976. – **68**, № 2. – С. 223-228.
12. Лоренко С.В., Кравченко О.Б. Кількісне визначення імуноглобулінів біохімічним методом // Акушерство і гінекологія. – 1972. – № 6. – С. 26-29.
13. Матолінець О.М. Вікові особливості антиоксидантної системи у тварин з кадмій токсикозом // Мед. хімія. – 2000. – **2**, № 1. – С. 44-48.
14. Подымова С.Д. Механизмы алкогольного повреждения печени // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1998. – № 5. – С. 21-25.
15. Попов Т., Нейковска Л. Метод определения пероксидазной активности крови // Гигиена и санитария. – 1971. – № 10. – С. 89-93.

16. Сорока В.Р., Скоробогатая Т.Г., Анисимова В.П. Влияние кадмия на активность ферментов // Донец. гос. мед. ин-т. – Донецк, 1991. – 11 с.

17. Тогайбаев А.А., Кургузкин А.В., Рикун И.В. и др. Метод определения эндогенной интоксикации // Лаб. дело. – 1988. – № 9. – С. 22-24.

18. Трахтенберг И.М., Колесников В.С., Луковенко В.П. Тяжелые металлы во внешней среде: Современ. гигиен. и токсикол. аспекты. – М.: Наука и техника, 1994. – 285 с.

19. Трахтенберг И.М., Короленко Т.К., Утко Н.А. Свинец и окислительный стресс // Современные проблемы токсикологии. – 2001. – № 4. – С. 50-51.

20. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксидредуктазы в окислительных процессах клетки

и метод определения ее в биологическом материале // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678-681.

21. Cowan J.M., Wheathermon A. Determination of volume of distribution for ethanol in male and female subjects // J. Anal. Toxicol. – 1996. – № 20 (5). – P. 287-290.

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

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

24. Rikans L.E., Yamano T. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity // J. Biochem. Mol. Toxicol. – 2000. – **14**, № 2. – P. 110-117.

СОСТОЯНИЕ ЗАЩИТНЫХ СИСТЕМ ОРГАНИЗМА ПРИ СОЧЕТАННОМ ВВЕДЕНИИ СПИРТА ЭТИЛОВОГО И СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

И.Я. Демкив, Я.И. Гонский, И.Н. Клищ

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

Исследовано влияние раздельного и сочетанного введения этанола, солей тяжелых металлов на показатели антиоксидантной, а также иммунной систем. Установлено, что прогрессирование патологического процесса в печени сопровождается интенсификацией процессов свободнорадикального окисления, служит причиной нарушения приспособительно-компенсаторных механизмов, особенно состояния ферментативной и неферментативной антиоксидантной систем, наблюдаются нарушение иммунорегуляторных функций организма экспериментальных животных и напряжение системы общего иммунитета. Сочетанное поражение этанолом, хлоридом кадмия и ацетатом свинца сопровождается достоверным возрастанием пероксидазной активности крови, супероксиддисмутазы, церулоплазмينا, малонового диальдегида, циркулирующих иммунных комплексов, иммуноглобулинов М, G в отношении изолированного введения данных токсикантов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антиоксидантная система, иммунная система, соли тяжелых металлов, этиловый спирт.

CONDITION OF PROTECTIVE SYSTEMS OF ORGANISM AT COMBINED INTRODUCTION OF ETHYL ALCOHOL AND SALTS OF HEAVY METALS

I.Ya. Demkiv, Ya.I. Honsky, I.M. Klishch

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

There was researched an influence of separate and combined introduction of ethanol and salts of heavy metals on indices of antioxidant and immune systems. There was determined that progress of pathological process in liver is accompanied by intensification of processes of free radical oxidation. It causes a considerable disturbance of adaptive-compensatory mechanisms, especially condition of enzymatic and non-enzymatic antioxidant system, there is disturbance of immunoregulatory functions of organism at experimental animals and tension of general immunity system. Combined injury by ethanol, cadmium chloride and lead acetate is accompanied by significant increase of peroxidase blood activity, superoxide dismutase, ceruloplasmin, malonic dialdehyde, circulating immunocomplexes and immunoglobulins M, G against separate introduction of these toxicants.

KEY WORDS: antioxidant system, immune system, salts of heavy metals, ethyl alcohol.

Отримано 9.10.2006 р.

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

ОСОБЛИВОСТІ КІНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛІЗУ ЛІЗОСОМНОГО ЦИСТЕЇНОВОГО КАТЕПСИНУ Н ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗІ

В.І. Чорна, О.Л. Лянна, А.В. Тарковська, О.П. Татаровський
ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Запропонована схема виділення та очищення лізосомного цистеїнового катепсину Н дозволила отримати за 5 етапів (гомогенізація, висолювання сульфатом амонію (30-80 % насичення), діаліз, афінна хроматографія на конканавалін А-агарозі, гель-фільтрація на сефадексі G-100) очищений у 404 та 436 разів катепсин Н з папілярної та фолікулярної карцином щитоподібної залози (ЩЗ) людини. Визначено молекулярну масу одержаних ферментів. Методами графічного аналізу встановлено відмінність у кінетиці ферментативного каталізу та фізико-хімічних властивостях катепсину Н за даних патологій ЩЗ.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: катепсин Н, пухлини щитоподібної залози, кінетика ферментативного каталізу.

ВСТУП. За умов сучасності, особливо на території України, актуальності набула проблема канцерогенезу щитоподібної залози (ЩЗ). Невпинне зростання кількості хворих на онкологічні захворювання ЩЗ, спричинене, зокрема, наслідками аварії на Чорнобильській АЕС, спонукає шукати нові маркери перебігу хвороби та засоби поліпшення терапії хворих. Лізосомний апарат клітин організму, завдяки своїй динамічності й пластичності, стає зручним та інформативним об'єктом дослідження. Підвищення експресії і секреції цистеїнових протеїназ у злоякісних пухлинах відображає зміни більш ніж в одному етапі нормального розвитку цих ферментів у лізосомах (зміни в трансляції/транскрипції, посттрансляційному процесингу та/або у внутрішньоклітинному транспорті) [5]. Найменш дослідженим серед лізосомних протеолітичних ферментів при злоякісному рості є катепсин Н.

Катепсин Н (КФ 3.4.22.19) – пептидгідролаза, вперше описана Kirschke зі співавт. в печінці щурів [7]. Пізніше цей катепсин, для якого характерна як ендопептидазна, так і амінопептидазна активність, був ідентифікований у печінці, нирках, селезінці, головному мозку різних тварин. Його роль при неоплазії не з'ясована.

Метою даної роботи було виділення та очищення лізосомного цистеїнового катепсину

© В.І. Чорна, О.Л. Лянна, А.В. Тарковська, О.П. Татаровський, 2007.

Н з папілярної і фолікулярної карцином ЩЗ людини та визначення відмінностей у їх фізико-хімічних властивостях для дослідження змін метаболічних процесів ЩЗ при канцерогенезі.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження були пухлини щитоподібної залози (папілярна та фолікулярна карциноми) людини. Післяопераційний матеріал хворих на онкологічні захворювання ЩЗ отримували в Дніпропетровській обласній клінічній лікарні ім. І.І. Мечнікова.

Усі операції з тканинами проводили при температурі 0-+4 °С. Гомогенати готували на 0,025 М трис-НСІ буфері (рН-7,4) у співвідношенні 1:9 і центрифугували (12 000 об./хв×20 хв). Отримані екстракти фракціонували сульфатом амонію в діапазоні 30-80 % насичення. Діаліз проводили проти дистильованої води, що містила 0,5 М NaCl, 0,002 М 2-МЕ і 0,001 М ЕДТО, або застосовували гель-фільтрацію на колонці із сефадексом G-25. Афінну хроматографію проводили на конканавалін А-агарозі. Білки, що не зв'язувалися з конканавалін А-агарозою, вимивали буферним розчином, яким була врівноважена колонка (0,1 М фосфатний буфер, рН-6,0 з 0,5 М NaCl, 1 ммоль CaCl₂, 1 ммоль MnCl₂, 1 ммоль MgCl₂).

Елюцію білків, що зв'язалися біоспецифічно з конканавалін А-агарозою, проводили тим же буфером, який містив 10 % метилглюкозид. Як для подальшого очищення досліджуваного

катепсину, так і для визначення його молекулярної маси проводили гель-хроматографію на колонці із сефадексом G-100 ("Pharmacia", Швеція).

Активність катепсину Н визначали в 1,0 мл інкубаційної суміші з 15-хвилинною преінкубацією ферменту за присутності 2 мМ 2-меркаптоетанолу і 2 мМ Na_2EDTO . Активність виражали в мкмоль нафтиламіну (2НА) на 1 мг білка за 1 хв при застосуванні субстрату 2-нафтиламіду L-лейцину (Лей-НА) [1]. Білок визначали за методом Бредфорд [3].

Кінетичні параметри ферментів визначали, використовуючи методи графічного аналізу Лайнуївера-Берка та Міхаеліса-Ментен [4]. Отримані результати статистичного обробляли за t-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати елюції очищених ферментів при афінній хроматографії на конканавалін А-агарозі з пухлин ЩЗ після діалізу представлено на рисунку 1.

Слід відмітити ефективність цієї стадії в процедурі виділення катепсину Н. Наявність

значних маннозних залишків в олігосахаридному компоненті катепсину Н пояснює його спорідненість до конканаваліну А. У фракціях, що зв'язались з конканавалін А-агарозою, пік активності катепсину збігався з білковим. Ступінь очищення на даному етапі становив 148 і 132 разів для катепсинів Н з папілярної та фолікулярної карцином ЩЗ відповідно порівняно з гомогенатами.

Для подальших досліджень використовували фракції, які зв'язались афінно з носієм, і наносили їх на колонку із сефадексом G-100 для визначення молекулярної маси ферментів. Застосована схема виділення катепсинів Н із папілярної та фолікулярної пухлин ЩЗ дозволила одержати ферменти, очищені у 404 та 436 разів відповідно порівняно з гомогенатами. Молекулярна маса отриманих катепсинів Н (за даними гель-фільтрації та електрофорезу в поліакриламідному гелі з додаванням додецил сульфату натрію) дорівнювала 29 кДа.

Аналіз кінетичних характеристик за Міхаелісом-Ментен, уточнений методами Лайнуївера-Берка, з'ясував, що V_{max} для отриманих

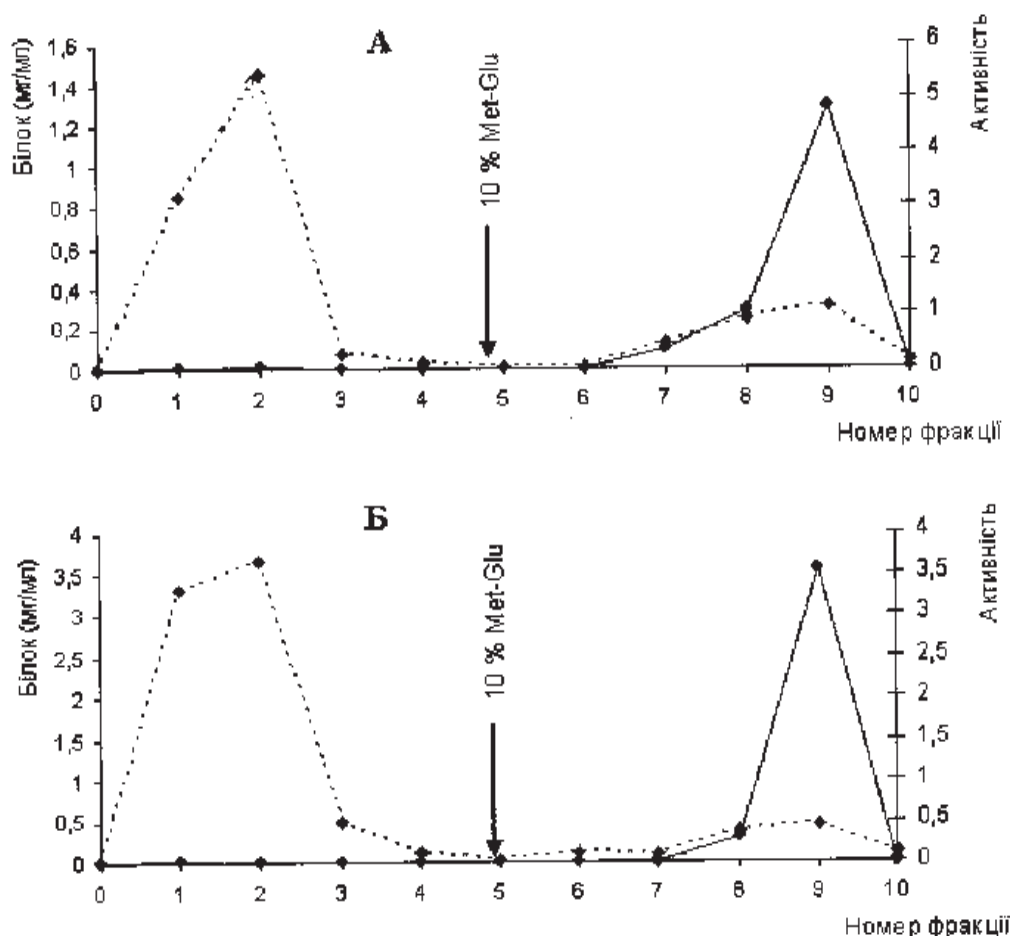


Рис. 1. Профілі елюції при афінній хроматографії на конканавалін А-агарозі: А – папілярна карцинома ЩЗ; Б – фолікулярна карцинома ЩЗ; ---♦--- – профіль елюції білка; —●— – активність катепсину Н.

препаратів катепсинів Н, виділених та очищених з папілярної і фолікулярної карцином ЩЗ, дорівнює 12 та 9,3 2-нафтиламіду L-лейцину (Лей-НА) в мкмоль нафтиламіну (2НА) на 1 мг білка за 1 хв, а K_m – близько $7 \cdot 10^{-5}$ та $1,4 \cdot 10^{-6}$ М відповідно (рис. 2). Показано, що при фолікулярній карциномі ступінь спорідненості ферменту до хромогенного субстрату більший, ніж при папілярній карциномі ЩЗ, що, у свою чергу, свідчить про можливі зміни як механізмів фермент-субстратної взаємодії в ендокринній клітині, так і процесів регуляції ферментативної активності внутрішньоклітинними модуляторами при зростанні ступеня злоякісності пухлини [9]. На користь останнього припущення свідчать дані, отримані нами при вивченні характеру кривої насичення ферментів хромогенними субстратами (див. рис. 2).

Встановлено, що залежності швидкості реакції катепсинів Н, виділених та очищених з різних пухлин ЩЗ, від концентрації субстрату мають різний характер. Крива залежності катепсину Н, виділеного з папілярної карциноми, від концентрації субстрату має форму гіперболи, тоді як залежність активності катепсину Н з фолікулярної карциноми проявляє сигмоїдний характер. Встановлена сигмоїдна залежність активності катепсину Н відображає, з одного боку, високу чутливість ферменту до

змін концентрацій метаболітів, а з іншого – можливість алостеричної регуляції ферменту.

При неоплазії роль катепсину Н не визначена, але встановлено, що при пухлинному рості катепсин Н-подібний фермент може брати участь у деструкції компонентів екстрацелюлярного матриксу клітин меланоми і сприяти проліферації та метастазуванню [6]. Імуногістохімічно встановлена більша експресія катепсину Н в метастазах меланоми, ніж у первинній пухлині [10]. Відомо, що при ракових захворюваннях голови та шиї, на фоні підвищеної активності катепсинів В та L в пухлинних тканинах, встановлено знижений рівень активності катепсину Н [8], цей факт запропоновано використовувати як діагностичний показник. Прогностичне значення катепсин Н має при лікуванні ракового захворювання легенів у групі курців, оскільки підвищений рівень активності цього ферменту вказує на невелику тривалість життя хворого [2].

Отримані дані можуть бути додатковим критерієм об'єктивної оцінки реакції тканини щитоподібної залози на пухлинну трансформацію в експериментальних та клінічних умовах, що необхідно для підвищення ефективності терапії пухлин, і дозволяють детальніше зрозуміти перебіг процесів білкового катаболізму, що відбуваються в пухлинах ЩЗ.

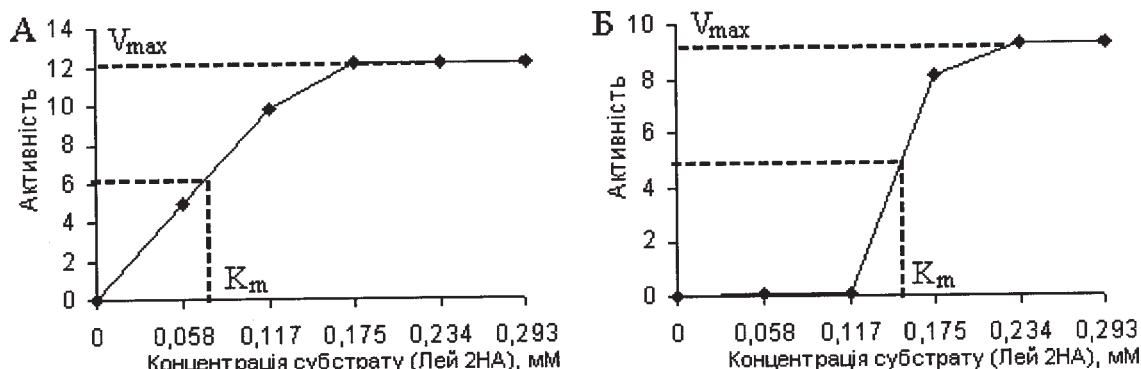


Рис.2. Залежність активності за Міхаелісом-Ментен катепсинів Н, виділених та очищених з: А – папілярної карциноми; Б – фолікулярної карциноми, від концентрації субстрату (Лей 2НА, мМ).

ВИСНОВКИ. Запропоновано процедуру виділення та очищення лізосомного цистеїнового катепсину Н з папілярної та фолікулярної карцином ЩЗ людини. Визначені кінетичні

характеристики виділених ферментів свідчать про особливості в механізмах взаємодії ферментів із субстратами при пухлинній трансформації клітин ендокринної тканини ЩЗ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Черная В.И., Рева А.Д. Активность катепсина Н в мозге и опухолях мозга человека // Укр. биохим. журн. – 1989. – 61, № 5. – С. 47-50.

2. Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers // Clinica Chimica Acta. – 2004. – 342. – Р. 41-69.

3. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – **72**. – P. 248-254.

4. Fundamentals of enzyme kinetics / Ed. by A. Cornish-Bowden. – London: Portland Press Ltd, 2002. – 343 p.

5. Jedeszko C., Sloane B.F. Cysteine cathepsins in human cancer // *Biol. Chem.* – 2004. – **385**. – P. 1017-1027.

6. Kageshita T., Yoshii A., Kimura T. Biochemical and immunohistochemical analysis of cathepsins B, H, L and D in human melanocytic tumours // *Arch. Dermatol. Res.* – 1995. – **287**, № 3-4. – P. 266-272.

7. Kirschke H., Langner J., Riemann S. et al. Lysosomal Cysteine Proteinases: Protein degradation in Health and Disease. – Elsevier: North Holland, 1980. – P. 15-35.

8. Kos J., Schweiger A. Cathepsins and cystatins in extracellular fluids – useful biological markers in cancer // *Radiol. Oncol.* – 2002. – **36**, № 2. – P. 176-179.

9. Otto H.-H., Schirmeister T. Cysteine proteases and their inhibitors // *Chem. Rev.* – 1997. – **97**. – P. 133-171.

10. Tsushima H., Ueki A., Matsuoka Y. Characterization of a cathepsin-H-like enzyme from a human melanoma cell line // *Int. J. Cancer.* – 1991. – **48**, № 5. – P. 726-732.

ОСОБЕННОСТИ КИНЕТИКИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА ЛИЗОСОМНОГО ЦИСТЕИНОВОГО КАТЕПСИНА H ПРИ КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ

В.И. Черная, О.Л. Лянная, А.В. Тарковская, А.П. Татаровский
ДНЕПРОПЕТРОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Предложенная схема выделения и очистки лизосомного цистеинового катепсина H позволила получить за 5 этапов (гомогенизация, высаливание сульфатом аммония (30-80 % насыщения), диализ, аффинная хроматография на конканавалин А-агарозе, гель-фильтрация на сефадексе G-100) очищенный в 404 и 436 раз катепсин H из папиллярной и фолликулярной карцином щитовидной железы (ЩЖ) человека. Определена молекулярная масса полученных ферментов. Методами графического анализа установлено различие в кинетике ферментативного катализа и физико-химических свойствах катепсина H при данных патологиях ЩЖ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: катепсин H, опухоли щитовидной железы, кинетика ферментативного катализа.

FEATURES OF KINETICS OF FERMENTATIVE CATALYSIS OF LYSOSOMAL CYSTEINE CATHEPSIN H FROM THYROID TUMORS

V.I. Chorna, O.L. Lyanna, A.V. Tarkovska, O.P. Tatarovsky
DNIPROPETROVSK NATIONAL UNIVERSITY

Summary

The suggested scheme of isolation and purification of lysosomal cysteine cathepsin H allowed to get at 5 stages (homogenization, salting-out by ammonium sulfate (30-80 % saturation), dialysis, affine chromatography on concanavalin A-agarose, gel-chromatography on sephadex G-100) the cathepsins H from papillary and follicular thyroid carcinomas purified in 404 and 436 folds accordingly. The molecular weight of obtained enzymes was found. Using graphic methods it was established that there were differences in enzymatic catalysis kinetics and physical-chemical properties at the researched thyroid pathologies.

KEY WORDS: cathepsin H, thyroid tumors, kinetics of fermentative catalysis.

Отримано 19.02.2007 р.

Адреса для листування: В.І. Чорна, ДНУ, медичний факультет, вул. Наукова, 13, Дніпропетровськ, 49050, Україна.

КАТІОННА СПЕЦИФІЧНІСТЬ Na^+ , K^+ -АТФази МЕМБРАН ЗАРОДКІВ В'ЮНАМ.В. Целевич, С.М. Мандзинець, Д.І. Санагурський
Львівський національний університет імені Івана Франка

Досліджено катіонну специфічність Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТФ мікосомальною фракцією мембран зародків в'юна протягом раннього ембріогенезу стосовно катіонів двовалентних металів (Ba^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}) та літію (Li^+). Встановлено, що АТФ-гідролазна реакція, яка каталізується за присутності везикул мембран бластомерів (зародкових клітин), є неспецифічною стосовно як літію, так і катіонів двовалентних металів. Однак, згідно з отриманими результатами, катіони Co^{2+} та Cd^{2+} досить ефективно замінюють Mg^{2+} у процесі дослідження Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТФ везикулами мембран зародків.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: катіони двовалентних металів, літій, Na^+ , K^+ -АТФаза, катіонна специфічність АТФази, поділ бластомерів, зародки в'юна.

ВСТУП. Просторова модель іонтранспортувального каналу Na^+ , K^+ -помпи, яку запропонували J.C. Skou та інші дослідники [8, 15], передбачає наявність у ньому локусів із високою спорідненістю до Na^+ та K^+ (катіонзв'язувальні центри), а також існування центру зв'язування комплексу Mg^{2+} •АТФ. Однак властивості даних центрів, зокрема фактори, що визначають вибіркове їх зв'язування, дисоціацію комплексів та пригнічення транслокації катіонів, залишаються маловивченими. Одним із можливих підходів до вивчення цих питань є дослідження механізмів дії катіонів двовалентних металів з подібним до Mg^{2+} кристалографічним радіусом на функціонування Na^+ , K^+ -помпи.

Двовалентні катіони (Cu^{2+} , Ba^{2+}) здатні інгібувати захоплення $^{45}\text{Ca}^{2+}$ везикулами плазматичних мембран гепатоцитів [21, 22] та хроматинних клітин надниркових залоз великої рогатої худоби [9]. Проте іншими авторами показано [13], що Mn^{2+} та Co^{2+} (нмоль/л) стимулюють Ca^{2+} , Mg^{2+} -залежний гідроліз АТФ плазматичних мембран гепатоцитів щурів. Л.О. Дубицький та А.С. Вовканич виявили [2], що катіони двовалентних металів (Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}) пригнічують транслокацію кальцію Ca^{2+} -помпою секреторних клітин шлункових залоз морських свинок.

Багатьма дослідниками також встановлено [7, 17, 20-21], що катіони вищезазначених двовалентних металів інактивують Na^+ , K^+ -АТФазу різних об'єктів. Показано, що іони хрому інгібують Na^+ , K^+ -; Ca^{2+} , Mg^{2+} - та Mg^{2+} , HCO_3^- -

© М.В. Целевич, С.М. Мандзинець, Д.І. Санагурський, 2007.

АТФази клітин зябер, нирок та кишечника риб *Periophthalmus dipses* [16], а катіони Cd^{2+} – високоспоріднену Ca^{2+} -АТФазу в клітинах зябер *Oreochromis mossambicus* [18]. У свою чергу, іони Hg^{2+} та Cd^{2+} інгібують транспорт натрій-сульфатного обмінника [12], а катіони Mn^{2+} блокують калієвий канал IRK1 ооцитів *Xenopus laevis* [19].

Відомості про здатність інших двовалентних катіонів замінювати Mg^{2+} в Na^+ , K^+ -активованому Me^{2+} -гідролізі АТФ на плазматичні мембрани зародкових клітин є нечисленними. Тому мета роботи полягала у дослідженні ферментативної активності Na^+ , K^+ -помпи на різних стадіях поділу бластомерів при еквімолярній заміні Mg^{2+} у середовищі інкубації на Ba^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} (для порівняння використовували одновалентні іони Li^+). Це має важливе й актуальне значення для подальшого розуміння ролі реакції Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТФ у забезпеченні внутрішньоклітинного іонного гомеостазу зародків в онтогенезі.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проведено на зародках в'юна (*Misgurnus fossilis* L.) у період від запліднення до стадії Х поділу бластомерів. Овуляцію стимулювали внутрішньом'язовим введенням самкам хоріогонічного гонадотропіну (500 од.). Ікру одержували через 36 год після стимуляції та запліднювали в чашках Петрі суспензією спермій за Нейфахом [5]. Стадії розвитку контролювали візуально під бінокулярним мікроскопом МБС-9. Мікосомальну фракцію мембран зародків одержували методом диференційного центрифугування (10 хв при 10 000 g) у градієнті густини саха-

рози, як було описано у статті М.Д. Луцика та ін. [3].

Перед початком експерименту аліквоти суспензії мембранного препарату переносили в стандартне середовище інкубації такого складу (ммоль/л): NaCl – 30,0; KCl – 120,0; $MgCl_2$ – 3,0; ATP- Na_2 – 3,0; NaN_3 – 1,0; EGTA – 1,0; трис-HCl – 50,0 (pH=7,4; 21 °C). Загальну АТФазну активність оцінювали за вмістом P_i у середовищі інкубації, кількість якого визначали за модифікованим методом Фіске-Суббароу [4] і виражали у мкмоль P_i /год на 1 мг білка, а вміст білка визначали за методом О. Lowry [11]. Na^+ , K^+ -АТФазну активність визначали за різницею між загальною АТФазною активністю та активністю в присутності 1 мМ убаїну. Для дослідження катіонної специфічності реакції Na^+ , K^+ -активованого, Mg^{2+} -залежного ферментативного гідролізу АТФ ізоконцентраційно замінювали $MgCl_2$ (3 мМ) на хлориди вищезазначених металів. При цьому використовували реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації х.ч., а також EGTA, NaN_3 ("Merk", Німеччина), убаїн ("Fluka", Швейцарія), АТФ ("Acros", Бельгія), трис ("Sigma", США). Достовірність змін визначали за t-критерієм Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Активність Na^+ , K^+ -активованої, Mg^{2+} -залежної АТФази зародків в'юна в нормальних умовах зростає на ранніх етапах ембріогенезу [1, 6]. Такі результати були отримані Р.К. Leong [10] на зародках морських їжаків при вивченні характеру змін Na^+ , K^+ -АТФазної активності зародків під час поділу бластомерів.

Питома активність Na^+ , K^+ -АТФази зародків на стадії 2 бластомерів становила ($11,6 \pm 0,82$) мкмоль P_i /год на 1 мг білка. При еквімолярній заміні в середовищі інкубації Mg^{2+} на Ba^{2+} , а особливо на Li^+ , не спостерігалось достовірного ініціювання ферментативного гідролізу АТФ зародками, особливо в останньому випадку (рис. 1).

Na^+ , K^+ -АТФазна активність становила ($1,6 \pm 0,28$) та ($0,47 \pm 0,06$) мкмоль P_i /год на 1 мг білка відповідно. У разі заміни Mg^{2+} на Co^{2+} й Zn^{2+} спостерігалось достовірне ініціювання ферментативного гідролізу АТФ порівняно з Mg^{2+} -вмісним середовищем. Питома активність Na^+ , K^+ -АТФази за наявності в середовищі інкубації вищезазначених катіонів знижувалася в середньому на ($21,2 \pm 0,2$) та ($44,6 \pm 0,6$) % порівняно з контролем. Еквімолярна заміна Mg^{2+} в середовищі інкубації везикул мембран бластомерів на Cd^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} та Cu^{2+} приводила до статистично достовірного пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФази більше ніж на 50 %

(див. рис. 1), однак у даному випадку все ж таки спостерігали Me^{2+} -залежний гідроліз АТФ везикулами зародків.

На стадії 16 бластомерів (рис. 2), як і на попередній досліджуваній стадії розвитку зародків, після внесення в середовище інкубації Li^+ не спостерігалось ініціювання ферментативної реакції. Однак заміна Mg^{2+} на Ba^{2+} супроводжувалася незначним проявом ферментативного гідролізу АТФ, активність Na^+ , K^+ -АТФази за таких умов становила ($1,4 \pm 0,2$) мкмоль P_i /год на 1 мг білка, що складало 10,4 % активності у контролі ($p < 0,01$).

Показано, що еквімолярна заміна Mg^{2+} на Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} приводила до статистично достовірного пригнічення активності Na^+ , K^+ -АТФази на ($41,5 \pm 0,2$), ($47,8 \pm 0,1$) та ($50,1 \pm 0,1$) % ($p < 0,01$) порівняно з контролем. Більш виражене зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази виявлено за умов внесення в середовище інкубації катіонів Ni^{2+} , Mn^{2+} та Cu^{2+} замість катіонів Mg^{2+} . Величина питомої Me^{2+} -залежної АТФ-гідролізної ферментативної активності становила ($4,5 \pm 0,8$), ($4,0 \pm 0,3$) та ($3,5 \pm 1,1$) мкмоль P_i /год на 1 мг білка відповідно, що складало 32,3, 28,9 та 24,9 % активності Na^+ , K^+ -АТФази за нормальних умов, яка, у свою чергу, становила ($13,97 \pm 1,3$) мкмоль P_i /год на 1 мг білка (див. рис. 2). Це свідчило про менш виражену спорідненість Na^+ , K^+ -АТФази зародків стосовно вищезазначених катіонів металів.

Na^+ , K^+ -АТФазна активність зародків на стадії 64 бластомерів становила ($15,3 \pm 0,9$) мкмоль P_i /год на 1 мг білка (рис. 3). В інкубаційному середовищі, яке містило іони Li^+ замість Mg^{2+} у мікросомальній фракції мембран зародків, не

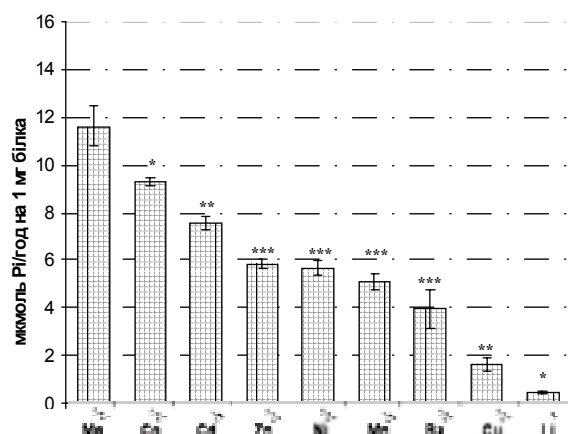


Рис. 1. Катіонна специфічність стосовно іонів Mg^{2+} реакції ферментативного гідролізу АТФ у мікросомальній фракції мембран зародкових клітин в'юна на стадії 2 бластомерів ($n=10$).

Примітка. * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – вірогідні зміни порівняно з контролем (Mg^{2+}); в усіх випадках, за винятком $LiCl_2$, використовували хлориди двовалентних металів.

тестувалась АТФ-гідролазна ферментативна активність. Внесення у безмагнієве середовище інкубації Ba^{2+} та Ni^{2+} спричиняло зниження активності Na^+, K^+ -АТФази в середньому до $(2,4 \pm 0,1)$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, що складало тільки 15,7 % активності ферменту в контролі, і свідчило про досить низьку спорідненість ферменту до цих катіонів.

Еквімолярна заміна Mg^{2+} в середовищі інкубації на Co^{2+} і Cd^{2+} приводила до незначного статистично достовірного зниження інтенсивності ферментативного гідролізу АТФ на $(18,4 \pm 0,4)$ та $(29,5 \pm 0,5)$ % порівняно з контролем (див. рис. 3). Внесення у безмагнієве середовище інкубації катіонів Zn^{2+} , Cu^{2+} та Mn^{2+} , як і в попередніх дослідках, ініціювало Na^+, K^+ -активованій Me^{2+} -залежний гідроліз АТФ (>50 %). За таких умов активність Na^+, K^+ -АТФази становила $(6,4 \pm 1,1)$, $(6,1 \pm 0,9)$ та $(5,4 \pm 3,5)$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка відповідно.

Протягом 5 год розвитку зародків уабаїн-чутлива АТФаза активність зростала і на стадії VIII поділу бластомерів досягала максималь-

ного значення – $(17,9 \pm 0,7)$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка (рис. 4). На цій стадії розвитку заміна катіонів Mg^{2+} на Li^+ супроводжувалася недостовірним ініціюванням ферментативного гідролізу АТФ, який складав 10,2 % відносної активності Na^+, K^+ -АТФази у контролі. Однак додавання до безмагнієвого середовища катіонів Ba^{2+} та Cu^{2+} приводило також до вираженого ініціювання ферментативної реакції Me^{2+} -залежного гідролізу АТФ мембранами зародків, активність Na^+, K^+ -АТФази за таких умов становила 31,5 % активності у контролі. Отримані результати можна пояснити тим, що на цій годині розвитку спостерігалось зростання інтенсивності всіх фізіологічних процесів, саме в цей період у зародків знижувався мітотичний індекс і підвищувалась морфогенетична активність ядер. До цього часу зародки розвивались за рахунок генетичної інформації, нагромадженої материнським організмом, а всі біосинтетичні процеси вимагали перерозподілу пулів макроергів.

Заміна Mg^{2+} на Co^{2+} приводила до менш вираженого зниження інтенсивності фермента-

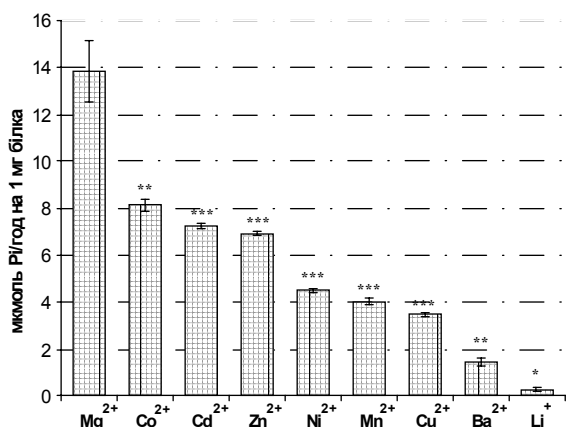


Рис. 2. Катіонна специфічність стосовно іонів Mg^{2+} реакції ферментативного гідролізу АТФ у мікросомальній фракції мембран зародкових клітин в'юна на стадії 16 бластомерів.

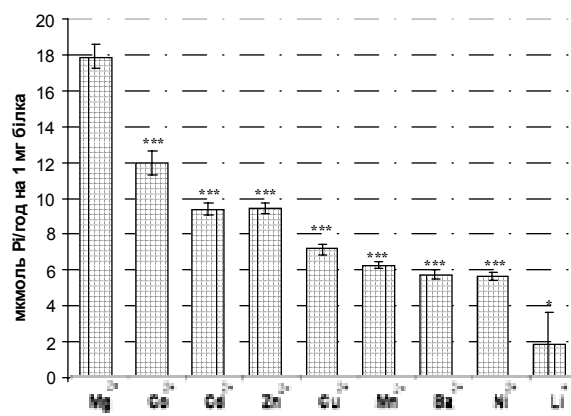


Рис. 3. Катіонна специфічність стосовно іонів Mg^{2+} реакції ферментативного гідролізу АТФ у мікросомальній фракції мембран зародкових клітин в'юна на стадії 64 бластомерів.

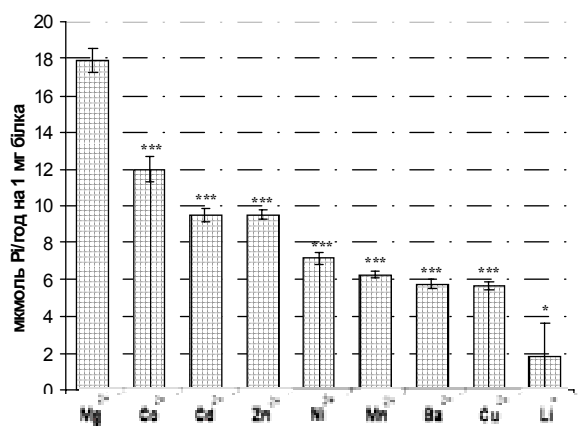


Рис. 4. Катіонна специфічність стосовно іонів Mg^{2+} реакції ферментативного гідролізу АТФ у мікросомальній фракції мембран зародкових клітин в'юна на стадії VIII поділу бластомерів.

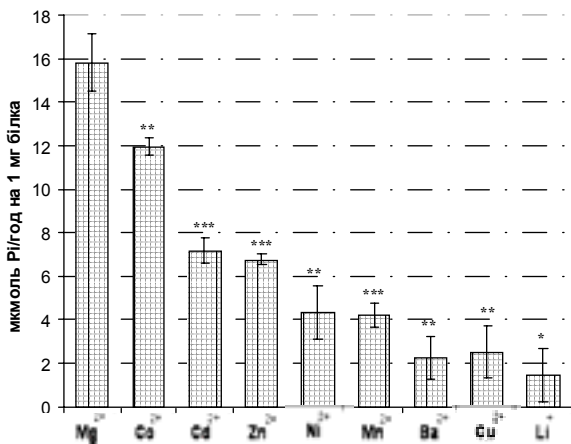


Рис. 5. Катіонна специфічність стосовно іонів Mg^{2+} реакції ферментативного гідролізу АТФ у мікросомальній фракції мембран зародкових клітин в'юна на стадії X поділу бластомерів.

тивного гідролізу АТФ порівняно з контрольним середовищем – у середньому на $(43,9 \pm 2,7 \%)$ (див. рис. 4). Після внесення в середовище інкубації Zn^{2+} та Cd^{2+} замість Mg^{2+} активність Na^+ , K^+ -АТФази за таких умов складала 53,2 та 51,8 % відносно активності ферменту в контролі. Показано, що заміна Mg^{2+} на Ni^{2+} та Mn^{2+} спричиняла більш виражене зниження активності Na^+ , K^+ -АТФази зародків.

За таких умов ферментативна активність Na^+ , K^+ -помпи становила $(7,1 \pm 0,2)$ та $(6,3 \pm 0,2)$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, що складало 39,9 та 35,1 % активності ферменту в контролі.

Слід зазначити, що на стадії Х поділу бластомерів Na^+ , K^+ -АТФаза активність зародків в'юна достовірно знижувалася на $(11,6 \pm 0,2) \%$ порівняно з попередньою стадією розвитку і становила $(15,8 \pm 1,3)$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка (рис. 5). У разі заміни Mg^{2+} на одновалентні іони Li^+ відмічено недостовірне ініціювання ферментативного гідролізу АТФ мембранними везикулами зародків.

При еквімолярній заміні Mg^{2+} в стандартному середовищі інкубації на Ba^{2+} та Cu^{2+} спостерігалось також вагоме зростання Me^{2+} -залежної АТФ-гідролазної ферментативної активності фракції мембран зародків на 18-15 % порівняно з активністю ферменту в контролі.

Після внесення в інкубаційне середовище замість Mg^{2+} катіонів Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} відмічено також достовірне зростання інтенсивності ферментативного гідролізу АТФ порівняно з контрольним середовищем ($>50 \%$). Активність Na^+ , K^+ -АТФази за таких умов становила $(7,1 \pm 0,6)$, $(6,7 \pm 0,2)$, $(4,3 \pm 1,2)$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка відповідно.

На досліджуваній стадії розвитку відзначено достовірне ініціювання ферментативного гідролізу АТФ за умов внесення у безмагнієве середовище Co^{2+} , активність ферменту зародків становила $(11,9 \pm 0,39)$ мкмоль P_i /год на 1 мг білка, що складало 75,4 % активності у контролі.

Отже, величина питомої Me^{2+} -залежної АТФ-гідролазної ферментативної активності мікросомальної фракції мембран зародків в'юна, тобто здатність препаратів плазматичних мембран та мембран ендоплазматичного ретикулула гідролізувати АТФ у присутності Me^{2+} (10^{-3} моль/л), задовольняє такі ряди:

$Mg^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} \geq Ni^{2+} > Mn^{2+} > Cu^{2+} > Ba^{2+} > Li^+$ (стадія 2 бластомерів);
 $Mg^{2+} > Co^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Mn^{2+} > Cu^{2+} > Ba^{2+} > Li^+$ (стадія 16 бластомерів);
 $Mg^{2+} > Co^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} \geq Cu^{2+} > Mn^{2+} > Ni^{2+} \geq Ba^{2+} > Li^+$ (стадія 64 бластомерів);
 $Mg^{2+} > Co^{2+} > Cd^{2+} > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Mn^{2+} > Cu^{2+} \geq Ba^{2+} > Li^+$ (VIII поділ);
 $Mg^{2+} > Co^{2+} > Cd^{2+} \geq Zn^{2+} > Ni^{2+} \geq Mn^{2+} > Cu^{2+} \geq Ba^{2+} > Li^+$ (X поділ).

Отримані ряди спорідненості Na^+ , K^+ -АТФази зародкових клітин в'юна загалом доповнюють ряди, які було одержано для Me^{2+} -залежної АТФази плазматичних мембран гладенько-м'язових клітин трахеї [14] та клітин шлункових залоз [2].

Таким чином, Na^+ , K^+ -АТФаза плазматичних мембран зародків характеризується високою спорідненістю до катіонів Mg^{2+} , менш вираженою спорідненістю до Co^{2+} та Cd^{2+} та низькою спорідненістю до Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} та Ba^{2+} . Слід зазначити, що, згідно з одержаними даними, Na^+ , K^+ -АТФаза мембран зародків не володіє спорідненістю до одновалентних іонів Li^+ .

ВИСНОВКИ. На основі отриманих результатів можна зробити висновок, що катіони Co^{2+} та Cd^{2+} можуть досить ефективно замінювати Mg^{2+} у процесі Mg^{2+} -залежного гідролізу АТФ плазматичних мембран і мембран ендоплазматичного ретикулула зародкових клітин. Катіони Zn^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} менш ефективно, однак замінюють Mg^{2+} у процесі ферментативної реакції, а іони Ba^{2+} та Li^+ практично не ініціюють ферментативного гідролізу АТФ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бериташвили Д.Р., Кутателадзе Т.В., Маршани Д.О. и др. Аденозинтрифосфаты в эмбриональном развитии вьюна // Онтогенез. – 1974. – **5**, № 4. – С. 363-371.
2. Дубицкий Л.О., Вовканич А.С. Взаємодія катіонів металів з Ca^{2+} -транспортним центром Ca^{2+} -помпи плазматичних мембран секреторних клітин шлункових залоз // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**. – С. 39-46.
3. Луцук М.Д., Лукьяненко А.В., Кусень С.И. Метод массового механического удаления оболочек из зародышей вьюна // Онтогенез. – 1983. – **14**, № 6. – С. 386-388.
4. Методы биохимических исследований (ли-

пидный и энергетический обмен): Учеб. пособие / Под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982. – 272 с.

5. Нейфах А.А., Ротт Н.Н. // Доклад НН СССР. – 1959. – **125**, № 2. – С. 423-434.

6. Целевич М.В., Бойко Н.М., Мандзинець С.М. та ін. Інгібувальний вплив фторхінолонів на Na^+ , K^+ -АТФ-азну активність зародків в'юна *Misgurnus fossilis* L. // Вісник Львів. ун-ту. Серія: Біологія. – 2004. – **35**. – С. 40-46.

7. Boiko N.M., Tselevych M.V., Sanahurskyi D.I. Effect of heavy metal cations on the activity of membrane Na^+ , K^+ -ATPase in embryos of loach (*Misgurnus fossilis* L.) // Ukr. Biokhim. Zh. – 2004. – **76**. – Р. 59-63.

8. Lauger P. Electrogenic properties of the Na,K-pump // Prog. Clin. Biol. Res. – 1988. – **273**. – P. 217-224.
9. Leslie S.W., Borowitz J.L. Inhibition of the adrenal chromaffin cell membrane calcium pump by caffeine and various divalent cations // Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. – 1975. – **11**. – P. 413-424.
10. Leong P.K., Manahan D. Metabolic importance of Na⁺/K⁺-ATPase activity during sea urchin development // J. Exp. Biol. – 1997. – **200**. – P. 2881-2892.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.G., Farr A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, № 1. – P. 265-275.
12. Markovich D., Knight D. Renal Na-Si cotransporter NaSi⁻¹ is inhibited by heavy metals // Am. J. Physiol. – 1998. – **274**. – P. F283-F289.
13. Pecker F., Lotersztajn S. Fe²⁺ and other divalent metal ions uncouple Ca²⁺ transport from (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase in rat liver plasma membrane // J. Biol. Chem. – 1985. – **260**. – P. 731-735.
14. Pacheco G., Lippo de Becemberg I., Gonzalez de Alfonso R. et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 1996. **1282**, № 2. – P. 182-192.
15. Skou J.C. The fourth Datta lecture. The energy coupled exchange of Na⁺ for K⁺ across the cell membrane. The Na⁺,K⁺-pump // FEBS Lett. – 1990. – **268**. – P. 314-324.
16. Thaker J., Chhaya J., Nuzhat S. et al. Effects of chromium(VI) on some ion-dependent ATPases in gills, kidney and intestine of a coastal teleost *Periophthalmus dipes* // Toxicology. – 1996. – **112**. – P. 237-244.
17. Voskoboinik I. C.J.M.J.F. Understanding the mechanism and function of copper P-type ATPases // Adv. Protein. Chem. – 2002. – **60**. – P. 123-150.
18. Wong C.K., Wong M.H. Morphological and biochemical changes in the gills of *Tilapia* to ambient cadmium exposure // Aquatic. Toxicol. – 2000. – **48**. – P. 517-527.
19. Xie A., Zang Y.M., Zhu M.Z. The blocking effects of extracellular Mn²⁺ on the inward rectifier potassium channel (IRK1) // Zhongguo Ying. Yong. Sheng Li Xue. Za Zhi. – 2000. – **16**. – P. 331-334.
20. Yucebilgic G., Bilgin R., Tamer L. et al. Effects of lead on Na⁺-K⁺ATPase and Ca²⁺ATPase activities and lipid peroxidation in blood of workers // Int. J. Toxicol. – 2003. – **22**. – P. 95-97.
21. Zhang G.H., Kraus-Friedmann N. The effects of Mg²⁺ on rat liver microsomal Ca²⁺ sequestration // Cell Calcium. – 1990. – **11**. – P. 397-403.
22. Zichittella A.E. Reactivity of cysteines in the transmembrane region of the Na⁺,K⁺-ATPase alpha subunit probed with Hg²⁺ // J. Membr. Biol. – 2000. – **177**. – P. 187-197.

КАТИОННАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ Na⁺,K⁺-АТФазы МЕМБРАН ЗАРОДЫШЕЙ ВЬЮНА

М.В. Целевич, С.М. Мандзинец, Д.И. Санагурский
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ИВАНА ФРАНКО

Резюме

Исследовано катионную специфичность Na⁺,K⁺-активированного, Mg²⁺-зависимого ферментативного гидролиза АТФ микросомальной фракцией мембран зародышей вьюна на протяжении раннего эмбриогенеза относительно катионов двухвалентных металлов (Ba²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺) и лития (Li⁺). Установлено, что АТФ-гидролазная реакция, которая катализируется в присутствии везикул мембран бластомеров (зародышевых клеток), является неспецифической как к литию, так и к катионам двухвалентных металлов. Однако, согласно полученным результатам, катионы Co²⁺ и Cd²⁺ эффективно замещают Mg²⁺ в процессе исследования Mg²⁺-зависимого ферментативного гидролиза АТФ везикулами мембран зародышей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: катионы двухвалентных металлов, литий, Na⁺,K⁺-АТФаза, катионная специфичность АТФазы, деление бластомеров, зародыши вьюна.

Na⁺,K⁺-ATPase CATIONIC SPECIFICITY OF THE LOACH EMBRYO MEMBRANES

M.V. Tselevych, S.M. Mandzynets, D.I. Sanahursky
LVIV NATIONAL UNIVERSITY BY IVAN FRANKO

Summary

The cationic specificity of the Na⁺,K⁺-activated, Mg²⁺-dependent ATP hydrolysis of microsomal fraction of membrane of loach embryos during early embryogenesis to bivalent (Ba²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺) and lithium (Li⁺) metal cations has been researched. It has appeared, that the ATP-hydrolysis reaction is nonspecific both in relation to cations of lithium and bivalent metals. The research results revealed that cations Co²⁺ and Cd²⁺ effectively replace Mg²⁺ in the process of investigation of Mg²⁺-dependent enzymatic hydrolysis of ATP in membrane vesicles of embryos.

KEY WORDS: cations of bivalent metals, lithium, Na⁺,K⁺-ATPase, cationic specificity of ATPase, division of blastomers, loach embryos.

Отримано 14.07.2006 р.

Адреса для листування: М.В. Целевич, Львівський національний університет імені Івана Франка, кафедра біофізики та біоінформатики, вул. Грушевського, 4, Львів, 79005, Україна.

ВПЛИВ АКТИВАЦІЇ ПЕРИФЕРИЧНИХ ОПІАТНИХ РЕЦЕПТОРІВ НА ВМІСТ СТАБІЛЬНИХ МЕТАБОЛІТІВ ОКСИДУ АЗОТУ, ВІЛЬНОГО СФІНГОЗИНУ, ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНИЙ СТАН ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ОКИСНОМУ СТРЕСІ МІОКАРДА

I.O. Комаревцева, М.Є. Андросова
ЛУГАНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

В експерименті встановлено збільшення рівня стабільних метаболітів оксиду азоту, вільного сфінгозину та зниження активності супероксиддисмутази (СОД) при доксорубіциніндукованій моделі окисного стресу. Активація периферичних μ - та σ -опіатних рецепторів до формування гострої серцевої недостатності викликала зменшення вмісту метаболітів оксиду азоту, вільного сфінгозину, підвищувала активність СОД у міокарді.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: серцева недостатність, опіатні рецептори, оксид азоту, вільний сфінгозин, супероксиддисмутаза.

ВСТУП. Численні літературні дані свідчать про те, що окисний стрес в організмі може індукувати процес апоптозу [2, 12, 14]. Однією з важливих органел клітини, що безпосередньо бере участь у розвитку апоптозу при ураженні серцево-судинної системи, є мітохондрія [18]. Активні форми кисню (АФК), активні форми азоту (АФА), деякі токсини, а також окремі хіміотерапевтичні препарати (бетулінова кислота, лонідамін, антрациклінові антибіотики) призводять до апоптотичної загибелі клітин міокарда незалежно від інших ініціаторних систем клітини, включаючи "рецептори смерті" або білок p53 [3, 15, 17]. Дія їх зводиться до різкого зниження електрохімічного потенціалу мітохондріальних мембран, що супроводжується виходом з мітохондрій у цитоплазму важливого компонента дихального ланцюга – цитохрому С та елевацією рівня найбільш ефекторної каспази – каспази-3 [13].

Синтетичні антиоксиданти, які застосовують на сьогодні, здатні ефективно попереджувати ушкодження, що виникають при експериментальній ішемії та реперфузії, прийманні кардіотоксичних цитостатиків, однак вони повинні не порушувати дії цих ліків, нівелювати або знижувати їх токсичність, не ушкоджувати нормальних клітин організму [16].

На наш погляд, одним з підходів до підвищення активності системи ендогенних антиоксидантів може бути активація ендогенної

опіоїдної системи. Значна поширеність і різноманітність функцій опіоїдів дозволили віднести їх до класу регуляторних пептидів. Так, спектр дії синтетичного лей-енкефаліну – даларгіну – досить широкий і відображає функції регуляторних пептидів, спрямовані на підтримку гомеостазу. Препарат проявляє гіпотензивну, антистресову, антиішемічну й антигіпоксичну активність [5]. Отримані експериментальні дані свідчать про те, що даларгін знижує летальність експериментальних тварин при серцевих і ниркових патологічних станах [4, 5, 7]. Можна припустити, що певний вплив, пов'язаний з його антиоксидантними властивостями, він буде чинити і на апоптоз.

Генератором вторинних посередників, що беруть участь у регуляції апоптозу, є сфінгомеліновий цикл, основні компоненти якого – сфінгомелін, керамід, сфінгозин і ферменти сфінгомеліназа та керамідаза [10, 19]. Є літературні дані, що демонструють зміни вмісту сфінгомеліну, кераміду та сфінгозину при застосуванні антрациклінового антибіотика доксорубіцину. Показано, що окисний стрес при ушкодженні міокарда викликає підвищення рівня сфінгозину та кераміду на 40 %, при цьому передбачається важливе значення їх рівня в розвитку подальшого ушкодження міокарда [11].

Тому метою нашого дослідження було вивчити динаміку рівня стабільних метаболітів оксиду азоту, їх взаємозв'язок з рівнем вільного сфінгозину і станом антиоксидантного захисту

© I.O. Комаревцева, М.Є. Андросова, 2007.

за умов стимуляції апоптозу та при активації опіатних рецепторів (ОР).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експеримент виконували на білих щурах-самцях 16-18-тижневого віку. Дослідження на лабораторних тваринах проводили згідно з етичним кодексом МОЗ України.

Експериментальну гостру серцеву недостатність (СН) викликали шляхом введення доксорубіцину гідрохлориду (ВАТ "КІЇВМЕД-ПРЕПАРАТ") у сублетальній дозі (20 мг/кг) одноразово внутрішньоочеревинно. Контрольною групою були інтактні тварини того ж віку, яких утримували в аналогічних умовах. Декапітацію щурів проводили під ефірним наркозом на 1-шу, 3-тю, 5-ту і 7-му доби експерименту.

Даларгін ($\text{Dala}^2\text{-Leu}^5\text{-Arg}^6\text{-енкефалін}$) вводили внутрішньоочеревинно в дозі 100 мкг/кг за 20 хв до формування гострої СН і потім одноразово в той самий час протягом усіх діб експерименту. Контрольним тваринам вводили відповідний об'єм ізотонічного розчину натрію хлориду.

Біохімічну детекцію апоптозу проводили за фрагментацією ДНК із використанням лізис-буфера та дифеніламіну [8].

Вміст нітрит-аніонів визначали спектрофотометрично шляхом вимірювання азосполук, які утворюються під час реакції нітритів з реактивом Гріса в кислому середовищі. Вміст нітратів також визначали з використанням реактиву Гріса, але після їх відновлення до нітритів цинковим пилом [6]. Суму ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) приймали за рівень оксиду азоту в тканинах.

Для визначення вільних сфінгоїдних сполук у цитозольній фракції гомогенату використали модифікований метод, описаний М.І. Прохоровою [7].

Активність супероксиддисмутази (СОД) оцінювали за здатністю ферменту інгібувати накопичення продукту аутоокиснення адреналіну в лужному середовищі, що поглинає при 347 нм [9]. Загальну оксидантну активність (ЗОО) сироватки – за накопиченням у реакційній суміші кінцевого продукту перекисного окиснення (малонового діальдегіду). Як субстрат використовували твін-80, а як ініціатор – сироватку крові. Загальну антиоксидантну активність (ЗАО) сироватки оцінювали за ступенем інгібування аскорбат- і фероіндукованого окиснення твіну-80 до малонового діальдегіду.

Статистичну обробку експериментальних даних було проведено з використанням t-критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані нами дані [1] вказують на те, що в міокарді щурів експериментальних груп гострої СН сумарний рівень NO_2^- і NO_3^- був значно вищим, ніж у міокарді інтактних тварин (табл. 1). При цьому спостерігалася тенденція до зменшення частки NO_2^- у загальній кількості оксиду азоту на 1,21; 2,02; 1,84 й 1,29 % відповідно до строку спостереження з мінімальними показниками на 3-тю добу досліду (рис. 1). Це може свідчити про активацію перекисних процесів у клітинах міокарда, що сприяє переходу більшої частки NO у пероксинітрит, який чинить цитотоксичний, проапоптотичний вплив на клітини.

Генерація оксиду азоту iNOS також моделює ушкодження міокарда шляхом регуляції співвідношення рівнів реактивних форм кисню (РФК)/реактивних форм азоту (РФА). Як СОД, так і NO можуть взаємодіяти з $\text{O}_2^{\cdot-}$, що робить подальші їх фізіологічні функції важкопередбаченими [12]. Тому зростання активності

Таблиця 1 – Зміна вмісту оксиду азоту, сфінгозину, активності СОД у тканині міокарда та ЗОО, ЗАО сироватки при експериментальній гострій СН

До введення даларгіну					
Період спостереження	NO, мкг/г тканини	Сфінгозин, нг/мг тканини	СОД, % інгіб.	ЗОО, %	ЗАО, %
Контроль, n=10	74,61±3,9	2,09 ±1,2	17,51±0,8	55,32±0,9	55,17±0,7
1-ша доба СН, n=6	97,59±7,8*	2,86±3,6	81,71±1,8*	58,87±1,6	25,75±0,6*
3-тя доба СН, n=6	111,19±9,0*	6,91±8,5*	48,25±1,1*	68,57±1,2*	20,89±1,1*
5-та доба СН, n=6	98,61±3,5*	6,78±3,5*	47,86±1,0*	63,98±1,2*	37,10±1,4*
7-ма доба СН, n=6	85,24±3,8*	5,69±3,6*	28,79±1,0*	57,72±1,8	47,78±1,5*
Після введення даларгіну					
Контроль, n=10	74,61±3,9	2,09 ±1,2	17,51±0,8	55,32±0,9	55,17±0,7
1-ша доба СН, n=6	91,79±5,2	2,75±1,8	83,46±1,4**	56,11±1,3	54,54±0,9**
3-тя доба СН, n=6	97,61±7,8**	4,13±1,3**	36,38±1,2**	59,32±1,4**	32,51±1,8**
5-та доба СН, n=6	85,49±3,4**	3,66±3,7**	45,33±1,3	57,64±1,2**	44,77±1,3**
7-ма доба СН, n=6	76,32±5,6**	4,23±2,8**	44,36±1,6**	55,85±1,1	51,83±1,1**

Примітка. * – достовірні розходження з показниками контролю, $p < 0,05$; ** – достовірні розходження з показниками відповідної групи СН, $p < 0,05$.

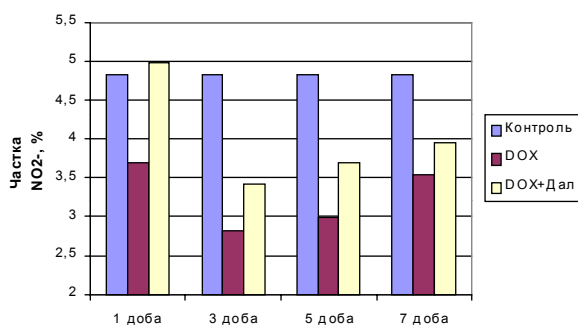


Рис. 1. Частка NO_2^- (%) від загальної кількості стабільних метаболітів оксиду азоту ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) у тканині міокарда щурів при експериментальній СН та активації ОР.

цього ферменту на 1-шу добу експерименту відображає передбачувану реакцію організму в цілому на підвищення окисних процесів. Подальше зниження показників свідчить про те, що найбільше пригнічення ендогенної антиоксидантної системи спостерігалось, починаючи з 3-ї доби експерименту, та мало прогресуючий характер (див. табл. 1). Підтвердженням цього є результати дослідження сироватки тварин, які показують зростання ЗОА на 3,5; 13,3; 8,7 і 2,4 % відповідно до доби формування СН та зниження ЗАА, починаючи з 1-ї доби дослідження, на 29,4; 34,3; 18,1 і 7,4 % згідно з контролем (див. табл. 1).

Характерною рисою ушкодження міокарда при окисному стресі є активація кислої сфінгомієлінази, що супроводжується частковим гідролізом мембранних фосфоліпідів. Так, найбільш імовірним джерелом накопичення сфінгозину є ферментативний гідроліз сфінгомієліну та кераміду.

Встановлено, що в ході експерименту вміст сфінгозину підвищувався в 1,4; 3,3; 3,2 і 2,7 раза відносно інтактних тварин з максимальним показником на 3-тю добу розвитку гострої СН. Спостережуване збільшення вмісту сфінгозину в клітинах у відповідь на активацію оксидантної системи відбувалося в результаті ферментативного розщеплення кераміду, а не за рахунок синтезу *de novo* [11], і це вказує на те, що джерелом активного кераміду є тільки сфінгомієлін, інші сфінголіпіди при гідролізі генерують кераміди, з яких не утворюється сфінгозин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андросова М.Є. Рівні стабільних метаболітів оксиду азоту при експериментальній серцевій недостатності на тлі активації опіатних рецепторів //

СОД забезпечує NO більш тривале існування шляхом відсторонення його від взаємодії з $\text{O}_2^{\bullet-}$, що дозволяє NO виконувати його множинні фізіологічні функції. Баланс між активністю СОД й iNOS відіграє важливу роль у прояві ушкоджень при використанні доксорубіцину.

Попередня активація опіатних рецепторів призводила до достовірного зниження вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту, що супроводжувалося збільшенням частки NO_2^- від загальної кількості ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$), яка була на 0,1; 1,41; 1,14; та 0,86 % меншою, ніж в інтактних тварин, відповідно до терміну спостереження.

Рівень сфінгозину в тканині міокарда на тлі попередньої активації опіатних рецепторів також мав тенденцію до зниження, починаючи з 3-ї доби, в 1,7 раза, на 5-ту добу – в 1,9 раза, на 7-му – в 1,5 раза, але до контрольних значень він не зменшувався.

Відповідно до антиоксидантних властивостей даларгіну в піддослідних щурів, підвищувалася активність СОД на 65,9; 18,9; 27,8 та 26,9 % порівняно з групою інтактних тварин. Загальний стан оксидантно-антиоксидантної системи також оцінювали за показниками ЗОА (зниження на 2,8; 9,3; 6,3 та 1,9 %) і ЗАА сироватки (підвищення на 28,8; 11,6; 7,7 та 4,05 %) щодо відповідної групи формування СН.

Однак виявлена закономірність ще не свідчить про те, що стан сфінгомієлінового циклу залежить від стану антиоксидантної системи в клітині. Оскільки наша модель гострої СН супроводжувалася розвитком оксидантного стресу, то можна припустити, що даларгін впливає на активність сфінгомієлінового циклу (рівень сфінгозину) шляхом зменшення вмісту активних форм кисню, а також зміни фізико-хімічних властивостей мембрани.

ВИСНОВОК. Отримані нами дані свідчать про те, що, крім безпосередньої антиоксидантної дії при окисному стресі, активація периферичних μ - та σ -опіатних рецепторів, можливо, відіграє певну роль у регуляції співвідношення рівнів реактивних форм кисню/реактивних форм азоту, а також в інгібуванні метаболітів сфінгомієлінового циклу окиснення.

Укр. журн. клін. та лаб. медицини. – 2007. – 2, № 1. – С. 35-38.

2. Гаврилюк С.О., Чекман І.С., Горчакова Н.О.

та ін. Роль оксидантного стрессу в патогенезі атеросклерозу та ішемічної хвороби серця // Укр. біохім. журн. – 2005. – **77**, № 6. – С. 16-23.

3. Залесский В.Н., Стаднюк Л.А., Великая Н.В. Апоптотический и аутофагический пути гибели клетки при гипертрофии и ремоделировании миокарда // Журн. АМН України. – 2003. – **9**, № 4. – С. 699-712.

4. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Наумова А.В., Богомаз С.А. Активация m-опиатных рецепторов как фактор повышения устойчивости сердца к ишемическим и реперфузионным повреждениям // Рос. физиол. журн. – 1998. – **84**. – С. 1223-1230.

5. Маслов Л.Н., Соколов А.А., Федорова Н.А. и др. Клиническая эффективность агониста μ - и σ -опиатных рецепторов у больных ишемической болезнью сердца: влияние DAla²-Leu⁵-Arg⁶-энкефалина на показатели гемодинамики, кислородный баланс и липидный спектр крови // Клин. медицина. – 2002. – № 8. – С. 53-57.

6. Орлова Е.А. Анализ нитритов и нитратов в ткани при экспериментальной острой почечной недостаточности // Укр. журн. экстрем. медицины. – 2001. – **3**, № 1. – С. 72-74.

7. Орлова Е.А. Влияние даларгина на содержание сфингозина, активность СОД и апоптоз, индуцированный ишемией-реперфузией в почках // Укр. мед. альманах. – 2003. – **6**, № 5. – С. 121-123.

8. Орлова Е.А., Комаревцев В.Н. Определение фрагментации ДНК в клетках почечной ткани // Акт. проблемы акушерства й гинекології, клінічної імунології й мед. генетики. – 2001. – Вип. 6. – С. 206-209.

9. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопр. мед. химии. – 1999. – № 3. – С. 43-53.

10. Alewijnse A., Peters S.L.M., Michel M.C. Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate and

other sphingomyelin metabolites // British Journal of Pharmac. – 2004. – **143**. – P. 666-684.

11. Andrieu-Abadie N., Jaffrezou J., Hatem S. et al. L-carnitine prevents doxorubicin-induced apoptosis of cardiac myocytes: role of inhibition of ceramide generation // The FASEB Journal. – 1999. – **13**. – P. 1501-1510.

12. Chaiswing L., Cole M.P., Ittarat W. et al. Manganese superoxide dismutase and inducible nitric oxide synthase modify early oxidative events in acute adriamycin-induced mitochondrial toxicity // Mol. Cancer Ther. – 2005. – **4**. – P. 1056-1064.

13. Childs A.C., Phaneuf S.L., Dirks A.J. et al. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio // Cancer Res. – 2002. – **62**. – P. 4592-4598.

14. Giordano F.J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure // J. Clin. Invest. – 2005. – **115**. – P. 500-508.

15. Fogli S., Nieri P., Breschi M.C. The role of nitric oxide in anthracycline toxicity and prospects for pharmacologic prevention of cardiac damage // The FASEB Journal. – 2004. – **18**. – P. 664-675.

16. Langer S.W., Sehested M., Jensen P.B. Treatment of anthracycline extravasation with dexrazoxane // Clin. Cancer Res. – 2000. – **6**. – P. 3680-3686.

17. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E. et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic development in antitumor activity and cardiotoxicity // Pharmacol. Rev. – 2004. – **56**. – P. 185-229.

18. Szewczyk A., Wojtczak L. Mitochondria as a pharmacological target // Pharmacol. Rev. – 2002. – **54**. – P. 101-127.

19. Suzuki E., Handa K., Toledo M.S. Sphingosine-dependent apoptosis: a unified concept based on multiple mechanisms operating in concert // PNAS. – 2004. – **12**. – P. 14788-14793.

ВЛИЯНИЕ АКТИВАЦИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ОПИАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НА СОДЕРЖАНИЕ СТАБИЛЬНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ОКСИДА АЗОТА, СВОБОДНОГО СФИНГОЗИНА, ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОЕ СОСТОЯНИЕ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ МИОКАРДА

И.А. Комаревцева, М.Е. Андросова

ЛУГАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

В эксперименте установлено увеличение уровня стабильных метаболитов оксида азота, свободного сфингозина и снижение активности супероксиддисмутазы (СОД) при доксорубицининдуцированной модели окислительного стресса. Активация периферических μ - и σ -опиатных рецепторов до фор-

мировання гострої серцевої недостаточності викликала зменшення вмісту метаболітів оксиду азота, вільного сфингозина, підвищала активність СОД в міокарді.

КЛЮЧЕВІ СЛОВА: серцева недостаточність, опіатні рецептори, оксид азота, вільний сфингозин, супероксиддисмутаза.

INFLUENCE OF PERIPHERAL OPIOID RECEPTORS ACTIVATION ON THE NITROGEN OXIDE STABLE METABOLITES CONTENTS, FREE SPHINGOSINE LEVEL, ACTIVITY OF OXIDANT-ANTIOXIDANT SYSTEM IN EXPERIMENTAL OXIDIZING STRESS OF MYOCARDIUM

I.O. Komarevtseva, M.Ye. Androsova
LUHANSK STATE MEDICAL UNIVERSITY

Summary

Substantial increase of the nitric oxide stable metabolites contents, in the level of free sphingosine and decreasing of superoxide dismutase (SOD) activity were revealed at doxorubicin-induced model of oxidant stress. It had been revealed that peripheral μ - and σ -opioid receptors activation before acute heart failure formation provides decrease of the nitric oxide metabolites and free sphingosine contents, increasing of superoxide dismutase activity in myocardium.

KEY WORDS: heart insufficiency, opioid receptors, nitrogen oxide, free sphingosine, superoxide dismutase.

Отримано 1.03.2006 р.

Адреса для листування: І.О. Комаревцева, Луганський державний медичний університет, Луганськ, Україна.

**Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua**

ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЗМІНИ СТАНУ ПУЛУ ПІРИДИНОВИХ КОФЕРМЕНТІВ У СЕРЦІ ЩУРІВ ПРИ ІММОБІЛІЗАЦІЙНОМУ СТРЕСІ

В.М. Швець

ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

З метою визначення причин вікових змін чутливості серця до стресу було вивчено стан пулу піридинових коферментів у міокарді дорослих та старих щурів при іммобілізаційному стресі. Встановлено, що з віком зменшується концентрація відновлених форм НАД та НАДФ порівняно з їх кількістю у дорослих щурів. При іммобілізаційному стресі у дорослих та старих тварин виникають зміни з боку пулу піридинових коферментів у міокарді. У дорослих щурів вони проявляються зниженням рівня відновленості пулу НАД, а у старих – зсувом протилежного напрямку.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: іммобілізаційний стрес, старіння, пул піридинових коферментів.

ВСТУП. Формування стресу супроводжується зниженням рівня енергетичного забезпечення серцевого м'яза [1]. Прояв цього зсуву характеризується віковими особливостями [2, 3], зумовленими змінами резистентності міокарда до дії пошкоджувальних факторів стресу при старінні [4, 5]. Беручи до уваги особливу роль піридинових коферментів в енергетичному забезпеченні клітин, з метою з'ясування природи цього феномена було вирішено вивчити стан їх пулу в міокарді дорослих та старих щурів при іммобілізаційному стресі.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували 40 щурів-самців лінії Вістар двох вікових груп: дорослих (10-12 міс.) і старих (22-25 міс.). Тварин обох груп, у свою чергу, розподілили на 3 підгрупи: 1-ша – інтактні, 2-га – щури, яких піддавали іммобілізаційному стресу шляхом фіксації на спині протягом 30 хв, 3-тя – тварини, яким за 15 хв до іммобілізації внутрішньоочеревинно вводили диметилсульфоксид у дозі 175 мг на 100 г маси.

Ефективність відновлення стресу контролювали за зміною рівня 11-оксикортикостероїдів та адреналіну в крові.

Тварин декапітували. Швидко забирали серце та переносили в рідкий азот. Для визначення складу окиснених форм піридинзалежних коферментів заморожений лівий шлуночок міокарда гомогенізували з 0,4 н хлорною кислотою. Зразки центрифугували та після нейтралізації використовували для кількісного визначення НАД та НАДФ [6] за допомогою ензимологічних методів.

© В.М. Швець, 2007.

Для екстракції відновлених форм коферментів тканину міокарда гомогенізували з 0,3 М розчином K_2CO_3 у 25 % етанолі [8]. У лужних екстрактах після їх попередньої нейтралізації визначали концентрацію відновленого НАД [6] та НАДФ [7] за допомогою ензимологічних методів.

Отримані результати піддавали статистичній обробці з використанням непараметричного методу Вілкоксона-Манна-Уїтні.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Проведені дослідження показали, що при старінні знижувався на 14 % сумарний склад піридинових коферментів у міокарді порівняно з їх кількістю у дорослих щурів (рис. 1). Зсув, що виникав, супроводжувався зменшенням концентрації відновлених форм НАД та НАДФ (табл. 1, 2). Разом із тим, склад окиснених піридинових коферментів у старих щурів значно не відрізнявся від такого в дорослих.

Зміни значення пулу піридинових коферментів супроводжувалися зниженням рівня відновленості пулу НАД у серці старих щурів. Чітка тенденція до формування аналогічного зсуву виникала також і відносно показника НАДФ/НАДФН.

Іммобілізація дорослих щурів супроводжувалася зниженням концентрації відновленої форми НАД у 3,3 раза порівняно з її початковим значенням. Паралельно з цим у них реєстрували збільшення в 3,5 раза співвідношення НАД/НАДН, а також зниження у 2,8 раза співвідношення відновлених НАД та НАДФ (НАДН/НАДФН) у серці порівняно з їх початковим рівнем.

У старих тварин після 30-хвилинної іммобілізації підвищилася концентрація відновленого НАД, а також значення співвідношення НАДН/НАДФН – на 76 і 71 % відповідно порівняно з їх початковим рівнем. Зсуви, що виникали, супроводжувались зниженням співвідношення НАД/НАДН на 42 % порівняно з його значенням у старих інтактних щурів.

Результати проведених досліджень вказують на те, що в процесі старіння в серцевому м'язі відбувається зниження сумарної концентрації піридинових коферментів. Виникнення такого зсуву пов'язане зі зменшенням вмісту відновлених НАД і НАДФ. Паралельно з цим у серці старих щурів знижувався рівень відновлюваності пулу НАД, а також зменшувалась частка відновлюваного НАД серед відновлених піридинових коферментів.

Важливу роль у прояві вікових змін у пулі піридинових коферментів серця може відіграти обмеження швидкості біосинтезу НАДФ у кардіоміоцитах при старінні. На особливу увагу заслуговує факт вікового зниження концентрації відновлених форм піридинових коферментів у міокарді. Основного значення у виникненні цього зсуву, очевидно, набуває зменшення концентрації відновленого НАД за рахунок зниження при старінні інтенсивності окиснювальних процесів у мітохондріях, які каталізуються піридинзалежними дегідрогеназами [8].

За умов виникнення енергетичного дефіциту, що формується при іммобілізаційному стресі [1], в міокарді дорослих і старих тварин відбуваються характерні зміни з боку пулу піридинових коферментів. У дорослих щурів, яких піддавали 30-хвилинній іммобілізації, різко зменшувалась вміст відновленого НАД, внаслідок чого знижувалась відновлюваність пулу НАД у міокарді. При цьому концентрація окиснених і відновлених форм НАДФ у тварин цієї групи залишалася на початковому рівні.

Аналіз отриманих даних дозволив виявити подібний характер зсувів у стані пулу піридинових коферментів у серці щурів при старінні й іммобілізаційному стресі, що збігається з концепцією В.В. Фролькіса про "стрес-вік-синдром" [9]. Беручи до уваги значення стимуляції вільнорадикальних процесів при старінні [10] й у патогенезі стресу [1], можна припустити, що саме вони і є причиною виникнення подібних зсувів у концентрації піридинових коферментів у серці. Однак експерименти з попереднім введенням перед іммобілізацією антиоксиданта (диметилсульфоксиду) не підтвердили цього припущення (див. табл. 1, 2). У зв'язку з цим вірогідною причиною зниження рівня відновленості пулу НАД при стресі може

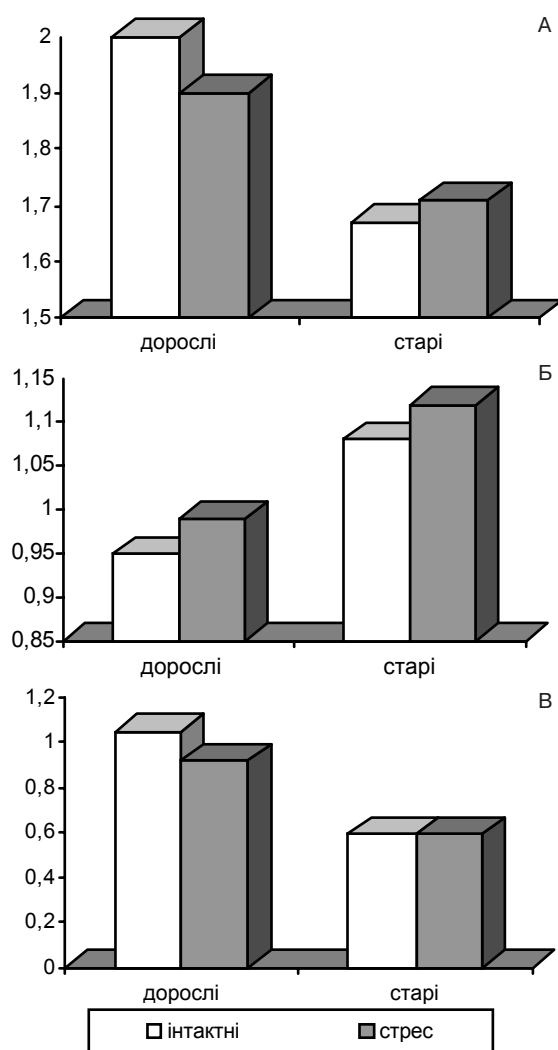


Рис.1. Величина загального пулу піридинових коферментів (НАД+НАДН+НАДФ+НАДФН) (А), сумарного складу окисненого та відновленого НАД (Б) і НАДФ (В). Склад піридинових коферментів подано у нмоль/г тканини (сира маса). За результатами дослідів на 5-6 щурах.

Примітка. ** – $P < 0,05$ щодо інтактних дорослих тварин.

бути збільшення швидкості утилізації відновленого НАД у міокарді для підтримання стабільної концентрації відновленого НАДФ. За умов стресорної стимуляції вільнорадикальних процесів [11-13] останнє набуває характеру адаптивного зсуву, спрямованого на підтримання ефективності функціонування системи ферментативних антиоксидантів.

У старих щурів, на відміну від дорослих тварин, після 30-хвилинної іммобілізації підвищувалась концентрація відновленого НАД у серцевому м'язі. Наслідком цього було підвищення рівня відновленості пулу НАД і збільшення частки відновленого НАД у спільному пулі відновлених піридинових коферментів. У результаті виникнення всіх цих зсувів може знизитись інтенсивність киснезалежних процесів у мітохондріях серця щурів даної групи. Цьому,

Таблиця 1 – Стан пулу НАД у міокарді дорослих і старих щурів при іммобілізаційному стресі ($M \pm m$; n)

Показник	Дорослі			Старі		
	інтактні	стрес	ДМСО+стрес	інтактні	стрес	ДМСО+стрес
НАД окиснен. (нмоль/г ткан.)	889 $\pm$ 50 6	966 $\pm$ 73 6	955 $\pm$ 81 6	1054 $\pm$ 104 5	1080 $\pm$ 34 5	1106 $\pm$ 58 5
НАД відновл. (нмоль/г ткан.)	62 $\pm$ 4 5	19 $\pm$ 3* 5	16 $\pm$ 2* 4	21 $\pm$ 4** 6	37 $\pm$ 4* 6	29 $\pm$ 3 4

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно інтактних щурів даної вікової групи; ** – $p < 0,05$ відносно інтактних дорослих тварин.

Таблиця 2 – Стан пулу НАДФ у міокарді дорослих та старих щурів при іммобілізаційному стресі ($M \pm m$; n)

Показник	Дорослі			Старі		
	інтактні	стрес	ДМСО+стрес	інтактні	стрес	ДМСО+стрес
НАДФ окиснен. (нмоль/г ткан.)	144 $\pm$ 11 5	153 $\pm$ 6 5	89 $\pm$ 5* 5	119 $\pm$ 8 5	114 $\pm$ 8 5	
НАДФ відновл. (нмоль/г ткан.)	910 $\pm$ 60 5	770 $\pm$ 70 5	570 $\pm$ 70* 4	470 $\pm$ 70** 4	480 $\pm$ 60 6	600 $\pm$ 110 4
НАДФ/НАДФН	0,15 $\pm$ 0,01 5	0,19 $\pm$ 0,02 5	0,18 $\pm$ 0,04 3	0,22 $\pm$ 0,04 4	0,27 $\pm$ 0,03 5	0,35 $\pm$ 0,15 3
НАД/НАДФ	6,5 $\pm$ 0,5 5	6,0 $\pm$ 0,5 5	9,9 $\pm$ 0,5* 3	8,2 $\pm$ 1,4 4	8,6 $\pm$ 1,0 5	6,5 $\pm$ 1,2 3

Примітка. * – $p < 0,05$ відносно інтактних щурів даної вікової групи; ** – $p < 0,05$ відносно інтактних дорослих тварин.

частково, передуює зниження ефективності функціонування компонентів дихального ланцюга мітохондрій при старінні [14-16] та стресі [1]. Обмеження швидкості перенесення електронів по дихальному ланцюгу сприяло накопиченню в кардіоміоцитах недоокиснених продуктів метаболізму, в тому числі відновленого НАД як його основного субстрату.

Важливу роль у порушенні процесів тканинного дихання при стресі й старінні може відігравати стимуляція вільнорадикальних процесів [17-19]. Підтвердженням цього є результати наших експериментів з попереднім введенням антиоксиданта. Як свідчать дані, наведені в таблиці 1, введення диметилсульфоксиду попереджувало виникнення змін з боку пулу НАД у серці старих щурів при іммобілізаційному стресі.

Зростання концентрації відновленого НАД у серці старих щурів при стресі може бути одним з факторів стабілізації в них рівня

відновленого НАДФ у міокарді. У зв'язку з цим даний зсув за умов стресорної стимуляції вільнорадикальних процесів набуває адаптивного характеру, спрямованого на підвищення ефективності функціонування системи ферментативних антиоксидантів у міокарді.

ВИСНОВКИ. Формування іммобілізаційного стресу супроводжується появою характерних вікових змін з боку пулу піридинових коферментів у міокарді. У старих щурів вони проявляються підвищенням рівня відновленості пулу НАД, а у дорослих – зсувом протилежного напрямку. Оцінюючи причини виникнення цих відмінностей, необхідно відзначити їх взаємозв'язок з неоднаковою чутливістю міокарда дорослих і старих тварин до стресу [4, 5] за рахунок існування вікових відмінностей, які стосуються адренореактивності серцевого м'яза. Однак для остаточного з'ясування цього питання потрібно провести окремі дослідження.

ЛІТЕРАТУРА

1. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. – М.: Наука, 1984. – 270 с.
2. Мильман Л.С., Юровицкий Ю.Г., Ермолаева Л.П. Определение содержания некоторых субстратов и промежуточных продуктов обмена в тканях // В кн.: Методы биологии развития. – М.: Наука, 1974. – С. 428-430.
3. Путилина Ф.Е. Определение содержания пиридиновых нуклеотидов в тканях // В кн.: Методы

биохимических исследований. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1982. – С. 161-166.

4. Фролькис В.В. Стресс-возраст-синдром // Физиол. журн. – 1991. – **37**, № 3. – С. 3-11.

5. Швеи В.Н., Давыдов В.В. Содержание адениловых нуклеотидов и компонентов креатинфосфокиназной системы в сердце взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе // Проблемы старения и долголетия. – 2000. – № 2. – С. 113-117.

6. Davydov V.V., Shvets V.N. Adenine Nucleotide

and Creatine Phosphate Pool in Adult and Old Rat Heart during Immobilization Stress // Gerontology. – 2002. – **48**. – P. 81-83.

7. Davydov V.V., Shvets V.N. Lipid peroxidation in the heart of adult and old rats during immobilization stress // Exp. Gerontol. – 2001. – **36**. – P. 1155-1160.

8. Docherty I.R. Cardiovascular responses in aging // Pharmacol. Rev. – 1990. – **42**. – P. 103-126.

9. Harman D. Free radical theory of aging: Increasing the functional life span // Ann. NY Acad. Sci. – 1994. – **717**. – P. 1-15.

10. Humphries K.M., Yoo Y., Szveda L.I. Inhibition of NADH-linked mitochondrial respiration by 4-hydroxy-2-nonenal // Biochemistry. – 1998. – **37**, № 2. – P. 552-557.

11. Kovacs P., Juranek I., Stankovicova T. et al. Lipid peroxidation during acute stress // Pharmazie. – 1996. – **51**, № 1. – P. 51-53.

12. Kwong L.K., Sohal R.S. Age-related changes in activities of mitochondrial electron transport complexes in various tissues of the mouse // Arch. Biochem. Biophys. – 2000. – **373**, № 1. – P. 16-22.

13. Lakatta E.G. Changes in cardiovascular function with aging // Eur. Heart J. – 1990. – **11**, Suppl C. – P. 22-29.

14. Lenaz G., Bovina C., D'Aurelio M. et al. Role of mitochondria in oxidative stress and aging // Ann. NY Acad. Sci. – 2002. – **959**. – P. 199-213.

15. Liu J., Wang X., Shigenaga M.K. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats // FASEB J. – 1996. – **10**, № 13. – P. 1532-1538.

16. Nulton-Persson A.C., Szveda L.I. Modulation of Mitochondrial Function by Hydrogen Peroxide // Biol. Chem. – 2001. – **276**, № 26. – P. 23357-23361.

17. Rafique R., Schapira A.H.V., Cooper J.M. Mitochondrial respiratory chain dysfunction in aging: influence of vitamin E deficiency // Free Radical Res. – 2004. – **38**, № 2. – P. 157-165.

18. Ullrich O., Henke W., Grune T. et al. The effect of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and of its metabolite 4-hydroxynonenic acid on respiration of rat kidney cortex mitochondria // Free Radic. Res. – 1996. – **24**, № 6. – P. 421-427.

19. Vitorica J., Cano J., Satrustegui J., Machado A. Comparison between developmental and senescent changes in enzyme activities linked to energy metabolism in rat heart // Mech. Aging Dev. – 1981. – **16**, № 2. – P. 105-116.

ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТОЯНИЯ ПУЛА ПИРИДИНОВЫХ КОФЕРМЕНТОВ В СЕРДЦЕ КРЫС ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

В.Н. Швец

ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

С целью определения причин возрастных изменений чувствительности сердца к стрессу было изучено состояние пула пиридиновых коферментов в миокарде взрослых и старых крыс при иммобилизационном стрессе. Установлено, что с возрастом уменьшается концентрация восстановленных форм НАД и НАДФ по сравнению с их количеством у взрослых крыс. При иммобилизационном стрессе у взрослых и старых животных возникают изменения со стороны пула пиридиновых коферментов в миокарде. У взрослых крыс они проявляются снижением уровня восстановленности пула НАД, а у старых – сдвигом противоположного направления.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: иммобилизационный стресс, старение, пул пиридиновых коферментов.

AGE-SPECIFIC PECULIARITIES OF CHANGE OF PYRIDINE COENZYMES POOL STATE IN RAT HEART AT IMMOBILIZATION STRESS

V.M. Shvets

ZAPORIZHYAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Summary

The state of pyridine coenzymes pool in myocardium of adult and old rats in the condition of immobilization stress was studied in this work with the aim of determination of the causes of age-specific changes of heart stress sensitivity. It was revealed that in aging the concentration of restored NAD and NADP forms decreases as compared with their values in adult rats. During immobilization stress in adult and old rats changes of the pyridine coenzymes pool in myocardium take place. In adult rats they declare themselves by decrease of the level of NAD pool restoration, and in old rats – by the shift of opposite direction.

KEY WORD: immobilization stress, aging, pyridine coenzymes pool.

Отримано 26.12.2006 р.

Адреса для листування: В.М.Швец, ЗДМУ, кафедра біохімії, вул. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69000, Україна.

АКТИВНІСТЬ ТРАНСАМІНАЗ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ПІДДОСЛІДНИХ ГРУП ТВАРИН З АДРЕНАЛІНОВОЮ МІОКАРДІОПАТІЄЮ ПРИ РІЗНИХ ТИПАХ ЗАПАЛЬНОЇ РЕАКЦІЇ

А.Б. Бойків, І.Р. Мисула

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Порівняно з нормергічним гіпоергічним перебіг запальної реакції, за даними динаміки активності трансаміназ, можна характеризувати як розтягнутий у часі процес деструкції клітин міокарда. Гіперергічний перебіг запальної реакції, порівняно з нормергічним, має такий вигляд: активні деструктивні процеси в міокарді характеризуються різким і досить короткочасним підвищенням активності трансаміназ.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: адреналінова міокардіопатія, нормергічний, гіпоергічний, гіперергічний перебіг запальної реакції, активність трансаміназ крові.

ВСТУП. Одним з варіантів оцінки деструктивних процесів у серці, викликаних адреналіном, є визначення активності маркерних ферментів цитолізу – аспартатамінотрансфераз (АсАТ) і аланінамінотрансфераз (АлАТ) [1, 6, 7].

З плазматичною мембраною зв'язана безпосередньо активність АлАТ, а АсАТ локалізується в цитоплазмі й мітохондріях [2]. Порушення структури плазматичних мембран, їх проникності призводить до виходу ферментів. Значне підвищення активності АсАТ можливе в тому випадку, коли відбувається розпад внутрішньоклітинних органел. Вивчення перебігу запальної реакції в міокарді, динаміки некротичних процесів за допомогою визначення активності трансаміназ при змінній реактивності – мета нашого дослідження.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведено на 42 білих нелінійних щурах-самцях масою 180-200г, яких розділили на три групи: 1-ша – 18 білих щурів з адреналіновою міокардіопатією (АМП); 2-га – 18 білих щурів зі змодельованою гіпоергічною запальною реакцією; 3-тя – 18 білих щурів зі змодельованою гіперергічною запальною реакцією. Контрольна група – 6 білих щурів. АМП викликали шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення адреналіну гідрохлориду з розрахунку

0,5 мг/кг [4]. Гіпоергічний тип запальної реакції моделювали шляхом внутрішньом'язового введення алкілюючого цитостатика циклофосфану за 3 дні до моделювання АМП і протягом тижня щоденно з розрахунку 10 мг/кг. Гіперергічний тип запальної реакції – шляхом внутрішньом'язового введення імуностимулятора полісахаридної природи пірогеналу за 1 день до моделювання АМП і протягом 7 днів щоденно з розрахунку на одну тварину 5-10 МПД на фізіологічному розчині [5].

Забій з дотриманням правил евтаназії і забір крові проводили через 1 год після моделювання АМП, через 1 і 7 діб після введення адреналіну. Активність трансаміназ досліджували за методикою Райтмана і Френкеля [3], яка базується на здатності 2,4-динітрофенілгідразину в лужному середовищі утворювати гідразон піровиноградної кислоти, за інтенсивністю забарвлення якого роблять висновок про активність амінотрансфераз. Кількісні показники обробляли методом варіаційної статистики.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Залежно від типу запальної реакції в організмі піддослідних тварин під час розвитку АМП змінюється активність трансаміназ у сироватці крові. Саме результати досліджень активності цитозольних ферментів вказують на порушення структури і функції клітинних мембран (табл. 1).

© А.Б. Бойків, І.Р. Мисула, 2007.

Після введення адреналіну активність ферменту АлАТ підвищувалась при всіх типах запальної реакції. Активність АлАТ сироватки крові в 1-шу годину зросла у всіх досліджуваних групах тварин і становила 151,3 % ($p<0,001$) при гіпоергічному, 145,8 % ($p<0,002$) при гіперергічному і 171,1 % ($p<0,01$) при нормергічному перебізі запальної реакції в міокарді.

Активність АлАТ сироватки крові через 1 добу практично не змінилась порівняно з попереднім терміном при гіпо- і гіперергічному типах та зросла до 186,8 % ($p<0,001$) при нормергічному типі.

Через 7 дів активність АлАТ сироватки крові при гіпоергічному типі підвищилась до 193,0 % ($p<0,001$) і знизилась при нормергічному типі запальної реакції до 104,8 % ($p<0,01$) і при гіперергічному до 108,4 % ($p<0,05$) (рис. 1).

Активність АсАТ сироватки крові в 1-шу годину зросла у всіх досліджуваних групах і становила 201,7 % ($p<0,01$) при гіпоергічному, 283,2 % ($p<0,002$) при гіперергічному і 217,9 % ($p<0,01$) при нормергічному перебізі запальної реакції в міокарді.

Активність АсАТ сироватки крові через 1 добу зменшилась до 105,1 % ($p>0,05$) при гіпоергічному й до 193,3 % ($p<0,05$) при гіперергічному і зросла до 236,6 % ($p<0,02$) при нормергічному.

Через 7 дів активність АсАТ сироватки крові при гіпоергічному типі підвищилась до 138,3 % ($p>0,05$) і знизилась при гіперергічному до 110,9 % ($p>0,05$) і при нормергічному до 155,6 % ($p>0,05$) (рис. 2).

Таким чином, введення тваринам кардіотоксичної дози адреналіну призводить до суттєвого зростання активності маркерних фер-

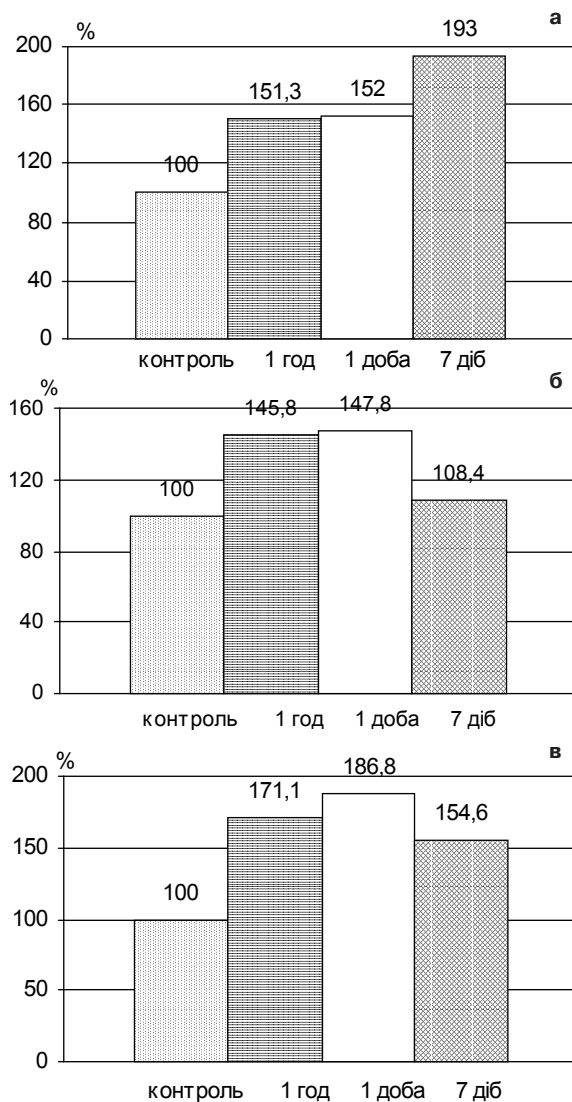


Рис. 1. Зміни активності АлАТ у сироватці крові піддослідних груп тварин у різні терміни дії кардіотоксичної дози адреналіну: а – гіпоергічний тип; б – гіперергічний тип; в – нормергічний тип запальної реакції.

Таблиця 1 – Активність АлАТ і АсАТ (од./л) у сироватці крові досліджуваних груп з різним типом запальної реакції у різні терміни після введення кардіотоксичної дози адреналіну ($M\pm m$)

Показ-ники	Інтактні тварини	Час дослідження після введення адреналіну								
		1 год			1 доба			7 дів		
№ серії	1	гіпоерг.	гіперерг.	нормерг.	гіпоерг.	гіперерг.	нормерг.	гіпоерг.	гіперерг.	нормерг.
Кількість тварин	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6
АлАТ	86,6± 4,17 1	131,05± 7,93 2	126,3± 8,5 3	148,18± 1,44 4	131,67± 17,26 5	93,9± 7,7 6	161,8± 21,2 7	167,18± 13,07 8	128,03± 10,34 9	133,9± 10,39 10
АсАТ	142,6± 40,47 11	287,67± 18,04 12	403,9± 41,4 13	310,7± 21,4 14	147,9± 69,9 15	275,6± 40,6 16	337,4± 51,9 17	197,2± 3,58 18	158,13± 2,95 19	221,9± 3,25 20
p	p ₁₋₂ <0,002; p ₁₋₃ <0,01; p ₁₋₄ <0,001; p ₂₋₃ >0,05; p ₂₋₄ >0,05; p ₃₋₄ >0,05; p ₁₋₅ <0,05; p ₁₋₆ >0,05; p ₁₋₇ <0,01; p ₅₋₆ >0,05; p ₅₋₇ >0,05; p ₆₋₇ <0,02; p ₁₋₈ <0,001; p ₁₋₉ <0,05; p ₁₋₁₀ <0,01; p ₈₋₉ >0,05; p ₈₋₁₀ >0,05; p ₉₋₁₀ >0,05; p ₁₁₋₁₂ <0,01; p ₁₁₋₁₃ <0,002; p ₁₁₋₁₄ <0,01; p ₁₂₋₁₃ <0,05; p ₁₂₋₁₄ >0,05; p ₁₃₋₁₄ >0,05; p ₁₁₋₁₅ >0,05; p ₁₁₋₁₆ <0,05; p ₁₁₋₁₇ <0,02; p ₁₅₋₁₆ >0,05; p ₁₅₋₁₇ <0,05; p ₁₆₋₁₇ >0,05; p ₁₁₋₁₈ >0,05; p ₁₁₋₁₉ >0,05; p ₁₁₋₂₀ >0,05; p ₁₈₋₁₉ <0,001; p ₁₈₋₂₀ <0,001; p ₁₉₋₂₀ <0,001									

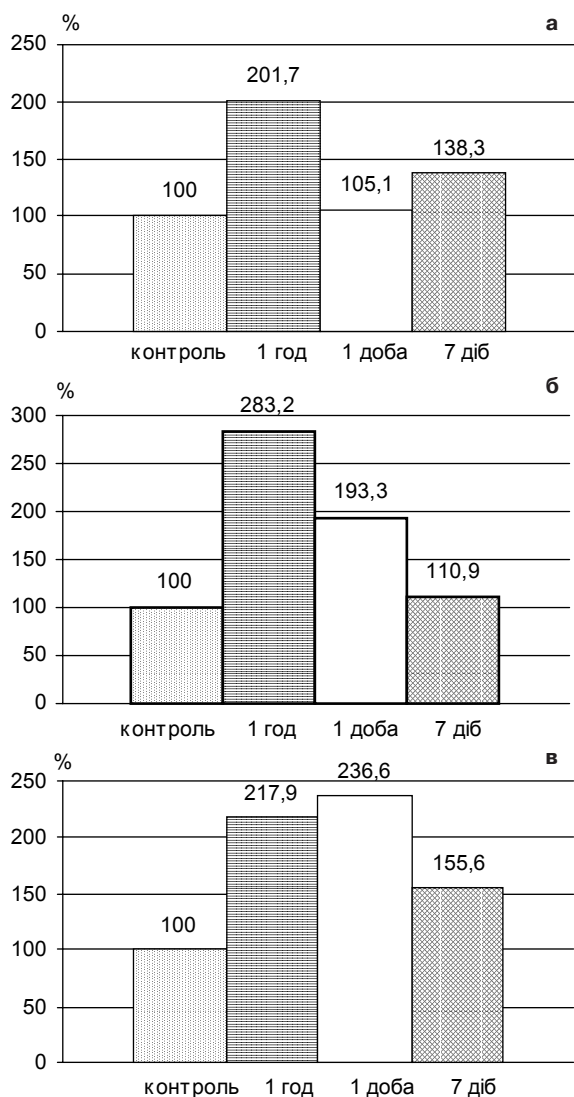


Рис. 2. Зміни активності АсАТ у сироватці крові піддослідних груп тварин у різні терміни дії кардіотоксичної дози адреналіну: а – гіпоергічний тип; б – гіперергічний тип; в – нормергічний тип запальної реакції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Закиров Н.У., Айзиков М.И., Курмуков А.Г. Кардиопротекторное действие глицирама при изодриновом повреждении миокарда // Эксперим. и клин. фармакология. – 2000. – **63**, № 5. – С. 24-26.
2. Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В. Биохимические исследования в клинике. – Элиста: АПП "Джангар", 1999. – 250 с.
3. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 365 с.
4. Маркова Е.А., Мисула И.Р. Показатели состояния перекисного окисления липидов в сердечной мышце взрослых и старых животных при развитии адреналиновой миокардиодистрофии //

ментів цитолізу – трансаміназ сироватки крові, причому більше в перші доби експерименту: АсАТ – на 1-шу добу при гіперергічному перебізі запальної реакції в міокарді, АлАТ – на 1-шу добу при нормергічному перебізі й на 7-му добу при гіпоергічному.

ВИСНОВКИ. 1. При гіпоергічному перебізі запальної реакції за умов АМП з часом підвищується активність АлАТ – до 193 % на 7-му добу; динаміка зміни активності АсАТ: зростання активності до 201,1 % у 1-шу годину експерименту, зниження на 1-шу добу (105,1 %) і збільшення на 7-му (138,3 %) характеризують подовженість некротичних процесів порівняно з нормергічним перебігом запальної реакції в міокарді.

2. При гіперергічному перебізі запальної реакції за умов АМП з часом підвищується активність АлАТ у 1-шу годину і на 1-шу добу після пошкодження (145,8 і 147,8 % відповідно) і різко знижується до 108,4 % на 7-му добу; динаміка зміни активності АсАТ: різке збільшення до 283,2 % у 1-шу годину і поступове зменшення через одну добу (193,3 %) і на 7-му добу до 110,9 % від контролю.

3. Порівняно з нормергічним гіпоергічний перебіг запальної реакції, за даними динаміки активності трансаміназ, можна характеризувати як розтягнутий у часі процес деструкції клітин міокарда.

4. Гіперергічний перебіг запальної реакції, порівняно з нормергічним, має такий вигляд: активні деструктивні процеси в міокарді характеризуються різким і досить короткочасним підвищенням активності трансаміназ.

Проблемы старения и долголетия. – 1992. – № 1. – С. 14-16.

5. Мисула И.Р., Вайда О.В. Загоєння кукси бронха після пульмонектомії у тварин з різною реактивністю // Здобутки клін. і експериментальної медицини. – 2003. – №1. – С. 147.

6. Сахарова Т.С., Яковлева Л.В., Горбань Є.М., Герасимова О.О. Експериментальне дослідження кардіотропності препаратів біофлавоноїдного ряду // Мед. хімія. – 2001. – **3**, № 2. – С. 13-15.

7. Хныченко Л.К., Бульон В.В., Сапронов Н.С. Изучение влияния нового производного таурина на некоторые показатели метаболизма при экспериментальном инфаркте миокарда // Эксперим. и клин. фармакол. – 2001. – **64**, № 2. – С. 38-40.

АКТИВНОСТЬ ТРАНСАМИНАЗ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ПОДОПЫТНЫХ ГРУПП ЖИВОТНЫХ С АДРЕНАЛИНОВОЙ МИОКАРДИОПАТИЕЙ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТИПАХ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ

А.Б. Бойків, И.Р. Мисула

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

По сравнению с нормэргическим гипозэргическое течение воспалительной реакции, по данным динамики активности трансаминаз, можно характеризовать как растянутый во времени процесс деструкции клеток миокарда. Гиперэргическое течение воспалительной реакции, по сравнению с нормэргическим, выглядит следующим образом: активные деструктивные процессы в миокарде характеризуются резким и достаточно кратковременным увеличением активности трансаминаз.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **адреналиновая миокардиопатия, нормэргическое, гипозэргическое, гиперэргическое течение воспалительной реакции, активность трансаминаз крови.**

ACTIVITY OF TRANSAMINASES IN BLOOD SERUM OF EXPERIMENTAL ANIMAL GROUPS WITH ADRENALIN MYOCARDIOPATHY AT DIFFERENT TYPES OF INFLAMMATORY REACTION

A.B. Boykiv, I.R. Mysula

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

When compared to normergic hypoergic course of inflammatory reaction, by the data of dynamics of activity of transaminases, can be characterized as the prolonged process of destruction of myocardium cells. Hyperergic course of inflammatory reaction when compared to normergic one looks like the following: active destructive processes in myocardium are characterized by the sharp and short enough increase of activity of transaminases.

KEY WORDS: **adrenalin myocardiopathy; normergic, hypoergic, hyperergic course of inflammatory reaction; activity of blood transaminases.**

Отримано 20.02.2007 р.

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

**Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua**

**ВИВЧЕННЯ ЛІПОФІЛЬНИХ ФРАКЦІЙ КАПУСТИ БРОККОЛІ СОРТІВ
ТОНУС, КАЛАБРАЙЗЕ, ВІТАМІННА****І.М. Владимірова, В.С. Кисличенко***НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ*

Методом вичерпної екстракції хлороформом в апараті Сокслета було одержано ліпофільні фракції з надземних частин брокколі сортів Тонус, Калабрайзе, Вітамінна. За допомогою хроматографічних методів аналізу встановлено наявність хлорофілів та каротиноїдів. Отримано спектри поглинання та спектри флуоресценції ліпофільного комплексу з надземних частин брокколі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: капуста брокколі, ліпофільні речовини, спектр поглинання, спектр флуоресценції.

ВСТУП. Брокколі (*Brassica oleracea* L. var. *italica* Plenck = *Brassica cauliflora* sars. simplex Lizg.), або спаржева капуста, – перехідна форма до цвітної капусти, але менш вибаглива [2]. Свою сучасну назву рослина одержала від італійського слова "cavolo Brocolis", що означає "стеблова капуста". Сировина брокколі представлена різними групами біологічно активних сполук, серед яких у значній кількості містяться вуглеводи, в тому числі сахароза, крохмаль, клітковина; білки, до складу яких входять такі антисклеротичні речовини, як холін і метіонін, а також незамінні амінокислоти (лізин, ізолейцин, триптофан); вітаміни С, РР, К та β-каротин; мікро- та макроелементи; мінеральні речовини [1, 3]. Листя та інші органи капусти неоднакового кольору внаслідок наявності різних пігментів. Вміст жиророзчинних пігментів, у тому числі хлорофілу, в листі різних ярусів у середньому коливається від 40 до 280 мг/100 г сирової речовини. У листі капусти брокколі виявлено чотири основних каротиноїди – β-каротин, лютеїн, віолаксантин, неоксантин. Антоціанів у капусті міститься до 0,1 %, за винятком краснокачанної – 204-500 мг% [6].

Жири, або ліпіди, відіграють роль енергетичного резерву, тому що входять до складу тканин організму людини. Їх енергетична цінність вища, ніж у білків та вуглеводів. Ліпіди є носіями жиророзчинних вітамінів (А, D, Е, К), беруть участь в обміні речовин, захищають організм від перегріву та втрат тепла, покращують смакові якості їжі та сприяють засвоєнню білків і вітамінів [3, 4, 6].

© І.М. Владимірова, В.С. Кисличенко, 2007.

У брокколі вміст ліпідів досягає 0,2 %. Від дефіциту жирів у раціоні людини сповільнюється розвиток організму, послаблюються його захисні функції, порушуються обмінні процеси в тканинах, знижується еластичність судин, значно підвищується проникність судин [2].

У зв'язку з цим, останнім часом велику увагу приділяють вивченню ліпофільних комплексів і розробці на їх основі лікарських препаратів з різноманітною фармакологічною дією.

Тому метою нашої роботи було виділення ліпофільних комплексів з надземних частин брокколі сортів Тонус, Калабрайзе, Вітамінна та їх вивчення.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для досліджень використовували надземні частини капусти брокколі сортів Тонус, Калабрайзе, Вітамінна, зібраних нами в період серпня-вересня 2005 року за сприяння Науково-дослідного аграрного інституту овочівництва та баштанництва.

Ліпофільний комплекс одержували з висушеної та подрібненої сировини шляхом вичерпної екстракції хлороформом в апараті Сокслета за загальновідомою методикою [5]. Хлороформний екстракт відганяли на ротаційному випаровувачі до видалення екстрагенту та визначали відсотковий вміст отриманого сумарного комплексу. Вихід ліпофільної фракції в надземних частинах брокколі сортів Тонус, Калабрайзе, Вітамінна становив 3,45, 3,89 та 5,92 % відповідно. Якісне визначення хлорофілів та каротиноїдів проводили методом тонкошарової хроматографії на пластинках "Silufol" в системах розчинників "гексан-ацетон" (8:4) –

перший напрямок та "гексан-ацетон" (8:2) – другий напрямок [8]. Схеми хроматограм наведено на рисунках 1а, 1б, 1в.

Для поглибленого дослідження складу ліпофільних фракцій було застосовано тривимірну флуоресцентну спектроскопію, яку останнім часом використовують для аналізу сумішей, що містять флуоресцюючі компоненти. 3DF-спектри, що мають вигляд поверхні, яка характеризується функцією $I=f(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}})$, реєстрували в ультрафіолетовому та видимому діапазонах за допомогою спектрофлуориметра Hitachi F4010. Вимірювання спектра проводили у діапазонах збудження і випромінювання від 220 до 750 нм, кроком 5 нм. Подальшу обробку записів з побудовою тривимірних графіків виконували за допомогою програмного пакета Spectra Data Lab, розробленого в НДІ хімії ХНУ ім. М. Каразіна [5].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Локалізацію хлорофілів на хроматограмі визначали за характерним темно-зеленим забарвленням при денному світлі та за яскраво-червоною флуоресценцією при УФ-світлі. Тому речовини 1, 3, 4, 8 (сорт Тонус), 2, 4, 8 (сорт Калабрайзе) та 2, 3, 7, 8 (сорт Вітамінна) були віднесені нами до хлорофілів, а речовини 2, 5, 6 (сорт Тонус), 3, 5, 6 (сорт Калабрайзе) та 4, 5 (сорт Вітамінна) при УФ-світлі мали брудну флуоресценцію, після обробки хроматограми 2 % розчином п-диметиламінобензальдегіду в суміші етанолу та хлористоводневої кислоти і нагрівання за температури 80-90 °С речовини забарвились у рожево-фіолетовий колір і були віднесені до каротиноїдів.

Відомо декілька видів хлорофілу – *a*, *b*, *c*, *d*. У листі вищих рослин містяться хлорофіли *a* ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$), *b* ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$), якого практично в 3 рази менше, ніж хлорофілу *a*.

На хроматограмі в надземній частині брокколі трьох сортів нами було отримано більше ніж 2 плями хлорофілів, тому можна зробити

висновок, що деякі плями належать до продуктів розпаду хлорофілів – порфіринів, які при проявленні фосфорно-вольфрамовою кислотою давали слабке рожеве забарвлення, яке поступово переходило в бузкове, а з часом зовсім зникало [8].

Аналіз тривимірних спектрів флуоресценції ліпофільних комплексів з надземних частин капусти брокколі сортів Тонус (рис. 2), Калабрайзе (рис. 4), Вітамінна (рис. 6), а також проекції цих спектрів на площину $\{\lambda_{\text{exc}}; \lambda_{\text{em}}\}$ в логарифмічному представленні (рис. 3, 5, 7) дозволив зробити додаткові висновки про якісний вміст об'єктів, що досліджувались.

Так, ліпофільному комплексу з надземної частини брокколі сорту Тонус притаманні піки в ділянках збудження λ_{exc} – 310-380 нм та випромінювання λ_{em} – 420-510 нм, що свідчили про наявність агліконів флавоноїдів; серія піків у ділянках збудження флуоресценції λ_{exc} від 270 до 680 нм та випромінювання λ_{em} від 660 до 760 нм характерна для суміші хлорофілів *a* і *b* (див. рис. 2).

Ліпофільному комплексу з надземної частини брокколі сорту Калабрайзе властиві піки в ділянках збудження λ_{exc} – 310-380 нм та випромінювання λ_{em} – 420-510 нм, що свідчили про наявність агліконів флавоноїдів; серія піків у ділянках збудження флуоресценції λ_{exc} від 270 до 680 нм та випромінювання λ_{em} від 660 до 760 нм характерна для суміші хлорофілів *a* і *b* (див. рис. 4).

Ліпофільному комплексу з надземної частини брокколі сорту Вітамінна притаманні піки в ділянках збудження λ_{exc} від 270 до 680 нм та випромінювання λ_{em} від 660 до 760 нм (див. рис. 6).

Суму каротиноїдів визначали, порівнюючи з достовірним зразком β -каротину, суму хлорофілів (*a* і *b*) – з достовірним зразком хлорофілу *a*. Молярні коефіцієнти погашення β -каротину було визначено шляхом спектрофотометрії розчинів стандартних речовин. Так,

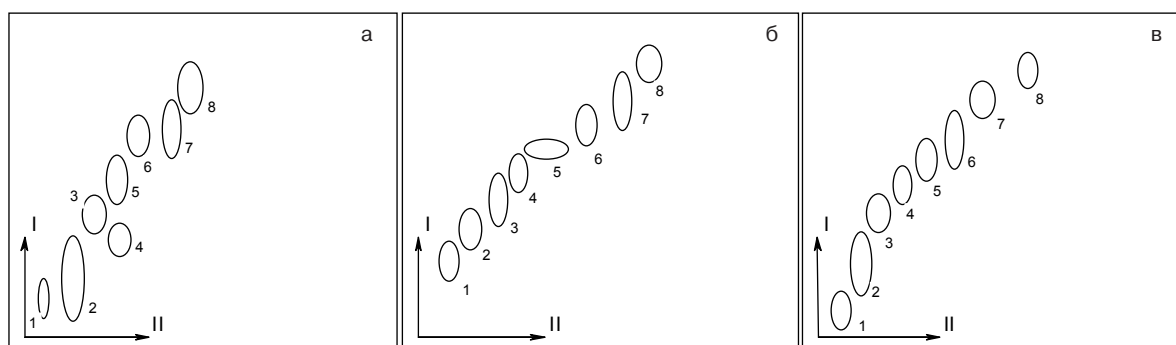


Рис. 1. Схеми тонкошарових двомірних хроматограм ліпофільних екстрактів надземних частин брокколі сортів Тонус (а), Калабрайзе (б), Вітамінна (в).

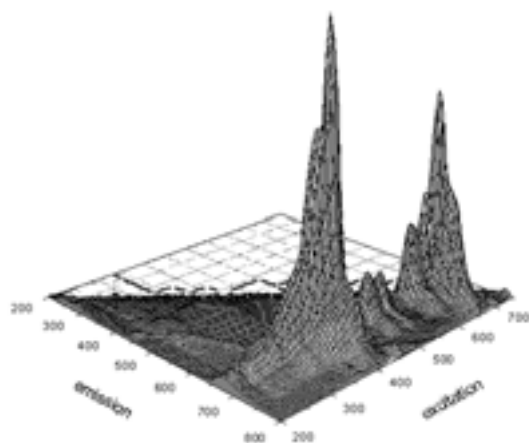


Рис. 2. Тривимірний спектр флуоресценції ліпофільного екстракту з надземної частини брокколі сорту Тонус.

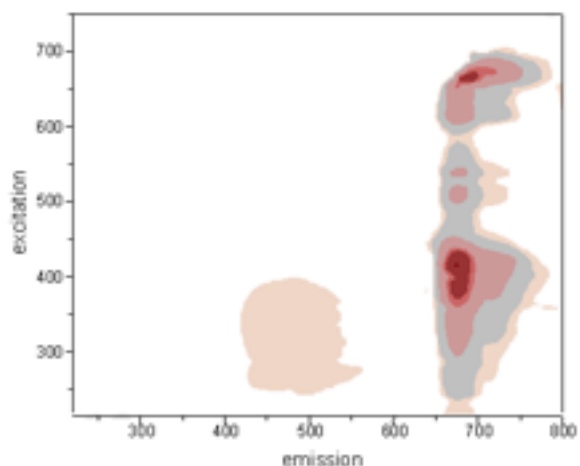


Рис. 3. Проекція тривимірного спектра флуоресценції ліпофільного екстракту з надземної частини брокколі сорту Тонус на площу збудження/емісія.

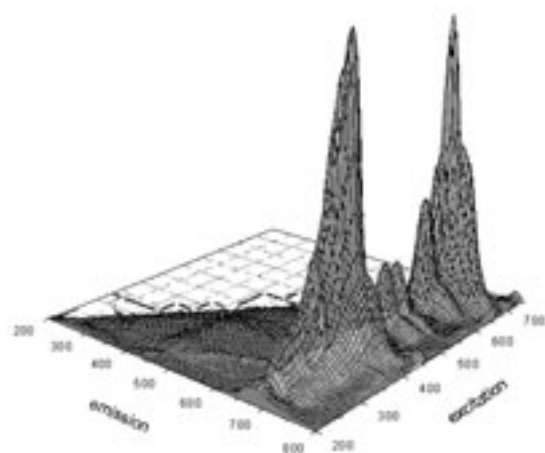


Рис. 4. Тривимірний спектр флуоресценції ліпофільного екстракту з надземної частини брокколі сорту Калабрайзе.

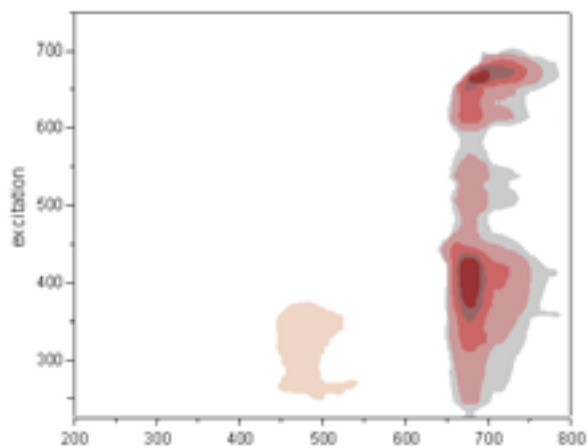


Рис. 5. Проекція тривимірного спектра флуоресценції ліпофільного екстракту з надземної частини брокколі сорту Калабрайзе на площу збудження/емісія.

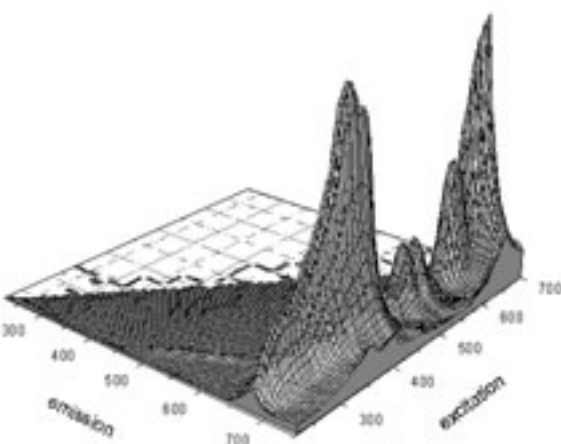


Рис. 6. Тривимірний спектр флуоресценції ліпофільного екстракту з надземної частини брокколі сорту Вітамінна.

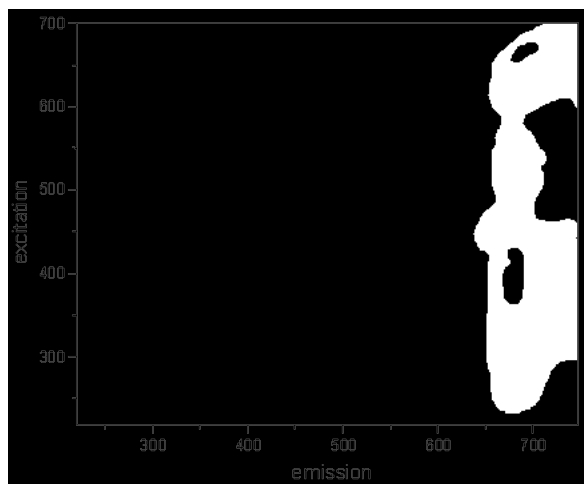


Рис. 7. Проекція тривимірного спектра флуоресценції ліпофільного екстракту з надземної частини брокколі сорту Вітамінна на площу збудження/емісія.

кількісний вміст каротиноїдів у ліпофільних екстрактах сортів Тонус, Калабрайзе, Вітамінна складав 57,97 (5,8 %), 91,92 (9,1 %), 91,22 (9,1 %) відповідно; кількісний вміст

хлорофілів у ліпофільних екстрактах сортів Тонус, Калабрайзе, Вітамінна – 92,91 (9,3 %), 164,03 (16,4 %), 154,58 мг/г (15,5 %) відповідно.

ВИСНОВКИ. 1. За допомогою хроматографічних методів аналізу в ліпофільних фракціях з надземних частин брокколі сортів Тонус, Калабрайзе, Вітамінна виявлено хлорофіли, каротиноїди та продукти розпаду хлорофілів – порфірини.

2. Отримано спектри поглинання та тривимірні спектри флуоресценції з надземних частин брокколі сортів, що досліджувались, та

проведено визначення кількісного вмісту суми каротиноїдів у перерахунку на β -каротин та хлорофілів.

3. Визначення ліпофільних сполук у надземних частинах брокколі проводили вперше, його можна використовувати при розробці аналітичної нормативної документації на лікарський засіб, основу якого складають ліпофільні сполуки.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бензель Л.В., Олійник П.В. Лікування соками рослин. – Івано-Франківськ: ІФДМА, 2003. – 180 с.
2. Болотских А.С. Капуста. – Х.: ФОЛІО, 2002. – 318 с.
3. Володарська А.Т., Скляревський О.М. Вітаміни на грядці. – К.: Урожай, 1989. – 142 с.
4. Григоровская М. Капуста брокколи // Огородник. – 2004. – № 6. – С. 32-33.

5. Параніч В.А., Дорошенко А.О., Рошаль О.Д. та ін. Визначення видового походження рослинних олій // Фармац. журн. – 2000. – № 5. – С. 86-90.
6. Решетняк В.В., Цигура І.В. Травник. – Х.: Прапор, 1992. – 463 с.
7. Соловых З.Х. Удивительный кочан. – К.: Ураджай, 1991. – 157 с.
8. Хайс И.М., Мацек К. Хроматография на бумаге. – М.: Мир, 1962. – 852 с.

ИЗУЧЕНИЕ ЛИПОФИЛЬНЫХ ФРАКЦИЙ КАПУСТЫ БРОККОЛИ СОРТОВ ТОНУС, КАЛАБРАЙЗЕ, ВИТАМИННАЯ

И.Н. Владимирова, В.С. Кисличенко
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Методом исчерпывающей экстракции хлороформом в аппарате Сокслета были получены липофильные фракции из надземных частей брокколи сортов Тонус, Калабрайзе, Витаминная. С помощью хроматографических методов анализа установлено наличие хлорофиллов и каротиноидов. Получены спектры поглощения и спектры флуоресценции липофильного комплекса из надземных частей брокколи.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: капуста брокколи, липофильные вещества, спектр поглощения, спектр флуоресценции.

STUDY OF LIPOPHILIC FRACTIONS OF BROCCOLI CABBAGE SPECIES TONUS, KALABRAYZE AND VITAMINIC

I.M. Vladymyrova, V.S. Kyslychenko
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

Using the method of full extraction by chloroform in Soxhlet apparatus lipophilic fractions from the above-ground parts of broccoli Tonus, Kalabrayze and Vitaminic species were obtained. By means of chromatographic methods of analysis the quantitative contents of chlorophylls and carotenoids was determined. The spectra of fluorescence and absorption of broccoli lipophilic complexes from above-ground parts of broccoli were obtained.

KEY WORDS: broccoli cabbage, lipophilic complexes, spectrum of absorption, spectrum of fluorescence.

Отримано 21.11.2006 р.

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

МЕТАБОЛІЗМ ПРОТЕОГЛІКАНІВ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ РІЗНИХ ВІДДІЛІВ СКЕЛЕТА ЗА УМОВ ЕМОЦІЙНОГО СТРЕСУ, НЕДОСТАТНОСТІ ГОНАД ТА ЇХ ПОЄДНАНОГО ВПЛИВУ

М.В. Білець, Ф.С. Леонтьєва¹, Л.М. Тарасенко

ВИЩИЙ ДЕРЖАВНИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД УКРАЇНИ "УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА
СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ"

ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ ХРЕБТА ТА СУГЛОБІВ ІМ. М.І. СІТЕНКА¹

На 68 щурах-самцях лінії Вістар досліджено зміни вмісту гіалуронової кислоти та хондроїтинсульфатів у кістковій тканині різних відділів скелета (нижня щелепа, стегнова кістка, хребці) за умов емоційного стресу, недостатності гонад та їх поєднаного впливу. Встановлено, що поєднаний вплив емоційного стресу та недостатності гонад, на відміну від їх парціальної дії, підсилює катаболічні зміни в кістковій тканині різної локалізації та її резорбцію, про що свідчить максимальне підвищення кількості вуглеводних похідних протеогліканів органічного матриксу кісткової тканини. Найбільш чутливим до дії вказаних чинників відділом скелета є кісткова тканина нижньої щелепи.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: емоційний стрес, протеоглікани, гексуронової кислоти, гіалуронова кислота, хондроїтинсульфати.

ВСТУП. Кісткова тканина (КТ) складається з мінеральної фази та органічного матриксу. Мінеральна фаза представлена кристалами – апатитами та аморфною часткою. Органічний матрикс КТ включає колагенові та неколагенові білки [4, 7-9]. Протеоглікани (ПГ), що складають приблизно 10 % всієї фракції неколагенових білків КТ, включають генетично різні стрижневі білки та олігосахариди, приєднані N- і C-глікозидними зв'язками, та ковалентно зв'язані бічні ланцюги глікозаміногліканів (ГАГ) [5, 9, 10]. Бічні ланцюги ГАГ складаються із сульфатованих субодиниць: хондроїтину, дерматану, кератану або гепарану, що повторюються. Існує декілька видів протеогліканів, до яких, зокрема, відносять такі білки, як хондроїтинсульфатвмісний протеоглікан, декорин, біглікан та інші [12, 13]. ПГ виконують різноманітні функції, наприклад беруть активну участь у процесі мінералізації КТ та забезпечують її трофічну функцію [9]. Хондроїтинсульфатвмісний ПГ захоплює значний за обсягом простір майбутньої кістки завдяки великому вмісту сульфату в гідратованому стані [9]. Інші білки – декорин та біглікан – беруть участь у регуляції діаметра фібрил колагену та в процесі мінералізації кістки [13]. Маркерами катаболізму протеогліканів можуть бути компоненти глікозаміногліканів: © М.В. Білець, Ф.С. Леонтьєва, Л.М. Тарасенко, 2007.

хондроїтинсульфати та гіалуронова кислота, а також їх складові – гексуронової кислоти [1, 3, 4, 10].

Мета даної роботи – дослідити зміни вмісту гіалуронової кислоти та хондроїтинсульфатів у кістковій тканині різних відділів скелета (нижня щелепа, стегнова кістка, хребці) за умов емоційного стресу, недостатності гонад та їх поєднаного впливу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти виконано на 68 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар. При проведенні експериментів дотримувались рекомендацій щодо медико-біологічних досліджень згідно з Європейською конвенцією (1993). Природну модель емоційного стресу (ЕС) відтворювали за методом Є.А. Юматова [11], недостатність гонад (НГ) – за методом Я.Д. Кіршенблата [2] під ефірним наркозом. На четвертий день відтворення емоційного стресу проводили евтаназію тварин під гексеналовим наркозом (50 мг/кг маси). Вміст глікозаміногліканів визначали шляхом фракціонування за методом S. Schiller та визначення в кожній фракції концентрації глюкуронової кислоти за методом Z. Dische [14]. Ступінь резорбції кісткової тканини нижньої щелепи оцінювали шляхом визначення коефіцієнту оголення коренів молярів [6].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Нами встановлено, що за умов емоційного стресу концентрація гексуранових кислот достовірно підвищилась в 1,5 раза в кістковій тканині нижньої щелепи порівняно з контролем (табл. 1). Тестектомія не призвела до достовірних змін даного показника (див. табл. 1). Поєднана дія ЕС та тестектомії характеризувалася підвищенням в 1,9 раза рівня гексуранових кислот порівняно з групою інтактних тварин і групами щурів з парціальним впливом ЕС та НГ. За цих умов концентрація гексуранових кислот у стегновій кістці достовірно зросла в 1,5 раза, в хребцях – в 1,3 раза відносно контрольних значень. Такий характер змін гексуранових кислот свідчить про більш виражений катаболічний вплив на органічний матрикс КТ емоційного стресу та недостатності гонад (див. табл. 1).

Наведені в таблиці 2 результати вказують на те, що за умов парціального впливу ЕС та НГ концентрація гіалуронової кислоти достовірно не відрізняється від відповідного показника в інтактних тварин. Але поєднана дія емоційного стресу та недостатності гонад призвела до достовірного підвищення в 1,4 раза

рівня гіалуронової кислоти в КТ нижньої щелепи, в 1,3 раза – в КТ стегнової кістки та в 1,2 раза – в КТ хребців (див. табл. 2).

Дослідження характеру змін хондроїтин-4-та хондроїтин-6-сульфатів (ХС) (табл. 3) в КТ свідчать про те, що за умов ЕС їх концентрація достовірно збільшилась в 1,3 раза тільки в КТ нижньої щелепи порівняно з інтактними тваринами. Тестектомія не призвела до достовірного підвищення рівня хондроїтинсульфатів у КТ різних відділів скелета. Поєднана дія ЕС та НГ зумовила зростання в 1,5 раза рівня хондроїтинсульфатів у КТ нижньої щелепи. За цих умов спостерігалось також підвищення в 1,3 раза вмісту ХС у КТ хребців. Отже, поєднаний вплив ЕС та НГ сприяє катаболічному впливу на протеоглікани КТ нижньої щелепи та хребців (див. табл. 3).

Таким чином, найбільш чутливою до дії ЕС ділянкою скелета є кісткова тканина нижньої щелепи. Такий висновок переконливо підтверджує визначення коефіцієнта оголення коренів молярів, який відображає ступінь резорбції альвеолярного відростка щелепних кісток (табл. 4). Після дії ЕС спостерігалось достовірно підвищення в 1,3-1,4 раза ступеня оголення

Таблиця 1 – Концентрація гексуранових кислот у кістковій тканині різних відділів скелета за умов емоційного стресу та поєднаної дії емоційного стресу і недостатності гонад у щурів ($M \pm m$)

Характер досліджень	Гексуранові кислоти, мкмоль/г		
	нижня щелепа	стегнова кістка	хребці
1. Інтактні (n=17)	1,57±0,09	1,74±0,17	2,16±0,09
2. Емоційний стрес (n=22)	2,27±0,17*	2,40±0,16	2,40±0,12
3. Несправжня кастрація (n=9)	1,65±0,07	1,83±0,07	2,20±0,09
4. Тестектомія (n=9)	1,72±0,12	1,96±0,08	2,43±0,08
5. Емоційний стрес+тестектомія (n=11)	2,93±0,24**	2,65±0,18**	2,87±0,20**

Примітка. * – $p_{1-2} < 0,05$; ** – $p_{1-5} < 0,05$.

Таблиця 2 – Вміст гіалуронової кислоти в кістковій тканині різних відділів скелета за умов емоційного стресу та поєднаної дії емоційного стресу і недостатності гонад у щурів ($M \pm m$)

Характер досліджень	Гіалуронова кислота, г/100 г сухої тканини		
	нижня щелепа	стегнова кістка	хребці
1. Інтактні (n=6)	0,211±0,013	0,252±0,007	0,280±0,009
2. Емоційний стрес (n=6)	0,246±0,006	0,290±0,001	0,300±0,001
3. Тестектомія (n=6)	0,230±0,030	0,283±0,001	0,304±0,016
4. Емоційний стрес+тестектомія (n=6)	0,300±0,016*	0,340±0,020*	0,33±0,010*

Примітка. * – $p_{1-4} < 0,05$.

Таблиця 3 – Вміст хондроїтинсульфатів у кістковій тканині різних відділів скелета за умов емоційного стресу та поєднаної дії емоційного стресу і недостатності гонад у щурів ($M \pm m$)

Характер досліджень	Хондроїтинсульфати, г/100 г сухої тканини		
	нижня щелепа	стегнова кістка	хребці
1. Інтактні (n=6)	0,150±0,010	0,144±0,009	0,160±0,008
2. Емоційний стрес (n=6)	0,200±0,009*	0,170±0,009	0,170±0,015
3. Тестектомія (n=6)	0,160±0,060	0,171±0,019	0,160±0,016
4. Емоційний стрес+тестектомія (n=6)	0,220±0,005**	0,180±0,014	0,200±0,005**

Примітка. * – $p_{1-2} < 0,05$; ** – $p_{1-4} < 0,05$.

Таблиця 4 – Коефіцієнт оголення коренів молярів за умов емоційного стресу та поєднаної дії емоційного стресу і недостатності гонад у щурів ($M \pm m$)

Характер досліджень	$M_1, \%$	$M_2, \%$	$M_3, \%$
1. Інтактні (n=17)	42,0±1,0	37,0±3,1	34,0±1,4
2. Емоційний стрес (n=22)	55,0±3,1*	48,0±2,7	49,0±2,2*
3. Несправжня кастрація (n=9)	49,0±2,3	48,0±2,0	49,0±3,3
4. Тестектомія (n=9)	57,0±3,8^	47,0±3,0^	50,0±2,9^
5. Емоційний стрес+тестектомія (n=11)	60,0±2,0**	62,0±2,0**	61,0±2,4**

Примітка. * – $p_{1-2} < 0,01$; ^ – $p_{1-4} < 0,05$; ** – $p_{1-5} < 0,01$.

коренів молярів на рівні першого та третього молярів (див. табл. 4). Тестектомія призвела до збільшення в 1,5 раза коефіцієнта оголення коренів молярів на рівні третього моляра (див. табл. 4). Поєднана дія ЕС та НГ характеризувалася підвищенням коефіцієнта оголення коренів молярів в 1,4 раза на рівні першого моляра, в 1,6 раза на рівні другого моляра та в 1,8 раза на рівні третього моляра (див. табл. 4). Вказані зміни свідчать про значне підсилення резорбтивних процесів у кістковій тканині нижньої щелепи за умов поєднаної дії емоційного стресу та недостатності гонад порівняно з їх парціальним впливом.

Отже, поєднана дія емоційного стресу та недостатності гонад порушує остеогенез, підсилюючи катаболізм протеогліканів та процеси резорбції в кістковій тканині. Найбільш чутливою ділянкою скелета за умов поєднаної дії емоційного стресу та недостатності гонад є кісткова тканина нижньої щелепи, що пов'язано з особливостями її нейрогуморальної регуляції гемодинаміки та метаболічних процесів. Найбільш вірогідним механізмом, що зумовлює взаємопосилюючий вплив емоційного стресу та недостатності гонад, є катаболічний вплив глюкокортикоїдів на органічний матрикс

кісткової тканини та виключення анаболічного ефекту статевих гормонів.

ВИСНОВКИ. 1. Емоційний стрес порушує структурну організацію кісткової тканини внаслідок підсилення розпаду протеогліканів органічного матриксу кісткової тканини різних відділів скелета (нижня щелепа, стегова кістка та хребці), про що свідчить збільшення рівня вуглеводних похідних протеогліканів у кістковій тканині за умов емоційного стресу порівняно з інтактними щурами.

2. Поєднаний вплив емоційного стресу та недостатності гонад, на відміну від їх парціальної дії, підсилює катаболічні зміни в кістковій тканині різної локалізації та її резорбцію, на що вказує максимальне підвищення кількості вуглеводних похідних протеогліканів органічного матриксу кісткової тканини.

3. Найбільш чутливим до емоційного стресу та недостатності гонад, а також їх поєднаної дії відділом скелета є кісткова тканина нижньої щелепи. Доказом цього є максимально виражені зміни вмісту протеогліканів кісткової тканини нижньої щелепи порівняно з хребцями та стеговою кісткою, а також підсилення резорбції альвеолярного відростка щелепних кісток.

ЛІТЕРАТУРА

- Білець М.В., Тарасенко Л.М. Емоційний стрес на тлі недостатності гонад підсилює розпад неколагенових білків кісткової тканини різних відділів скелета // Мед. хімія. – 2004. – 6, № 3. – С. 51-54.
- Киршенблат Я.Д. Практикум по эндокринологии. – М.: Высшая школа, 1969. – 256 с.
- Леонтьев В.К., Гайдамака А.Н. Методы определения белковосвязанных углеводов в минерализованных тканях // Лаб. дело. – 1975. – № 5. – С. 35-38.
- Минченко Б.И., Марченкова Л.А. Биохимические маркеры метаболизма костной ткани // Лаб. медицина. – 2000. – № 3. – С. 45-59.
- Насонов Е.Л. Проблемы остеопороза: изуче-

ние биохимических маркеров костного метаболизма // Клин. медицина. – 1998. – № 5. – С. 20-25.

6. Николаева А.В., Розовская Е.С. Экспериментальные дистрофии тканей пародонта // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1965. – 60, № 7. – С. 46-49.

7. Олійник В.А., Поворознюк В.В., Терехова Г.М. Вторичный остеопороз при эндокринной патологии // Проблемы остеологии. – 1998. – 1, № 1. – С. 51-58.

8. Поворознюк В.В., Григорьева Н.В. Менопауза и костно-мышечная система. – К., 2004. – 512 с.

9. Риггз Лоренс Б., Мелтон III Джозеф Л. Остеопороз. Этиология, диагностика, лечение. – С.Пб.: ЗАО "Изд-во БИНОМ", 2000. – 560 с.

10. Слуцкий Л.И. Биохимия нормальной и пато-

логически измененной соединительной ткани. – Л.: Медицина, 1969. – 376 с.

11. Юматов Е.А., Певцова Е.И., Мезенцева Л.И. Физиологически адекватная модель агрессии и эмоционального стресса // Журн. высшей нервной деятельности. – 1988. – **38**, № 2. – С. 350-354.

12. Beresford J.N., Fedarko N.S., Fisher L.W. et al. Analysis of the proteoglycans synthesized by human bone cells in vitro // J. Biol. Chem. – 1987. – **262**. –

P. 17164-17172.

13. Bianco P., Fisher L.W., Young M.F. et al. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues // J. Histochem. Cytochem. – 1990. – **38**. – P. 1549-1563.

14. Dische Z. Proteins and protein synthesis in rat Lenses with galactose cataract // A.M.A. Arch. Opth. – 1956. – **55**. – P. 633-642.

МЕТАБОЛИЗМ ПРОТЕОГЛИКАНОВ КОСТНОЙ ТКАНИ РАЗНЫХ ОТДЕЛОВ СКЕЛЕТА В УСЛОВИЯХ ЭМОЦИОНАЛЬНОГО СТРЕССА, НЕДОСТАТОЧНОСТИ ГОНАД И ИХ СОЧЕТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

М.В. Билец, Ф.С. Леонтьева¹, Л.М. Тарасенко

ВИСШЕЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧЕБНОЕ ЗАВЕДЕНИЕ УКРАИНЫ "УКРАИНСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ
СТОМАТОЛОГИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ"

ИНСТИТУТ ПАТОЛОГИИ ПОЗВОНОЧНИКА И СУСТАВОВ ИМ. М.И. СИТЕНКА¹

Резюме

На крысах-самцах линии Вистар исследованы изменения содержания гиалуроновой кислоты и хондроитинсульфатов в костной ткани разных отделов скелета (нижняя челюсть, бедренная кость, позвонки) в условиях эмоционального стресса, недостаточности гонад и их сочетанного воздействия. Установлено, что сочетанное воздействие эмоционального стресса и недостаточности гонад, в отличие от их парциального воздействия, усиливает катаболические изменения в костной ткани разной локализации и ее резорбцию, о чем свидетельствует максимальное повышение количества углеводных производных протеогликанов органического матрикса костной ткани. Наиболее чувствительным к воздействию указанных факторов участком скелета является костная ткань нижней челюсти.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эмоциональный стресс, протеогликаны, гексуроновые кислоты, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфаты.

METABOLISM OF PROTEOGLYCANS OF BONE TISSUE IN DIFFERENT PARTS OF THE SKELETON UNDER EMOTIONAL STRESS, GONADE DEFICIENCY AND THEIR COMBINED ACTION

M.V. Bilets, Fh.S. Leontyeva¹, L.M. Tarasenko

HIGHER STATE EDUCATIONAL INSTITUTION OF UKRAINE
"UKRAINIAN MEDICAL STOMATOLOGICAL ACADEMY"

INSTITUTE OF PATHOLOGIES OF SPINE AND JOINTS NAMED AFTER M.I. SITENKO¹

Summary

Alterations of contents of hyaluronic acid and chondroitin sulfates in the bone tissue in different parts of the skeleton (lower jaw, femur, vertebrae) under conditions of emotional stress, gonade deficiency and their combined action were studied on male rats of the Wistar line. It was found that, compared to their separate action, the combined action of emotional stress and gonade deficiency increases catabolic changes in the bone tissue of different localization and its resorption, which is indicated by maximum rise of carbohydrate derivatives of proteoglycans of the organic matrix of the bone tissue. The bone tissue of the lower jaw is the part of the skeleton, which is the most sensitive to these factors.

KEY WORDS: emotional stress, proteoglycans, hexuronic acids, hyaluronic acid, chondroitin sulfates.

Отримано 29.01.2007 р.

Адреса для листування: М.В. Білець, Вищий державний навчальний заклад України "Українська медична стоматологічна академія", Україна.

ПОХІДНІ [1,2,4]-ТРИАЗИНО[2,3-С]- ТА [1,2,4]-ТРИАЗИНО[4,3-С]-ХІНАЗОЛІНІВ – ПЕРСПЕКТИВНІ СПОЛУКИ З АНТИОКСИДАНТНОЮ І НООТРОПНОЮ ДІЯМИ

**В.В. Галиця, О.Ю. Воскобойнік, О.В. Кривошей,
І.Ф. Беленічев, С.І. Коваленко, О.В. Карпенко**
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Дослідження, проведені на моделях інгібування супероксидрадикала та окисної модифікації білка ВРО у дослідах in vitro, дозволили ідентифікувати "сполуки-лідери" з високою антиоксидантною та антирадикальною активністю серед похідних [1,2,4]-триазино[2,3-с]- і [1,2,4]-триазино[4,3-с]-хіназолінів. Синтезовані сполуки проявляють високий антигіпоксичний та ноотропний ефект, збільшують при цьому тривалість життя експериментальних тварин при гіпоксії замкнутого простору, попереджують розвиток антероградної амнезії, активують орієнтовно-дослідницьку поведінку в умовах відкритого поля. Зазначені похідні є перспективними сполуками для пошуку ноотропних засобів з антигіпоксичним, антиоксидантним та антирадикальним механізмами дії.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: антиоксидантна та антиамнестична активність, орієнтовно-дослідницька поведінка, ноотропи, [1,2,4]-триазино[2,3-с]- і [1,2,4]-триазино[4,3-с]-хіназоліни.

ВСТУП. Ноотропи – лікарські засоби, до яких відносять значну кількість препаратів з різноманітною хімічною будовою та механізмами дії [1, 4, 6, 15, 18]. Так, це похідні піролідону (пірацетам і його аналоги), диметиламіноетанолу (деанолу ацеглюмат, меклофеноксат та ін.), піридоксину (енцефабол), амінокислоти та нейропептиди (ГАМК, фенібут, пікамілон, пантогам, гліцин, глутамінова кислота тощо), холіноміметики центрального дії (холіну альфосцерат), препарати Ginkgo biloba (білобіл, мемоплант і т. ін.) й сполуки іншої будови, які належать до різних класів органічних речовин і, що важливо, подібні за механізмом дії до пірацетаму, здатні покращувати процеси навчання і пам'яті [1, 4, 12]. Їх застосовують для фармакотерапії різних форм нейропсихічних розладів у хворих і фармакокорекції тривалих психоемоційних стресів у здорових людей, які зумовлюють розвиток психосоматичних захворювань [12]. Для багатьох з них покращання пам'яті (похідні піролідону) є головним фармакологічним ефектом, а для препаратів інших хімічних груп ноотропна дія – один із компонентів фармакодинаміки. Так, більшість із них поряд з ноотропною активністю проявляє ан-

ксіолітичну, ангіопротективну, седативну, протисудомну, міорелаксуючу, антигіпоксичну, антиоксидантну та інші дії. Більшість із зазначених препаратів є монокомпонентними, тобто для кожної субстанції з ноотропною дією характерний домінуючий фармакологічний ефект, що не дозволяє використовувати всі переваги даного класу лікарських сполук [7, 10, 14]. З огляду на це, цілеспрямований пошук ноотропів серед невідомих класів органічних сполук та створення комбінованих препаратів [5], які б проявляли полігамний фармакологічний ефект ("м'які ліки" (soft drugs), "подвійні ліки" (twin drugs), проліки (prodrugs)), є актуальною проблемою. Її вирішення дозволило б максимально використовувати різноманітність біологічної дії, яка характерна для даних засобів, і це, безперечно, привело б до оптимізації їх клінічного застосування.

Метою даної роботи був спрямований пошук сполук з ноотропною активністю та антиоксидантним механізмом дії серед заміщених 3-оксо-[1,2,4]-триазино-[4,3-с]- і 4-оксо-[1,2,5]-триазино-[4,3-с]-хіназолінів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження був ряд похідних 4-R-3-оксо-2,3-дигідро-4Н-[1,2,4]-триазино[4,3-с]хіназолінів

© В.В. Галиця, О.Ю. Воскобойнік, О.В. Кривошей, І.Ф. Беленічев, С.І. Коваленко, О.В. Карпенко, 2007.

(КО-4, КО-6, КО-10, КО-16, КО-17) та 3-R-2-оксо-[1,2,5]триазино[2,3-с]хіназолінів (МТ-68, МТ-69, МТ-70, МТ-74), які синтезовані на кафедрі фармацевтичної хімії Запорізького державного медичного університету (завідувач кафедри д-р фармац. наук, проф. І.А. Мазур).

Оцінку антирадикальної активності (АРА) синтезованих сполук проводили у дослідях *in vitro* на моделі інгібування супероксидрадикала [9]. Антиоксидантну активність (АОА) визначали за пригніченням утворення карбонільних груп (АФГ) при $\lambda=274$ нм та карбоксильних груп (КФГ) при $\lambda=363$ нм [16, 17] – основних маркерів окисної модифікації білка (ОМБ), які кількісно реагують з 2,4-динітрофенілгідразином (2,4-ДНФГ). ОМБ проводили в гомогенаті мозку щурів лінії Вістар.

Синтезовані сполуки тестували на антигіпоксичну дію [2, 3, 11, 13] на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г, одержаних із віварію Інституту фармакології і токсикології АМН України. Ноотропну активність оцінювали за зміною умовної реакції пасивного уникання (УРПУ) після внутрішньоочеревинного введення атропіну в дозі 40 мг/кг [8]. Досліджувані сполуки вводили *per os* за 60 хв до навчання у вигляді суспензії, стабілізованої твіном 80; пірацетам – в мінімальній кількості води у дозі 250 мг/кг. Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи програму Statistica 5,0 Windows (Stat Stop, Inc. 1995).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як показали результати експериментів, досліджувані сполуки проявляли значну АРА (табл. 1). Так, найбільше пригнічували утворення супероксидрадикала у системі "адреналін-адренохром" сполуки МТ-70, МТ-74, КО-4 та КО-6, перевищуючи при цьому активність еталону порів-

няння – сечовини (на 15-52 %). Необхідно відмітити, що АРА серед зазначених сполук визначалася не стільки будовою самої гетероциклічної системи, скільки наявністю та будовою замісників. Так, виражену активність проявляли сполуки, які містили *p*-метилфенільний (МТ-69), *p*-метоксифенільний (МТ-74), карбоксиметильний (КО-4), метоксикарбонільметильний (КО-6), бензилоксикарбонільметильний (КО-17) та тіофен-2-ільний (МТ-70) замісники.

Окисна модифікація білка відігравала ключову роль у молекулярних механізмах окисного стресу і була пусковим механізмом окисної деструкції інших молекул [17]. При цьому відмічались достовірне підвищення рівня продуктів вільнорадикального окиснення (ВРО) (карбонільних і карбоксильних груп) та інтенсивне утворення низькомолекулярних білкових компонентів. Так, аналіз одержаних даних зі спонтанної ОМБ показав, що в гомогенаті відзначалося достовірне зростання рівня продуктів ВРО (табл. 2). При цьому підвищувався рівень АФГ і КФГ у 6,66 та 23,5 раза відповідно порівняно з інтактом.

Введення в гомогенат мозку щурів за умов ОМБ синтезованих сполук призвело до достовірного зниження рівня карбонільних та карбоксильних груп. Так, найбільше пригнічували утворення АФГ і КФГ сполуки МТ-69, МТ-70, КО-4, КО-16, КО-17. Таким чином, похідні 3-оксо-2,3-дигідро-4Н-[1,2,4]-триазино[4,3-с]хіназолінів та 3-R-2-оксо-[1,2,5]триазино[2,3-с]хіназолінів проявляли виражені АРА й АОА в різних умовах ініціювання ВРО *in vitro*, запобігаючи утворенню АФГ і накопиченню вмісту продуктів окисної модифікації.

З урахуванням того, що досліджувані сполуки впливали на процеси ВРО, вони в подальшому були протестовані на антигіпоксичну

Таблиця 1 – Антирадикальна активність синтезованих сполук

Сполуки	Інгібування супероксидрадикала*	
	Оптична густина	АРА, %
Контроль	0,20±0,001	–
МТ-68	0,046±0,001	22,8
МТ-69	0,062±0,001	30,8
МТ-70	0,176±0,001	87,8
МТ-74	0,096±0,001	47,8
КО-4	0,114±0,001	56,8
КО-6	0,100±0,001	50,0
КО-10	0,056±0,001	27,8
КО-16	0,060±0,001	29,8
КО-17	0,070±0,001	34,8
Сечовина	0,072±0,001	35,8

Примітка. * – досліджувані сполуки визначали в дозі 0,25 мкмоль/мл, сечовину – 0,15 мкмоль/мл.

Таблиця 2 – Ступінь ОМБ у гомогенаті ГМ щурів

Сполуки**	АФГ	КФГ
Контроль	18,0±0,002	9,4±0,001
Інтактна група	2,7±0,001	0,4±0,001
МТ-68	10,8±0,03	4,7±0,001
МТ-69	16,3±0,001	9,3±0,001
МТ-70	30,6±0,001	23,0±0,001
МТ-74	11,2±0,001	4,1±0,001
КО-4	14,5±0,001	6,0±0,001
КО-6	10,9±0,001	5,9±0,001
КО-10	11,0±0,001	5,1±0,001
КО-16	15,6±0,002	9,5±0,001
КО-17	18,0±0,001	8,4±0,001
Емоксипін	15,7±0,002	7,6±0,001

Примітка. * – $p>0,05$ відносно контролю; ** – досліджувані сполуки визначали в дозі 0,25 мкмоль/мл, емоксипін – 0,15 мкмоль/мл.

Таблиця 3 – Дослідження антигіпоксичної дії синтезованих сполук за умов гіпоксії замкнутого простору

Сполуки	Доза, мг/кг	Тривалість життя, хв
Контроль	–	3,22±0,12
MT-68	0,1	11,59±0,02
	1,0	6,45±0,21
	10,0	7,05±0,11
	100,0	4,50±0,88
MT-70	0,1	7,36±0,21
	1,0	6,16±0,11
	10,0	7,28±0,10
	100,0	5,36±0,71
MT-69	0,1	5,40±0,11
	1,0	5,37±0,11
	10,0	8,04±0,10
	100,0	7,18±0,62
MT-74	0,1	6,32±0,11
	1,0	7,01±0,12
	10,0	6,09±0,11
	100,0	6,18±0,54
KO-16	0,1	7,56±0,12
	1,0	6,16±0,11
	10,0	6,28±0,11
	100,0	6,48±0,21
KO-10	0,1	7,26±0,11
	1,0	7,14±0,10
	10,0	7,37±0,11
	100,0	8,04±0,21
KO-17	0,1	7,52±0,11
	1,0	6,13±0,17
	10,0	9,04±0,10
	100,0	9,14±0,11
KO-4	0,1	6,47±0,12
	1,0	6,09±0,21
	10,0	6,47±0,11
	100,0	5,36±0,21
KO-6	0,1	5,25±0,12
	1,0	7,48±0,27
	10,0	6,50±0,12
	100,0	5,36±0,21
Пірацетам	250,0	4,17±0,11

Примітка. * – $p > 0,05$ відносно контролю.

активність. Так, дослідження антигіпоксичної активності сполук у діапазоні доз 0,1–100 мг/кг показали, що всі вони проявляли виражену дію і в 1,4–3,6 рази збільшували тривалість життя експериментальних тварин за умов гіпоксії замкнутого простору (табл. 3). Цікавим є той факт, що всі сполуки у діапазоні досліджуваних доз за силою антигіпоксичного ефекту перевищували активність пірацетаму. Найбільш активними сполуками на даній моделі виявились MT-68, MT-69, MT-70, KO-10, KO-17, які при збільшенні дози до 100 мг/кг зберігали та навіть посилювали (за винятком сполук MT-68 і MT-70) антигіпоксичний ефект. Важливо

Таблиця 4 – Оцінка збереження УРПУ у тварин на 2 добу експерименту

Сполуки	Доза, мг/кг	Латентний період заходження у темний відсік, с
Контроль	–	2,0±0,1
Інтактна група	–	60,7±1,6
MT-68	1,0	28,1±2,0
	10,0	120,0±2,6
MT-70	1,0	3,7±0,7
	10,0	16,2±0,7
MT-69	1,0	8,7±0,8
	10,0	16,0±0,8
MT-74	1,0	10,7±0,9
	10,0	9,1±0,6
KO-16	1,0	89,7±2,6
	10,0	5,4±0,8
KO-10	1,0	11,7±1,7
	10,0	10,2±1,6
KO-17	1,0	31,7±2,6
	10,0	2,4±0,2
KO-4	1,0	34,7±4,2
	10,0	12,0±0,7
KO-6	1,0	60,7±2,6
	10,0	180,7±1,7
Пірацетам	250,0	3,6±0,07

Примітка. * – $p > 0,05$ відносно контролю.

відмітити, що наявність високих АРА та АОО позитивно впливала на антигіпоксичну активність і, безперечно, збільшувала тривалість життя.

Основним з механізмів дії ноотропних засобів є їх антиамнестичний ефект, тобто здатність попереджувати або послаблювати порушення навчання і пам'яті, спричинені різними пошкоджувальними факторами. Так, моделювання антероградної амнезії, яку викликали атропіном відразу після навчання УРПУ, у тварин контрольної групи показало наявність когнітивного дефіциту, який проявлявся значним зменшенням латентного періоду УРПУ відносно інтактної групи (табл. 4).

Досліджувані сполуки, які вводили у дозах 1,0 та 10,0 мг/кг за 60 хв до навчання, викликали достовірне збільшення латентного періоду рефлексу порівняно з контрольними тваринами і тваринами, які отримували до навчання пірацетам. Так, введення досліджуваних сполук, особливо MT-68, KO-16, KO-6, вірогідно підвищувало відсоток навчених тварин і усувало явища когнітивного дефіциту. Така дія у розвитку фармакологічного ефекту досліджуваних сполук пов'язана, на нашу думку, з їх здатністю гальмувати окисне пошкодження білкової молекули та активувати антиоксидантну систему.

Важливо також відмітити, що маловідомі похідні [1,2,4]-триазино[2,3-с]- і [1,2,4]-триази-

но[4,3-с]-хіназолінів є перспективними сполуками для пошуку ноотропних засобів з антигіпоксичним, антиоксидантним та антирадикальним механізмами дії.

ВИСНОВКИ. 1. Дослідження, проведені на моделях інгібування супероксидрадикала та окисної модифікації білка ВРО у дослідах *in vitro*, дозволили ідентифікувати "сполуки-лідери" з високою антиоксидантною та антирадикальною активністю серед похідних [1,2,4]-триазино[2,3-с]- і [1,2,4]-триазино[4,3-с]-хіназолінів.

2. Синтезовані сполуки проявляють високий антигіпоксичний та ноотропний ефект, збільшують при цьому тривалість життя експериментальних тварин при гіпоксії замкнутого простору, попереджують розвиток антероградної амнезії, активують орієнтовно-дослідницьку поведінку в умовах відкритого поля.

3. Похідні [1,2,4]-триазино[2,3-с]- і [1,2,4]-триазино[4,3-с]-хіназолінів є перспективними сполуками для пошуку ноотропних засобів з антигіпоксичним, антиоксидантним та антирадикальним механізмами дії.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андреев Б.В. Ноотропные средства // Мир Медицины. – 1998. – № 8. – С. 25-28.
2. Болдырев А.А. Роль активных форм кислорода в жизнедеятельности нейрона // Усп. физиол. наук. – 2003. – **34**, № 3. – С. 21-34.
3. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. – М.: Медицина, 1991. – 248 с.
4. Бурчинский С.Г. Современные ноотропные средства // Журн. практического врача. – 1996. – № 5. – С. 42-45.
5. Варпаховская И. Состояние производства и разработок ноотропных препаратов за рубежом и в России // Ремедиум. – 1997. – № 7. – С. 3-8.
6. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Ноотропные препараты, достижения и перспективы // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – № 4. – С. 3-9.
7. Воронина Т.А., Гарибова Т.Л., Островская Р.У., Мирзоян Р.С. Поликомпонентный механизм действия новых веществ с ноотропным и нейропротективным действием // III Междунар. конф. "Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам". – Суздаль, 2001. – С. 41.
8. Головенко М.Я. Експериментальне вивчення ноотропної активності фармакологічних сполук // Методичні рекомендації. – К., 2002. – 27 с.
9. Губський Ю.І., Дунаєв В.В., Беленічев І.Ф. та ін. Методи оцінки антиоксидантних властивостей фізіологічно активних речовин при ініціюванні вільнорадикальних процесів у дослідах *in vitro* // Методичні

рекомендації. – К.: ДФЦ МОЗ України, 2002. – 26 с.

10. Дунаев В.В., Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Коваленко С.И. Церебропротекторные эффекты антиоксидантов при нейроиммуноэндокринных нарушениях, обусловленных токсическим действием кислородных радикалов // Совр. пробл. токсикол. и фармакол. – 2004. – № 1. – С. 34-56.

11. Лук'янчук В.Д., Савченкова Л.В., Немятих О.Д. та ін. Пошук і експериментальне вивчення потенційних протигіпоксичних засобів // Методичні рекомендації. – К.: ДФЦ МОЗ України, 2002. – 26 с.

12. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: ООО "Новая волна", 2002. – Т. 1. – 539 с.; Т. 2. – 590 с.

13. Стефанов О.В. Доклиническое исследование лекарственных средств. – К.: ГФЦ МОЗ Украины, 2002. – 533 с.

14. Штрыголь С.Ю., Кортунова Т.В., Штрыголь Д.В. Побочные эффекты ноотропных средств // Провізор. – 2003. – № 11. – С. 12-23.

15. Amaducci L. Consensus conference on the methodology of clinical trial of "Nootropics" // Pharmacopsychiatry. – 1990. – **23**. – P. 171-175.

16. Halliwell B. Molecular Biology of free Radicals in Human Diseases. – London: St. Lucia: OICA, 1999. – 410 p.

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

18. Windisch M. Cognition-enhancing (Nootropic) drugs // Brain Mechanisms and Psychotropic Drugs. – N.Y. et al.: CRC Press, 1996. – P. 239-257.

ПРОИЗВОДНЫЕ [1,2,4]-ТРИАЗИНО[2,3-С]- И [1,2,4]-ТРИАЗИНО[4,3-С]-ХИНАЗОЛИНОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ С АНТИОКСИДАНТНЫМ И НООТРОПНЫМ ДЕЙСТВИЯМИ

В.В. Галица, А.Ю. Воскобойник, О.В. Кривошей,
І.Ф. Беленичев, С.І. Коваленко, А.В. Карпенко
ЗАПОРІЖСЬКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Исследования, проведенные на моделях ингибирования супероксидрадикала и окислительной модификации белка СРО в опытах *in vitro*, позволили идентифицировать "соединения-лидеры" с высокой антиоксидантной и антирадикальной активностью среди производных [1,2,4]-триазино[2,3-с]- и [1,2,4]-триазино[4,3-с]-хиназолинов. Синтезированные соединения проявляют высокий антигипоксический и ноотропный эффект, увеличивают при этом длительность жизни экспериментальных животных при гипоксии замкнутого пространства, предупреждают развитие антероградной амнезии, активируют ориентировочно-исследовательское поведение в условиях открытого поля. Отмеченные производные являются перспективными соединениями для поиска ноотропных средств с антигипоксическим, антиоксидантным и антирадикальным механизмами действия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антиоксидантная и антиамнестическая активность, ориентировочно-исследовательское поведение, ноотропы, [1,2,4]-триазино[2,3-с]- и [1,2,4]-триазино[4,3-с]-хиназолины.

[1,2,4]-TRIAZINO[2,3-C]- AND [1,2,4]-TRIAZINO[4,3-C]-QUINAZOLINES DERIVATIVES ARE PERSPECTIVE COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT AND NOOTROPIC ACTIVITY

V.V. Halytsya, O.Yu. Voskoboynik, O.V. Kryvoshey,
I.F. Belenichev, S.I. Kovalenko, O.V. Karpenko
ZAPORIZHYAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Summary

The researches conducted on the models of superoxide radical inhibition and protein oxidant modification *in vitro* allowed to identify "compounds-leaders" with high antioxidant and antiradical activity among [1,2,4]-triazino[2,3-c]- and [1,2,4]-triazino[4,3-c]-quinazoline derivatives. Synthesized substances show high antihypoxic and nootropic effect increasing life duration of experimental animals under conditions of closed space hypoxia, predict anterograde amnesia development, activate orientation research activity under conditions of open field. These compounds are the perspective ones for search of anti-amnestic and nootropic means with antioxidant and antiradical mechanisms of action.

KEY WORDS: antioxidant and antihypoxic activity, orientation-research behaviour, nootropes, [1,2,4]-triazino[2,3-c]- and [1,2,4]-triazino[4,3-c]-quinazolines.

Отримано 22.02.2007 р.

Адреса для листування: В.В. Галица, Запорізький державний медичний університет, пр. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.

ІММОБІЛІЗАЦІЯ ЛІЗОЦИМУ В ПОЛІ-N-ВІНІЛПІРОЛІДОН

І.І. Романовська

ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БОГАТСЬКОГО НАН УКРАЇНИ, ОДЕСА

Вивчено іммобілізацію лізоциму в полі-N-вінілпіролідон та полі-N-вінілпіролідон, модифікований зоєм полікремнієвої кислоти. Взаємодію матриць та ферменту підтверджено методом віскозиметрії. Розроблено умови іммобілізації лізоциму в досліджувані матриці; отримано препарати з високою (80-100 %) бактеріолітичною активністю після іммобілізації і при зберіганні протягом 1 року, розширеними рН-оптимиумами, підвищеною рН- і термостабільністю, пролонгованої дії. Показано дозозалежний ефект γ -опромінення на активність гідрогелевих плівок з лізоцимом на основі модифікованої матриці. Встановлено значне підвищення літичної активності плівок (в 1,5-1,7 раза) при сумісній іммобілізації лізоциму з протеазами в досліджувані матриці за високого (80 %) збереження протеолітичної активності.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: лізоцим, іммобілізація, полі-N-вінілпіролідон, полікремнієва кислота, протеази, плівки.

ВСТУП. У зв'язку із зростанням резистентності мікроорганізмів до антибіотиків, усе більшу увагу приділяють дослідженню бактеріолітичних ферментів для створення ефективних лікарських засобів антибактеріальної дії у рановій та опіковій терапії. Їх арсенал невеликий і обмежений, загалом, лізоцимом. Лізоцим – мурамідоза (К.Ф.3.2.1.17), має виражену антибактеріальну активність завдяки розщепленню β (1 $\rightarrow$ 4)-глікозидних зв'язків між залишками N-ацетилмурамової кислоти та N-ацетилглюкозаміном у полісахариді (муреїні) клітинної стінки бактерій. Однак використання лізоциму в медицині обмежується його нестабільністю, тому розробка іммобілізованих форм ферменту є актуальним завданням. Іммобілізацію лізоциму досліджували на поліакриламідному носії, похідних силохрому при ковалентному зв'язуванні з діальдегідцелюлозою і полікапроамідом, на сополімері вінілпіролідону та діетил-ацеталю акролеїну, на пористих кератинових губках [2,3, 6-8], однак в ряді випадків не було досягнуто суттєвої стабілізації і збереження активності ферменту. Відомо, що полімерні плівкові матеріали з БАР – нова перспективна лікарська форма, яка може знайти широке застосування в медичній практиці завдяки можливості точного дозування лікарської речовини, стабільності та пролонгованості дії, зручності використання лікарем і пацієнтом. Одним з найбільш перспективних носіїв для створення таких матеріалів є полі-N-вінілпіролідон (ПВП), що проявляє виражену терапевтичну дію і дозволений до медичного застосування.

© І.І. Романовська, 2007.

Сучасні полімерні гідрогелеві ранові покриття плівкового типу з БАР мають ряд переваг перед традиційними: пластичність, що забезпечує моделювання на рані, можливість візуального контролю за її станом, охолоджувальну дію, що попереджує розвиток гноєтворної інфекції, створення на рані вологого середовища, оптимального для нормалізації процесів регенерації; вони розм'якшують і лізують некротичні утвори, сприяють елімінації ексудату, пригніченню мікрофлори. Створення таких гідрогелевих покриттів можливе на основі ПВП, модифікованого зоєм полікремнієвої кислоти.

Метою даної роботи було дослідження іммобілізації лізоциму в ПВП та його модифіковану форму для створення полімерних плівкових покриттів як потенціальних лікарських препаратів пролонгованої антибактеріальної дії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. У роботі використовували лізоцим білка курячого яйця (Appli-Chem), папаїн (Merck), лужну протеазу, протеазу С (НВО "Ензим", м. Ладижин) з питомою активністю 25 Од/г, 200 ПО/г, 65 ПО/г, 320 ПО/г ферменту відповідно.

Літичну активність лізоциму визначали за [2] (субстрат – клітини *Micrococcus lysodeikticus*), протеолітичну активність – за модифікованим методом Ансона [5].

За одиницю літичної активності брали таку кількість ферменту, що за 1 хв при 37 °С знижує оптичну густину суспензії клітин *Micrococcus lysodeikticus* на 0,001 при розведенні ферменту, здатного лізувати суспензію клітин на 25-30 %. За одиницю протеолітичної активності

ті – таку кількість ферменту, що за 1 хв при 37 °С каталізує розщеплення казеїну до продуктів, що не осаджуються трихлороцтовою кислотою, вміст яких виражено в мікромолях тирозину. Вміст білка контролювали методом Лоурі-Хартрі [9].

Імобілізацію лізоциму проводили з використанням 7,7 % розчину ПВП (молекулярна маса – $2 \cdot 10^6$) та одночасно з модифікацією ПВП [4]: розраховану масу ферменту 10 і 12 мг додавали до розчинів ПВП і ПВП та модифікатора відповідно із застосуванням пластифікаторів (гліцерину та триетиленгліколю). Після перемішування розчини виливали в форми, висушували при кімнатній температурі; з модифікованим носієм – до вмісту води 45 %, герметично пакували, піддавали γ -стерилізації дозами 5-15 кГр. В'язкість розчинів ПВП визначали за допомогою віскозиметра Оствальда з діаметром капіляра 0,73 мм [1].

ІЧ-спектри модифікованого ПВП знімали у твердих плівках і таблетках KBr на спектрофотометрі Specord IR 75.

Для вивчення залежності літичної активності лізоциму від рН рівні за активністю проби іммобілізованого і вільного ферменту інкубували у відповідних буферних розчинах (рН= 3,0-7,0) з наступним визначенням активності. Вплив температури на активність вільного й іммобілізованого лізоциму вивчали в діапазоні від 10 до 90 °С. Для вивчення термостабільності рівні за активністю проби термостатували при 50 °С і визначали залишкову активність з інтервалом 10-20 хв.

З метою визначення рН-стабільності лізоциму інкубували рівні за активністю проби вільного та іммобілізованого ферменту в 0,066 моль/дм³ Na-фосфатному буферному розчині при рН=5,5, температурі 37 °С протягом 6 год, літичну активність визначали кожні 30 хв.

Термостабільність ферментного препарату визначали шляхом інкубації рівних за активністю проб лізоциму у відповідному буферному розчині (рН=6,4) при температурі 80 °С протягом 6 год, літичну активність визначали кожні 30 хв.

Комбіновані плівкові покриття отримували з додаванням до 7,7 % розчину ПВП або його модифікованої форми розрахованої кількості лізоциму та протеаз (папаїну, лужної протеази, протеази С) у співвідношенні лізоцим: протеаза – 1:1, 1:3, 1:5 і 1:10. Після додавання пластифікатора та перемішування розчини виливали у форми, герметично пакували та піддавали γ -стерилізації.

Константи швидкості інактивації обчислювали з використанням кінетичної схеми дисоціативної термоінактивації для іммобілізованого

препарату і за тангенсом кута нахилу прямої графіка залежності натурального логарифма величини залишкової активності від часу методом лінійної регресії для вільного. Кінетику лізису клітин мікроорганізмів вільним та іммобілізованим лізоцимом визначали за початковою швидкістю лізису клітин *Microsoccus lysodeikticus*. На основі отриманих даних про початкову швидкість лізису субстрату будували графік у координатах Хейнса. Методом найменших квадратів визначили тангенс кута нахилу, який чисельно дорівнює $1/V_{\max}$, точка перетину екстрапольованої прямої з віссю Y дорівнює $K_m/V_{\max}$, точка перетину з віссю X – K_m .

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Матриці для іммобілізації представлені співробітниками Московської державної академії тонкої хімічної технології ім. М.В. Ломоносова. Модифікований ПВП являє собою органо-неорганічний гібрид – продукт сполучення кремнієвмісної речовини і високомолекулярного ПВП у цілісну структуру. Слід зазначити, що модифікований ПВП втрачає здатність розчинятися у воді, що дозволяє одержати нерозчинні покриття.

Отриманню модифікованої матриці сприяють численні водневі зв'язки між киснем карбонільної групи лактамного кільця полі-N-вінілпіролідону і воднем силанольної групи золю полікремнієвої кислоти, що підтверджено методом ІЧ-спектроскопії. В ІЧ-спектрах модифікованого ПВП спостерігаються зменшення інтенсивності смуги поглинання 3750 см⁻¹, що характеризує вільні силанольні групи, і поява широкої смуги з максимумом близько 3350 см⁻¹, що відповідає утворенню водневого зв'язку між силанольною групою і киснем карбонільної групи лактамного кільця полі-N-вінілпіролідону.

При дослідженні впливу масових співвідношень носій:фермент показано високе збереження літичної активності в їх діапазоні для ПВП – 1:0,001-1:0,1, для модифікованої матриці – 1:0,002-1:0,02 (табл. 1).

У результаті іммобілізації лізоциму в ПВП та ПВП, модифікований золем полікремнієвої кислоти з концентрацією ферменту, що відповідає його застосуванню при експериментальному лікуванні ран [2], отримано полімерні безбарвні, прозорі й еластичні плівкові покриття з кількісним включенням ферменту та 100 і 80 % збереженням вихідної активності відповідно впродовж 1 року зберігання при 4 °С; гідрогелеві покриття модифікованого носія з лізоцимом (вміст води 45 %) були нерозчинними при фізіологічних значеннях рН (табл. 2).

Дослідження властивостей іммобілізованого препарату, порівняно з вільним, показало

розширення його рН-оптимумів у ділянку лужних значень рН, що пов'язано із стабілізуючим впливом носіїв (рис. 1).

Відмічено зростання рН-стабільності лізоциму, іммобілізованого в ПВП і його модифікованій формі, в умовах ранового вмісту (рН=5,5; t=7 °C), який зберігає 100 % вихідної активності протягом 5 та 8 год відповідно (рис. 2). Через добу відзначено 60,1 % збереження активності вільного ферменту; іммобілізований у ПВП та модифікований полімер лізоцим проявляв 70,3 і 100 % вихідну активність відповідно, забезпечуючи тим самим пролонговану бактеріолітичну дію.

Залежності літичної активності вільної та іммобілізованих форм ферменту від температури не зазнали суттєвих змін, однак показано (табл. 3) значне підвищення термостабільності лізоциму, іммобілізованого в ПВП: константи термоінактивації становили, відповідно, $7,43 \cdot 10^{-4} \text{ хв}^{-1}$ і $1,89 \cdot 10^{-3} \text{ хв}^{-1}$ для вільного та іммобілізованого ферменту. При включенні в модифіковану матрицю константа термоінактивації незначно зростала, що може пояснюватися впливом деструктивних змін носія в умовах підвищеної температури.

Досліджено, що для вільного лізоциму K_m становила $0,653 \text{ г/дм}^3$, V_{max} – $227,3 \cdot 10^6 \text{ Од/г/хв}$

(див. табл. 3); щодо лізоциму, іммобілізованого в ПВП та ПВП, модифікований зоєм двоокису кремнію, спостерігалися зростання K_m і зниження V_{max} , які можуть змінюватися внаслідок дифузійних обмежень, що зумовлені полімерною матрицею (рис. 3).

Результати проведених досліджень свідчать про стабілізацію модифікованих форм лізоциму, яка здійснюється за рахунок його взаємодії з макромолекулами носіїв, що підтверджується зміною значень наведеної в'язкості розчинів ПВП та модифікованого ПВП з ферментом (рис. 4), це вказує на зниження конформаційної рухомості глобули білка; однак можливим є фізичне включення у структуру ПВП та ПВП, модифікованого зоєм полікремнієвої кислоти.

У ході роботи було отримано комбіновані плівкові покриття комплексної дії з лізоцимом та протеазами на основі досліджених матриць, які володіють антибактеріальними властивостями та здатні лізувати некротичні тканини, що прискорює загоєння ран. При сумісній іммобілізації лізоциму та протеаз у ПВП спостерігалось значне підвищення його літичної активності, вона зростала зі збільшенням співвідношення протеаза:лізоцим і становила до 150 % при іммобілізації з лужною протеазою

Таблиця 1 – Вплив масового співвідношення матриця:лізоцим на літичну активність іммобілізованого ферменту

Масове співвідношення ПВП:лізоцим	Активність лізоциму, % від вих.	Масове співвідношення модифікований ПВП:лізоцим	Активність лізоциму, % від вих.
1:0,001	100,0	1:0,002	81,7
1:0,05	100,0	1:0,004	80,0
1:0,1	98,9	1:0,02	80,0
1:0,5	52,4	1:0,1	37,1

Таблиця 2 – Характеристики плівкових покриттів з лізоцимом

Показники	Характеристики	
	ПВП	Модифікований ПВП
Літична активність, Од/г іммоб. препарату	200000±4000	36360±2000
Вміст ферменту, мг/г іммоб. препарату	10,0±0,3	2,2±0,12
Діаметр, см	9,1±0,3	9,1±0,3
Товщина, мм	0,35	2,5±0,04
Середня маса, г	1±0,035	5,5±0,37
Візуальні характеристики	Безбарвні, прозорі	Безбарвні, прозорі
Розчинність у воді, хв	180±5,7	Нерозчинні
Розчинність у фіз. розчині, хв	193±6,0	
Вміст води, %	5,0±0,7	46,0±5

Таблиця 3 – Константи термоінактивації та кінетичні параметри лізису клітин вільного й іммобілізованого лізоциму

Лізоцим	K_d , хв^{-1}	K_m , г/дм^3	V_{max} , $\cdot 10^6 \text{ Од/г/хв}$
Вільний	$1,89 \cdot 10^{-3}$	0,652	227,3
Іммобілізований у ПВП	$7,43 \cdot 10^{-4}$	0,808	166,7
Іммобілізований у ПВП, модифікований зоєм SiO_2	$3,40 \cdot 10^{-3}$	0,804	212,8

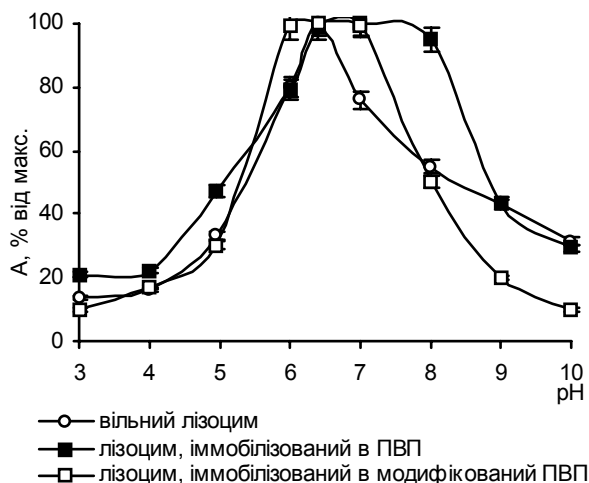


Рис. 1. Залежність літичної активності вільного та іммобілізованого лізоциму від pH інкубаційного середовища.

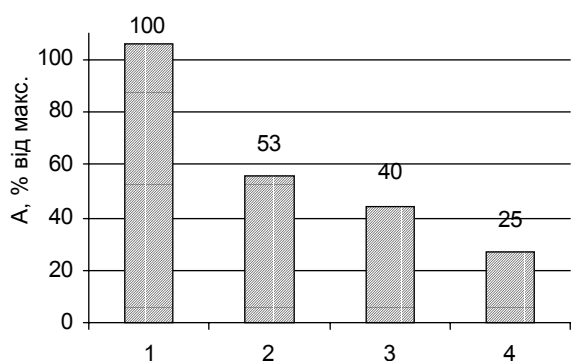


Рис. 3. Залежність літичної активності лізоциму, іммобілізованого в модифікований ПВП, від дози γ -опромінювання: 1 – нестерилізовані плівки; 2 – 5 кГр; 3 – 10 кГр; 4 – 15 кГр.

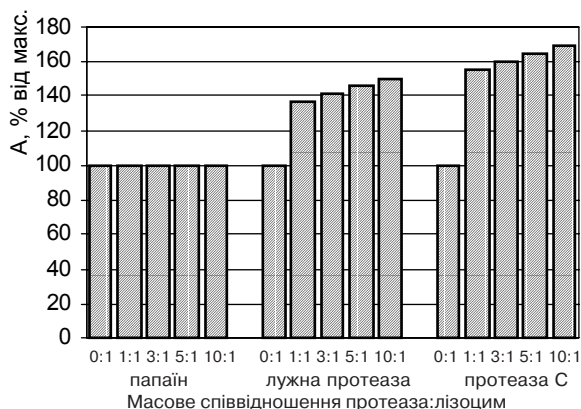


Рис. 5. Підвищення літичної активності лізоциму при сумісній іммобілізації з протеазами залежно від їх масових співвідношень.

і 169 % з протеазою С (рис. 5), тоді як протеолітична активність протеаз залишалася на високому рівні (80 %). Такі результати спостерігалися і при іммобілізації в модифіковану матрицю. Цей ефект, можливо, пояснюється специфічністю досліджуваних протеаз мікробного походження (використання рослинної

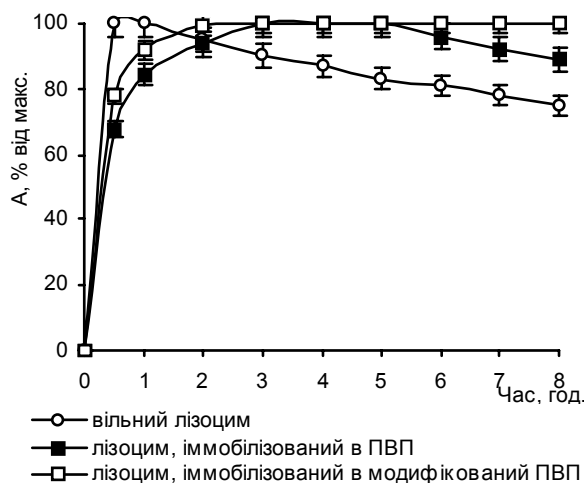


Рис. 2. Залежність літичної активності вільного та іммобілізованого лізоциму від часу інкубації при pH 5,5.

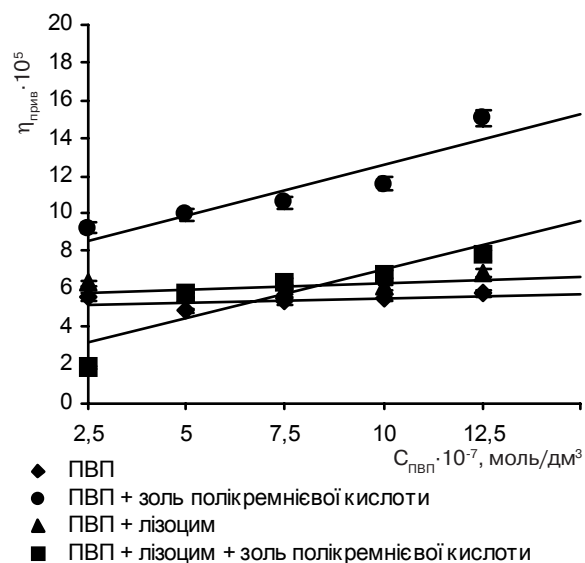


Рис. 4. Залежність наведеної в'язкості розчинів ПВП від його концентрації.

протеази – папаїну не викликало зростання літичної активності) до пептидних субодиноць пептидоглікану клітин бактерій.

ВИСНОВКИ. На основі ПВП і ПВП, модифікованого золем полікремнієвої кислоти, було отримано плівкові покриття з іммобілізованим лізоцимом з високим збереженням (80-100 %) бактеріолітичної активності після іммобілізації та при зберіганні протягом 1 року, підвищеною pH- і термостабільністю, пролонгованою дією. Взаємодію матриць та ферменту підтверджено методом віскозиметрії. При сумісній іммобілізації лізоциму з протеазами мікробного походження одержано плівки комбінованої дії (бактеріолітичної і протеолітичної) із значно підвищеною літичною активністю (в 1,5-1,7 раза) та високим збереженням (80 %) протеолітичної активності.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бартенев Г.М., Френкель С.Я. Физика полимеров. – Л.: Химия, 1990. – 432 с.
2. Власов Л.Г., Толстых П.И., Гнатюк Т.Е. и др. Получение иммобилизованного на текстильных носителях лизоцима и его применение для лечения гнойных ран // Антибиотики и химиотерапия. – 1988. – № 11. – С. 848-850.
3. Немцова Н.Н., Вальхичина М.Н. О модификации лизоцима водорастворимым полимером "Совиаль" // Хим.-фарм. журн. – 1987. – **21**, № 7. – С. 782-785.
4. Пат. РФ 2198685 С1 Медицинский полимерный гелевый материал и лечебные средства на его основе / И.И. Пашкин, В.Ю. Богачев, В.П. Зубов. – № 2001134048/14; Заявл. 18.12.2001; Опубл. 20.02.2003.
5. Польшалина Г.В., Черенченко В.С., Римаева Л.В. Определение активности ферментов. – М.: ДеЛи принт, 2003. – С. 230-231.
6. Черкасов И.А., Кравченко Н.А., Павловский П.Е. и др. Исследование ферментативных свойств иммобилизованного лизоцима // Биоорг. химия. – 1975. – **1**, № 1. – С. 50-55.
7. Черкасов И.А., Кравченко Н.А., Павловский П.Е. и др. Получение и свойства лизоцима, иммобилизованного на силихроме // Биоорг. химия. – 1976. – **2**, № 10. – С. 1422-1428.
8. Ayako K., Toshizumi T. Keratin Sponge: Immobilization of lysozyme // J. Bioscience and Bioengineering. – 2003. – № 3. – Р. 307-309.
9. Hartree E.E. Determination of protein: modification of the Lowry method that gives a linear photometric response // Anal. Biochem. – 1972. – **48**, № 1. – Р. 422-427.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ЛИЗОЦИМА В ПОЛИ-N-ВИНИЛПИРРОЛИДОН

И.И. Романовская

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. А.В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ, ОДЕССА

Резюме

Изучена иммобилизация лизоцима в поли-N-винилпирролидон и поли-N-винилпирролидон, модифицированный золев поликремниевой кислоты. Взаимодействие матриц и фермента подтверждено методом вискозиметрии. Разработаны условия иммобилизации лизоцима в исследуемые матрицы; получены препараты с высокой (80-100 %) бактериолитической активностью после иммобилизации и при хранении на протяжении 1 года, расширенными рН-оптимумами, повышенной рН- и термостабильностью, пролонгированного действия. Показан дозозависимый эффект γ -облучения на активность гидрогелевых пленок с лизоцимом на основе модифицированной матрицы. Установлено значительное повышение литической активности пленок (в 1,5-1,7 раз) при совместной иммобилизации лизоцима с протеазами в исследуемые матрицы в условиях высокого (80 %) сохранения протеолитической активности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лизоцим, иммобилизация, поли-N-винилпирролидон, поликремниевая кислота, протеазы, пленки.

LYSOCYME IMMOBILIZATION IN POLY-N-VINYL PYRROLIDONE

I.I. Romanovska

PHYSICAL-CHEMICAL INSTITUTE BY O.V. BOHATSKY OF NAS OF UKRAINE, ODESSA

Summary

The lysocyme immobilization in poly-N-vinyl pyrrolidone and poly-N-vinyl pyrrolidone, modified by polysilicic acid sol, was studied. The interaction of matrices and enzyme was confirmed by the method of viscosimetry. The conditions of lysocyme immobilization in the studied matrices were developed; the preparations with high (80-100 %) bacteriolytic activity after immobilization and at 1 year-storage were obtained, the widened pH-optima, increased pH- and thermostability. The dose-dependent effect of γ -irradiation on the hydrogel films activity with lysocyme, based on modified matrice, was shown. The significant enhancement of the lytic activity of films (1,5-1,7-fold) at joint immobilization of lysocyme with proteases in the studied matrices, with high (80 %) retaining of proteolytic activity was established.

KEY WORDS: lysocyme, immobilization, poly-N-vinyl pyrrolidone, polysilicic acid, proteases, films.

Отримано 12.04.2007 р.

Адреса для листування: І.І. Романовська, Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна.

ОСОБЛИВОСТІ ФАРМАКОКІНЕТИКИ ЕТАНОЛУ В ОРГАНІЗМІ БІЛИХ МИШЕЙ

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

Головним завданням роботи стало вивчення фармакокінетичних параметрів етанолу в організмі білих мишей за умов його внутрішньовенного та інтрагастрального введення. Розподіл етанолу в плазмі крові та печінці експериментальних тварин має біфазний характер. Оцінка залежності "доза – концентрація – час" та "концентрація – час" дала змогу визначити основні фармакокінетичні показники, що відтворюють біодоступність, метаболізм та елімінацію етанолу. Було встановлено, що в плазму крові надходить приблизно до 70 % введеної дози (біодоступність). Отримані статистично достовірні результати дають можливість стверджувати, що первинне проходження і метаболізм етанолу в кишечнику експериментальних тварин мають складний характер. При інтрагастральному введенні етанолу процес його елімінації з організму перебігає з досить високою швидкістю (період напіввиведення $t_{1/2}$ складає 3,5 год).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: $1\text{-}^{14}\text{C}$ -етанол, рідинна сцинтиляційна фотометрія, біодоступність, фармакокінетичні параметри, метаболізм.

ВСТУП. Деяка токсична та фармакологічна дія етанолу пов'язана з його метаболітами, насамперед ацетальдегідом [14]. Відомі [4, 5] токсичні ефекти ацетальдегіду, що реалізуються на різних рівнях: поведінковому (аверсія), фізіологічному (абстиненція), біохімічному (накопичення токсичних альдегідів, активація перекисного окиснення ліпідів, утворення адуктів з амінокислотами, білками та катехоламінами), морфологічному (хроматоліз базофільної речовини, дистрофічна зміна клітин глії і т. ін.). Окрім того, етанол є фармакологічним агентом, що проявляє анкіолітичну, седативну та протисудомну дії [8, 15].

Метаболізм етанолу має місце в основному в печінці [11]. На першому етапі він перетворюється в ацетальдегід (оцтовий альдегід). У нормі ця реакція каталізується трьома різними ферментними системами [10]: 1) алкогольдегідрогеназою; 2) мікросомальною етанол-окисною системою (МЕОС); 3) каталазою. На другому етапі ацетальдегід окиснюється до оцтової кислоти за допомогою НАД-залежної альдегіддегідрогенази.

При звичайних дозах (низьких) швидкість окиснення етанолу відповідає кінетиці нульового порядку, тобто не залежить від часу та концентрації сполуки [7]. Збільшення доз спричиняє виникнення так званого ефекту пер-

винного проходження [6]. Він характерний для речовин, що метаболізуються в печінці, й може бути зареєстрованим при порівнюванні АUC в крові за умов їх внутрішньовенного та інтрагастрального введення в еквівалентних дозах [13]. Останнім часом висловлено припущення, що ефект первинного проходження має місце і в тому випадку, коли етанол окиснюється в шлунково-кишковому тракті [12]. Однак питання про співвідношення між концентраціями етанолу в плазмі крові при обох шляхах введення та залежність його від ефекту первинного проходження, викликаного ферментами печінки і шлунково-кишкового тракту, висвітлено в науковій літературі недостатньо. Тому завданням нашої роботи стало вивчення фармакокінетичних параметрів етанолу в організмі білих мишей за умов його внутрішньовенного та інтрагастрального введення. Оцінка залежності "доза – концентрація – час" та "концентрація – час" дає змогу визначити основні фармакокінетичні показники, що відтворюють біодоступність, метаболізм та елімінацію етанолу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Попередню валідацію методу визначення етанолу методом рідинної сцинтиляційної фотометрії проводили методом "внесено – знайдено" [2]. Відповідний об'єм плазми крові та гомогенат печінки вносили в сцинтиляційні флакони, додавали $0,5\cdot 10^{-3}$ см³

© М.Я. Головенко, І.Ю. Борисюк, В.Б. Ларіонов, О.Б. Ліхота, 2007.

Тритону X-100, заливали толуольно-спиртовим сцинтилятором (10 см³) і визначали вміст радіоактивних продуктів на приладі Canberra Packard TRI-CARB 2700.

Дослідження проводили на білих безпородних мишах-самцях масою 18-22 г. Розчин 1-¹⁴C-етанолу (активність – 3 Кю/моль (11 ГБк/моль)) в дозах 5, 10, 15, 20, 40 мМоль/кг вводили внутрішньовенно та інтрагастрально, через відповідні відрізки часу (0,083; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 6 год) тварин декапітували, збирали кров у попередньо гепаринізовані центрифужні пробірки та центрифугували при 4000 об./хв. В аліквоті (0,2 см³) плазми крові визначали загальний вміст радіоактивного матеріалу. Вміст радіоактивного матеріалу в печінці визначали в аліквоті гомогенату (0,2 см³) після попередньої гомогенізації 1:4 (маса-об'єм) 0,9 % NaCl. Для цього додавали 0,5⁻¹ см³ Тритону X-100 та 10 см³ толуольно-спиртового сцинтилятора.

Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики за допомогою програми MS Excel. Фармакокінетичні параметри було розраховано згідно з [3].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Попереднє визначення точності методу кількісного визначення етанолу в плазмі крові та гомогенатах печінки показало (табл. 1), що використанням рідинної сцинтиляційної фотометрії досягається 95-102 % оцінки внесеної (в діапазоні концентрацій) сполуки. Це свідчить про можливість отримання достовірних фармакокінетичних показників у межах валідованого методу.

Етанол не розчиняється в олії та жирах, але, як і вода, добре проникає крізь біологічні мембрани. Очевидно, сполука використовує при цьому крізьклітинний та міжклітинний шляхи транспорту [1].

Розподіл етанолу в плазмі крові та печінці експериментальних тварин має біфазний характер (рис. 1), швидка фаза триває приблизно 2 год при обох шляхах введення. При інтрагастральному введенні, як і при внутрішньовенному, відмічено паралельність зміни концентрації етанолу в плазмі крові, що підтверджено близькими значеннями (недостовірні відзнаки показників). Це дає можливість припустити незмінність загальної картини розпо-

Таблиця 1 – Визначення вмісту ¹⁴C-етанолу в плазмі крові та печінці в модельних дослідках (валідація методу)

Внесено, мМоль	Визначено, мМоль		Визначено, %	
	Плазма крові	Печінка	Плазма крові	Печінка
0,096±0,002	0,098±0,003	0,102±0,002	102±3,7	106,3±3,5
0,164±0,003	0,159±0,003	0,162±0,002	96,6±2,5	98,5±1,9
0,286±0,003	0,283±0,006	0,274±0,028	99,1±2,4	95,7±9,9
0,586±0,015	0,566±0,015	0,575±0,015	96,6±3,5	98,2±3,6

Таблиця 2 – Значення фармакокінетичних параметрів етанолу в плазмі крові при внутрішньовенному та інтрагастральному введенні (20 мМоль/кг)

Фармакокінетичні параметри	Внутрішньовенне введення	Інтрагастральне введення
Передекспоненційний коефіцієнт, A	24,7±1,8	15,8±1,4
Комплексний параметр α-фази, α	1,228±0,075	2,879±0,18
Передекспоненційний коефіцієнт, B	10,2±0,5	9,9±0,8
Комплексний параметр β-фази, β	0,151±0,005	0,197±0,011
Константа швидкості перенесення з периферичної камери в центральну, k ₂₁ , год ⁻¹	0,47±0,053	1,23±0,181
Константа елімінації з центральної камери, k ₁₃ , год ⁻¹	0,40±0,053	0,46±0,078
Константа швидкості перенесення з центральної камери в периферичну, k ₁₂ , год ⁻¹	1,60±0,301	1,82±0,434
Кінетичний об'єм розподілу, V _c , см ³ /кг	575,3±60,0	651±69
Об'єм розподілу периферичної камери, V _p , см ³ /кг	1517±190	1389±381
Стаціонарний об'єм розподілу, V _{dss} , см ³ /кг	2550±646	1689±1096
Загальний кліренс, Cl, ·кг	228±58	349±242
Період напіврозподілу, t _{α1/2} , год	0,6±0,03	0,2±0,02
Період напівелімінації, t _{β1/2} , год	4,6±0,2	3,5±0,2
Загальна площа під фармакокінетичною кривою, AUC, мкМоль/ см ³ ·год	85,1±7,9	56,2±9,5
Середній час перебування, MRT, год	5,5±0,62	4,7±1,07
Співвідношення площ під фармакокінетичними кривими, f	–	0,66±0,13

ділу етанолу незалежно від способу його введення. Відмічено відсутність висхідної частини фармакокінетичної кривої при інтрагастральному введенні, що зумовлено високою швидкістю всмоктування етанолу в організмі. Для печінки спостерігається дещо інша картина. Це зумовлено тим, що етанол розподіляється в організмі залежно від вмісту води в тому чи іншому органі або тканині. Рівновага концентрації етанолу між кров'ю та печінкою залежить від швидкості кровотоку, маси тканини та спроможності сполуки зв'язуватися з білками. Доведено [5], що етанол не має в крові білка, з яким може утворювати комплекс. Крім того, він не кумулює в печінці, незважаючи на те, що надходить туди в значній кількості. Співвідношення концентрацій етанолу в печінці й крові складає 3,5, що узгоджено з роботою [9].

Фармакокінетичні параметри проникнення та елімінації етанолу з плазми крові представлено в таблиці 2. Двофазний характер розподілу етанолу підтверджено високим значенням об'єму розподілу периферичної камери ($(1517 \pm 190) \text{ см}^3$). Недостовірна відмінність величини об'єму периферичного відсіку для плазми крові та відсутність петлі гистерезису дають можливість віднести плазму крові до центрального відсіку кінетичної схеми, припускаючи лінійність фармакокінетичних процесів, що перебігають. Дещо великий об'єм розподілу периферичної камери при інтрагастральному введенні для плазми крові ($(1389 \pm 381) \text{ см}^3$) зумовлений, можливо, більш рівномірним розподілом етанолу в організмі при даному способі введення і меншою швидкістю елімінації з центральної камери (k_{13} складає $(0,46 \pm 0,078) \text{ год}^{-1}$). Також досить великий стаціонарний об'єм розподілу етанолу (приблизно 2550 см^3) при внутрішньовенному вве-

денні свідчить про високий ступінь його надходження в периферичний відсік організму. Це підтверджено і константою перенесення із центральної камери в периферичну (k_{12} складає для плазми крові $(1,60 \pm 0,301)$ і $(1,82 \pm 0,434) \text{ год}^{-1}$ при внутрішньовенному та інтрагастральному шляхах введення відповідно). Разом із тим, обмін між центральною та периферичною камерами перебігає досить інтенсивно (константа перенесення етанолу для плазми крові з периферичної камери в центральну k_{21} складає $(0,47 \pm 0,053)$ при внутрішньовенному введенні й $(1,23 \pm 0,181) \text{ год}^{-1}$ при інтрагастральному). Процес елімінації етанолу з організму перебігає з досить високою швидкістю при інтрагастральному введенні (період напіввиведення $t_{\beta 1/2}$ становить 3,5 год). Визначений позамоделним методом (методом статистичних моментів) середній час перебування (MRT) етанолу в організмі при внутрішньовенному введенні складає приблизно 5 год.

При співвідношенні площ під кривими "концентрація – час" за умов внутрішньовенного та інтрагастрального введення було встановлено, що в плазму крові надходить приблизно до 70 % введеної дози. Також під час зіставлення площ під фармакокінетичними кривими відмічено різницю при внутрішньовенному та інтрагастральному введенні. З огляду на отримані результати, можна припустити метаболізм етанолу в кишечнику експериментальних тварин. Для того щоб підтвердити припущення, нами були проведені дослідження залежності "доза – концентрація" при інтрагастральному введенні.

Інтрагастральне введення етанолу в різних дозах (5-40 мМоль/кг) протягом 1 год (рис. 2) свідчить про те, що всмоктування сполуки (шлунково-кишковий тракт/плазма крові) та

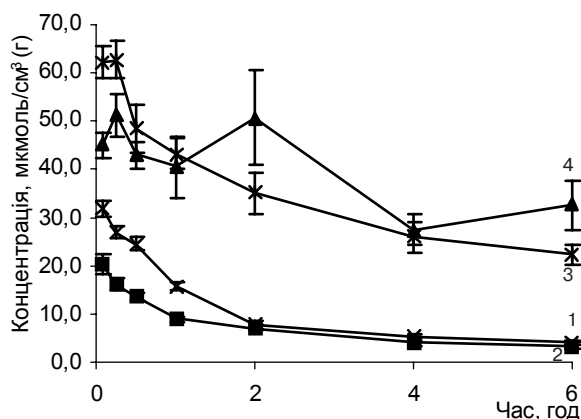


Рис. 1. Зміна концентрації ^{14}C -етанолу в плазмі крові (1, 2) і печінці (3, 4) при внутрішньовенному (1, 3) та інтрагастральному (2, 4) введенні (20 мМоль/кг).

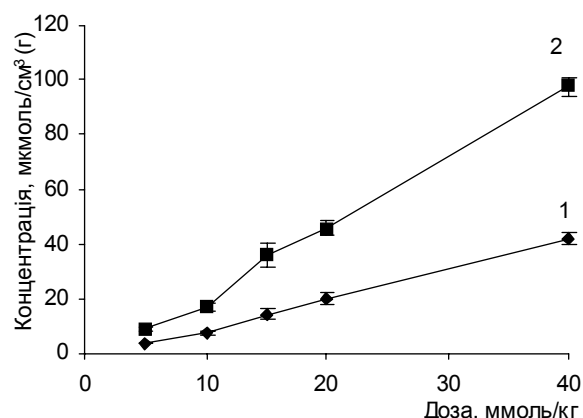


Рис. 2. Вміст ^{14}C -етанолу в плазмі крові (1) та печінці (2) залежно від введеної дози (мМоль/кг) при інтрагастральному введенні.

розподіл (плазма крові/печінка) мають однаковий характер (лінійний) і ці процеси не залежать від дози. Це суперечить даним [13], згідно з якими збільшення навантаження на організм людини алкоголем призводить до нелінійності процесу його всмоктування, що пояснюється насиченням алкогольдегідрогенази субстратом і підпорядковане рівнянню Міхаеліса-Ментен. Можливо, така зміна має місце в тому випадку, коли етанол вводиться в організм в інтермітуючому режимі. З іншого боку, ця розбіжність між дослідями з визначення AUC при внутрішньовенному та інтрагастральному введенні (наявність ефекту першого проходження) та "доза-концентрація" (відсутність ефекту) свідчать про те, що в наших експериментах облік концентрації був проведений на

основі аналізу ^{14}C , який є в молекулі етанолу (субстрату) й ацетальдегіду (продукту реакції). Імовірно, незначні відмінності у фізико-хімічних властивостях обох сполук роблять їх аналогічними в процесах дифузії (міжклітинний та крізьклітинний транспорт).

ВИСНОВКИ. 1. Площа під кривою "концентрація-час" (AUC) етанолу при його інтрагастральному та внутрішньовенному введенні значно відрізняється.

2. Залежність "доза-концентрація" етанолу (плазма крові, печінка) має лінійний характер.

3. При інтрагастральному введенні етанолу мишам його проникнення через біологічні мембрани та між клітинами здійснюється шляхом простої дифузії у вигляді спирту та ацетальдегіду.

ЛІТЕРАТУРА

1. Головенко Н.Я. Физико-химическая фармакология. – Одесса: Астропринт, 2004. – 720 с.
2. Головенко Н.Я., Зиньковский В.Г. Сравнительная фармакокинетика и метаболизм феназепама в организме различных видов экспериментальных животных // В кн.: Феназепам. – К.: Наукова думка, 1982. – С. 32-87.
3. Холодов Л.Е., Дорохов В.В. Автоматизированная система программ индивидуального дозирования (АСПИД) для расчета фармакокинетических параметров и анализа связи между концентрацией и фармакологическим эффектом // Фармакол. и токсикол. – 1985. – **48**, № 4. – С. 65-69.
4. Brien J.F., Loomis C.W. Pharmacology of acetaldehyde // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1983. – **61**. – P. 1-22.
5. Charles S., Lieber M.D. Alcohol and the liver. Metabolism of alcohol and its role in hepatic and extra-hepatic diseases // The Mount Sinai Journals of Medicine. – 2000. – **67**, № 1. – P. 84-94.
6. Kwan K.C. Oral bioavailability and first-pass effects // Drug Metabol. Dispos. – 1997. – **25**, № 12. – P. 1329-1336.
7. Levit D. PKQuest: measurement of intestinal absorption and first pass metabolism – application to human ethanol pharmacokinetics // BMC Clinical Pharmacology. – 2002. – **2**, № 4. – P. 40-62.
8. Nutt D., Peters T. Alcohol: the drug // British Medical Bulletin. – 1994. – **50**. – P. 5-17.

9. Pastino G., Sultatos L., Flynn E. Development and application of physiologically based pharmacokinetic model for ethanol in the mice // Alcohol and Alcoholism. – 1996. – **31**, № 4. – P. 365-374.

10. Riveros-Rosas H., Julian-Sanches A., Pina E. Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals // Arch. Med. Res. – 1997. – **28**. – P. 453-471.

11. Umulis D., Giirmen N., Singh P. A physiology based model for ethanol and acetaldehyde metabolism in human beings // Alcohol. – 2005. – **35**. – P. 3-12.

12. Vanghan D., Trainor A. A general equation for the ratio of the areas below the blood or plasma concentration time-curves following intravenous and oral drug administration and application in drug elimination // Br. J. Clin. Pharmacol. – 1975. – **2**, № 3. – P. 239-250.

13. Wagner J.G., Wilkinson P., Ganes D. Parameters V_m and K_m for elimination of alcohol in young male subjects // Alcohol and Alcoholism. – 1989. – **24**. – P. 555-564.

14. Wilkinson P.K. Pharmacokinetics of ethanol: a review // Alcohol Clin. Exp. Res. – 1980. – **4**, № 1. – P. 6-21.

15. Zhuk O., Zinkovsky V., Golovenko N. The pharmacodynamics of anticonvulsant and subconvulsant effects of ethanol in CBA and C57BL/6 mice // Alcohol. – 2001. – **23**. – P. 23-28.

ОСОБЕННОСТИ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ЭТАНОЛА В ОРГАНИЗМЕ БЕЛЫХ МЫШЕЙ

Н.Я. Головенко, И.Ю. Борисюк, В.Б. Ларионов, Е.Б. Лихота
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ ИМ. А.В. БОГАТСКОГО НАН УКРАИНЫ, ОДЕССА

Резюме

Главным заданием работы стало изучение фармакокинетических параметров этанола в организме белых мышей при внутривенном и интрагастральном его введении. Распределение этанола в плазме крови и печени экспериментальных животных имеет бифазный характер. Оценка зависимости "доза – концентрация – время" и "концентрация – время" дала возможность определить основные фармакокинетические показатели, которые отображают биодоступность, метаболизм и элиминацию этанола. Было установлено, что в плазму крови поступает приблизительно до 70 % введенной дозы (биодоступность). Полученные статистически достоверные результаты дают возможность утверждать, что первичное прохождение и метаболизм этанола в кишечнике экспериментальных животных имеют сложный характер. При интрагастральном введении этанола процесс его элиминации с организма протекает с достаточно высокой скоростью (период полувыведения $t_{1/2}$ составляет 3,5 год).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: $1-^{14}\text{C}$ -этанол, жидкостная сцинтилляционная фотометрия, биодоступность, фармакокинетические параметры, метаболизм.

FEATURES OF PHARMACOKINETICS OF ETHANOL IN THE ORGANISM OF WHITE MICE

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

Summary

The studies of pharmacokinetic parameters of ethanol in the organism of white mice under conditions of intravenous and oral administration became the basic purpose of this work. Distribution of ethanol in plasma and liver of experimental animal has biphasic character. Evaluation of dependence "dose – concentration – time" and "concentration – time" gave an opportunity to determine features of pharmacokinetic parameters, which display bioavailability, metabolism and elimination of ethanol. In plasma approximately 70 % from the administrated dose of ethanol was determined. Received statistically authentic results prove the complex process of ethanol primary transition and metabolism of ethanol in intestine of experimental animals. Oral administration of ethanol is characterized by high elimination rate (time of half-elimination $t_{1/2}$ is 3,5 hours).

KEY WORDS: $1-^{14}\text{C}$ -ethanol, liquid scintillation photometry, bioavailability, pharmacokinetic parameters, metabolism.

Отримано 12.04.2007 р.

Адреса для листування: М.Я. Головенко, Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна.

Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua

**БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ДЕЯКИХ S-(ХІНОЛІН-4-ІЛ)
ЗАМІЩЕНИХ ЦИСТЕЇНУ**

М.М. Корнет, О.А. Бражко, М.П. Завгородній, Л.О. Омелянчик
ЗАПОРІЗЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Досліджено деякі фізико-хімічні властивості S-(хінолін-4-іл)заміщених цистеїну, які синтезовано в лабораторії фізіологічно активних речовин Запорізького національного університету. Їх будову підтверджено даними елементного аналізу, ПМР-, ІЧ- та мас-спектроскопії, чистоту контролювали методом тонкошарової хроматографії. Встановлено, що досліджені сполуки малотоксичні або не токсичні за класифікацією К.К. Сидорова, не проявляють цитотоксичності відносно рослин, деякі сполуки мають слабку бактеріостатичну дію.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гостра токсичність, цитотоксичність, антимікробна активність, S-(хінолін-4-іл)заміщені цистеїну.

ВСТУП. Завжди актуальною є тема пошуку ефективних біологічно активних речовин для можливого їх застосування як лікарських препаратів, пестицидів, регуляторів росту рослин тощо. Інтерес викликає дослідження нових сполук, що поєднують в собі декілька біологічно активних структур. Таке поєднання може зумовити посилення біологічної активності цих комбінованих сполук або появу нових властивостей. Моделювання природних біорегуляторів призвело до створення антимікробних, протипухлинних, фунгістичних засобів – антибіотиків, сульфаніламідних препаратів тощо [1, 2, 6, 8]. Цікавим є поєднання в одній структурі гетероциклу (хіноліну) та сірковмісної амінокислоти (цистеїну).

В арсеналі сучасної медицини існує багато ефективних лікарських засобів із групи похідних хіноліну (хінозол, нітроксолін, ентоеросептол, фторхінолони тощо). Відомі препарати, що проявляють протипухлинну, анальгетичну, фунгістатичну, антиоксидантну дії, але перш за все похідні хіноліну є антимікробними та протипаразитними препаратами [3, 4, 9, 10].

Не менш цікава і структура L(-)-цистеїну, що є сильним природним антиоксидантом, входить до складу білків та бере участь у багатьох важливих біохімічних процесах. За допомогою цистеїну та створених на його основі препаратів проводять лікування багатьох захворювань –

астми, хвороби Альцгеймера, анемії, бронхітів та пневмоній, циститів, його застосовують для поліпшення функції зору, при алкоголізмі, інтоксикації важкими металами тощо [12, 13, 14].

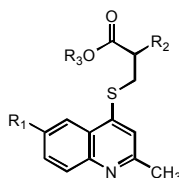
Прогнозування біологічної активності досліджуваних сполук S-(хінолін-4-іл) заміщених цистеїну за допомогою комп'ютерної програми PASS (Prediction of Activity spectra for Substances) показало перспективність отримання речовин з антимікробною, антиоксидантною, антивиразковою, протиішемичною, радіопротекторною, нейротропною діями [3].

Метою даної роботи було дослідження біологічної активності ряду похідних S-(хінолін-4-іл)заміщених цистеїну та їх аналогів (вивчення гострої токсичності, антимікробної та цитотоксичної дії), впливу замісників у 6 положенні структури хіноліну на прояв біологічної активності.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Сполуки, що досліджувались, наведено в таблиці 1.

Нові гетероциклічні сполуки досліджували на гостру токсичність, цитотоксичність та антимікробну активність.

Гостру токсичність досліджуваних сполук вивчали на інтактних безпородних мишах-самцях масою 18-23 г. Речовини вводили внутрішньочеревно у вигляді тонкої водної суспензії. Гостру токсичність встановлювали за допомогою табличного експрес-методу визначення середніх ефективних мір впливу на біологічні об'єкти за В.Б. Прозоровським [11].

Таблиця 1 – **S-(хінолін-4-іл)** заміщені цистеїну та їх аналоги

№ спо-луки		Емпірична формула	Молекулярна маса	Температура, °C	Хроматографічний аналіз (Silufol, UV=254, CAVALIER, Czechoslovakia)
					Оцтова кислота:вода (1:1)
1	R ₁ =H, R ₂ =NH ₂ , R ₃ =H	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	262,33	t _{nn} =197	Rf=0,63
2	R ₁ =H, R ₂ =NH ₂ , R ₃ =Na	C ₁₃ H ₁₃ N ₂ NaO ₂ S	284,31	t _{pos} =210 t _{nn} =105	Rf=0,61
3	R ₁ =Cl, R ₂ =NH ₂ , R ₃ =H	C ₁₃ H ₁₃ ClN ₂ O ₂ S	296,77	t _{nn} =224	Rf=0,50 Rf=0,64
4	R ₁ =Cl, R ₂ =NH ₂ , R ₃ =Na	C ₁₃ H ₁₂ ClN ₂ NaO ₂ S	318,75	t _{pos} =223-225	Rf=0,47
5	R ₁ =Br, R ₂ =NH ₂ , R ₃ =H	C ₁₃ H ₁₃ BrN ₂ O ₂ S	341,22	t _{pos} =212 t _{nn} =218	Rf=0,70
6	R ₁ =Br, R ₂ =NH ₂ , R ₃ =Na	C ₁₃ H ₁₂ BrN ₂ NaO ₂ S	363,21	t _{nn} =190-193	Rf=0,61
7	R ₁ = OCH ₃ , R ₂ =NH ₂ , R ₃ =H	C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	292,35	t _{pos} =185 t _{nn} =190	Rf=0,47
8	R ₁ = OCH ₃ , R ₂ =NH ₂ , R ₃ =Na	C ₁₄ H ₁₅ N ₂ NaO ₃ S	314,34	t _{nn} =205	Rf=0,44 Rf=0,62
9	R ₁ =H, R ₂ =H, R ₃ =H	C ₁₃ H ₁₃ NO ₂ S	247,31	t _{nn} =163-165	Rf=0,65
10	R ₁ =H, R ₂ =H, R ₃ =Na	C ₁₃ H ₁₂ NNaO ₂ S	269,29	t _{nn} =235	Rf=0,59
11	R ₁ =Cl, R ₂ =H, R ₃ =H	C ₁₃ H ₁₂ ClNO ₂ S	281,76	t _{pos} =173-175 t _{nn} =183	Rf=0,67
12	R ₁ =Cl, R ₂ =H, R ₃ =Na	C ₁₃ H ₁₁ ClNNaO ₂ S	303,74	t _{pos} =290	Rf=0,61
13	R ₁ =Br, R ₂ =H, R ₃ =H	C ₁₃ H ₁₂ BrNO ₂ S	326,21	t _{pos} =208-211 t _{nn} =213	Rf=0,66
14	R ₁ =Br, R ₂ =H, R ₃ =Na	C ₁₃ H ₁₁ BrNNaO ₂ S	348,19	t _{pos} =255 t _{nn} =288	Rf=0,57
15	R ₁ = OCH ₃ , R ₂ =H, R ₃ =H	C ₁₄ H ₁₅ NO ₃ S	277,34	t _{nn} =226-228	Rf=0,34
16	R ₁ = OCH ₃ , R ₂ =H, R ₃ =Na	C ₁₄ H ₁₄ NNaO ₃ S	299,32	t _{nn} =262-264	Rf=0,31

Цитотоксичність синтезованих сполук вивчали в кореновому тесті на паростках р. *Sisymbrium* sp. (під час дослідів використовували огірки сорту "Конкурент"). Розчини сполук, які тестували, з концентрацією 1, 5, 20, 100, 500 мг/л додавали по 10 мл у чашки Петрі, в яких було по 15 насінин. Для кожної концентрації та контрольного експерименту (вода) застосовували по дві чашки. Чашки з насінням витримували при 30 °C у темряві протягом 72 год, після чого вимірювали довжину гіпокотилу, головного кореня, зони росту бічних коренів та кількість бічних коренів. Цитотоксичність сполук оцінювали за зменшенням зазначених параметрів в експерименті порівняно з контролем. Цитотоксичність речовин досліджували тільки на солях, що пов'язано з їх кращою водорозчинністю. Найбільш цікаві результати представлено у формі графіків (2-5), на яких відображена залежність вимірюваних показників від концентрації. Показники контролю (вода) взято за нуль [7].

Дослідження антимікробної активності сполук проводили *in vitro* за методикою серійних двократних розведень у рідкому поживному середовищі (бульйон Хотінгера) [5]. Експерименти виконували на 4 штаммах бактерій, з них 2 граммпозитивні (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) та 2 грамнегативні (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) культури. Мікробне навантаження готували відповідно до оптичного стандарту мутності, воно складало 500 тисяч мікробних тіл в 1 мл добової культури бактерій. Пробірки із сумішшю ставили в термостат при t=37 °C на 18-24 год. Облік проводили двічі (через 24 та 48 год). Результати оцінювали залежно від інтенсивності пригнічення росту тієї чи іншої культури бактерій речовиною.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Вивчення гострої токсичності нових сполук дало можливість віднести їх до малотоксичних (100-1000 мг/кг) та нетоксичних (>1000 мг/кг).

Виняток становив натрію 3-(2-метилхінолін-4-ілтію)-2-амінопропіонат (сполука 2), який виявився високотоксичною сполукою (LD_{50} – 69 мг/кг). Введення замісників у кільце хіноліну зменшувало токсичність сполук. Зниження токсичності спостерігалось в ряді замісників $H > Cl > OCH_3 > Br$ (для 2-амінопропанових кислот та амінопропіонатів – сполуки 1-8) та ряді $Cl > Br > H > OCH_3$ (для пропанових кислот і пропіонатів – сполуки 9-16).

Солі, порівняно з кислотами, проявляють більш токсичну дію, що можна пояснити їх кращою розчинністю у воді.

При порівнюванні 2-амінопропанових кислот і 2-амінопропіонатів з пропановими кислотами та пропіонатами було виявлено, що останні відносно більш токсичні.

Дослідження цитотоксичності сполук показало, що сполуки, які не мали замісника в 6 положенні структури хіноліну (сполуки 2 та 10),

проявляли певну закономірність – найменші (1, 5 мг/л) та найвищі (100, 500 мг/л) концентрації значно знижували показники вимірюваних параметрів (від 10 до 60 %) порівняно з контролем, середні (20 мг/л) концентрації сполук, навпаки, мали стимулювальний ефект зростання показників.

При введенні в 6-те положення структури хіноліну атома хлору (рис. 1, 2, 4) спостерігалось певне збільшення негативного впливу пропіонатів порівняно з 2-амінопропіонатами. Необхідно підкреслити, що ця тенденція мала місце і при дослідженні токсичності даних сполук.

Введення в 6-те положення ядра хіноліну бром не призводило до цитотоксичності. Привертає до себе увагу те, що низькі концентрації сполук зумовлювали інгібування росту порівняно з контролем (на 15-40 % менше за показники контролю), а при підвищенні концентрації сполуки поступово спостерігався їх ріст.

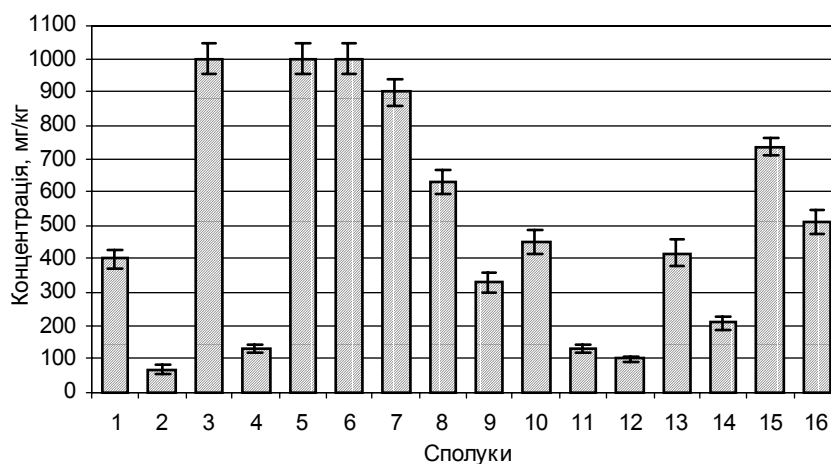


Рис. 1. Результати визначення гострої токсичності похідних S-гетерилзаміщених L-цистеїну та його аналогів.

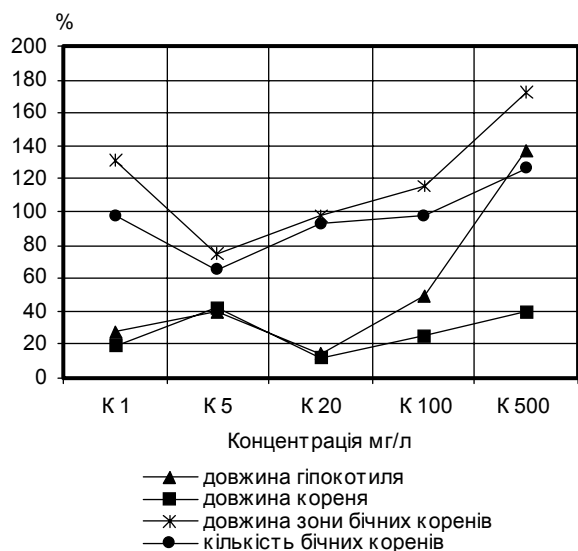


Рис. 2. Вплив натрію 3-(6-хлор-2-метилхінолін-4-ілтію)-2-амінопропіонату (сполука 4) на поділ та ріст клітин паростків р. *Cucumis* sp.

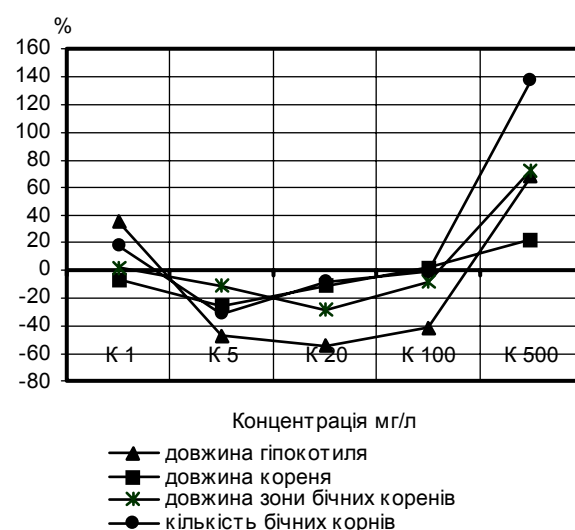


Рис. 3. Вплив натрію 3-(6-метокси-2-метилхінолін-4-ілтію)-2-амінопропіонату (сполука 8) на поділ та ріст клітин паростків р. *Cucumis*.

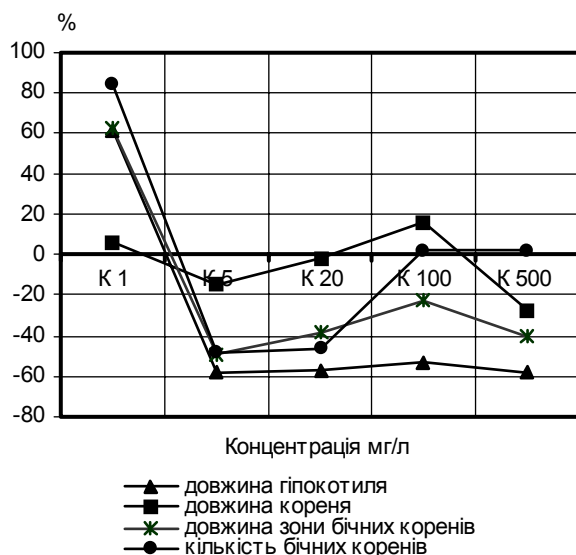


Рис. 4. Вплив натрію 3-(6-хлор-2-метилхінолін-4-ілтіо)пропіонату (сполука 12) на поділ та ріст клітин паростків р. *Cuscutis* sp.

Цікаві результати демонстрували сполуки з метоксигрупою в 6-му положенні структури хіноліну (рис. 3, 5). Відсутність аміногрупи в залишку амінокислоти (сполука 16) мала більш позитивний ефект для підвищення показників росту порівняно зі сполукою з аміногрупою (сполука 8).

Результати дослідження антимікробної дії сполук показали, що тільки при концентрації 200 мг/мл деякі сполуки проявляють бактеріостатичну дію. Більший вплив на мікроорганізми мають 2-амінопропанові кислоти і 2-амінопропіонати порівняно з пропановими кислотами і пропіонатами. Введення атома хлору або бром у 6-те положення хіноліну призводить до підвищення активності сполук, а метоксигрупи – до зниження антимікробної активності порівняно зі сполуками без замісника.

ВИСНОВКИ. 1. Визначення гострої токсичності S-(хінолін-4-іл)заміщених цистеїну та їх аналогів показало, що сполуки, згідно з класи-

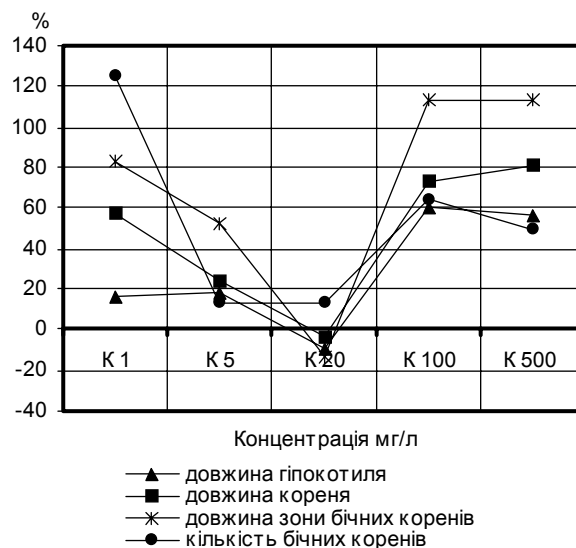


Рис. 5. Вплив натрію 3-(6-метокси-2-метилхінолін-4-ілтіо)пропіонату (сполука 16) на поділ та ріст клітин паростків р. *Cuscutis* sp.

фікацією К.К. Сидорова, є малотоксичними або нетоксичними.

2. Досліджено вплив похідних хіноліну на ріст та розвиток рослинних клітин (цитотоксичність). Встановлено, що сполуки без замісника в 6-му положенні структури хіноліну мають тенденцію до збільшення показників порівняно з контролем, середніми концентраціями. При введенні атома хлору в 6-те положення спостерігається збільшення цитотоксичності пропіонатів порівняно з 2-амінопропіонатами, метоксигрупа стимулює зростання показників.

3. Дослідження антимікробної активності показало, що сполуки проявляють слабку антимікробну активність: кислоти є активнішими за солі, а 2-амінопропанові кислоти активніші, ніж пропанові, також введення атома хлору або бром у 6-те положення структури хіноліну збільшує антимікробну активність, а метоксигрупи – призводить до зниження цієї дії порівняно зі сполуками без замісника.

ЛІТЕРАТУРА

1. Альберт А. Избирательная токсичность. Физико-химические основы терапии. – М.: Медицина, 1989. – 300 с.
2. Арзамасцев А.П. Основные направления создания и оценки качества лекарственных средств // Вопр. биол. и фармац. химии. – 2001. – № 4. – С. 3-5.
3. Бражко О.А. Біологічна активність похідних хіноліну та акридину з азото- та сірковмісними функціональними групами: Дис... д-ра біол. наук. – К., 2005. – 456 с.

4. Бражко О.А. Пошук біологічно активних речовин серед 2- і 4-тіопохідних хіноліну // Вісник Запорізького державного університету. – 2003. – № 1. – С. 120-126.

5. Бригер Е.Б., Ведьмина Е.А., Володoveц В.В. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам. – М.: Медицина, 1982. – 452 с.

6. Вижевский А.Н. Разработка эффективных антимикробных препаратов комбинированного типа // Актуальні проблеми клінічної фармакології (Пер-

спективи розвитку науки і викладання): І Українська наукова конференція за участю країн СНД. – Вінниця, 1993. – С. 99-100.

7. Иванов В.Б. Клеточные основы роста растений. – М.: Наука, 1982. – 185 С.

8. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. – 14-е изд. – М.: ООО "Изд-во Новая Волна", 2000. – Т. 2. – 608 с.

9. Молева В.І. Біологічна дія та антимікробна активність гетероциклічних похідних хіноліну // Клін. фармація. – 1997. – 1, № 1. – С. 32-35.

10. Омелянчик Л.О., Бражко О.А., Беленічев І.Ф. Дослідження біологічної дії 4-тіопохідних хіноліну // Мед. хімія. – 2001. – 3, № 1. – С. 20-23.

11. Прозоровский В.Б. Табличный экспресс-

метод определения средних эффективных мер воздействия на биологические объекты // Токсикол. вестник. – 1998. – № 1. – С. 28-32.

12. Сидоров К.К. О классификации токсичности ядов при паренатальных способах введения // Токсикология новых промышленных веществ. – 1973. – № 13. – С. 47-51.

13. Tiriq M., Morais C., Sobki S. et al. N-acetylcysteine attenuates cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats // Nephrol. Dial. Transplant. – 1999. – 14, № 4. – P. 923-929.

14. Yosof M., Yildiz D., Ercal N. N-acetyl-L-cysteine protects against delta-aminolevulinic acid-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation // Toxicol. Lett. – 1999. – 106, № 1. – P. 41-47.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ S-(ХИНОЛИН-4-ИЛ) ЗАМЕЩЕННЫХ ЦИСТЕИНА

М.Н. Корнет, А.А. Бражко, М.П. Завгородний, Л.А. Омелянчик
ЗАПОРОЖСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Исследованы некоторые физико-химические свойства S-(хинолин-4-ил) замещенных цистеина, синтезированных в лаборатории физиологически активных веществ Запорожского национального университета. Их структуру подтверждено данными элементного анализа, ПМР-, ИЧ- и масс-спектропии, чистоту контролировали методом тонкослойной хроматографии. Установлено, что исследованные соединения малотоксичны или не токсичны за классификацией К.К. Сидорова, не проявляют цитотоксичности по отношению к растениям, некоторые соединения имеют слабое бактериостатическое действие.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: острая токсичность, цитотоксичность, антимикробная активность, S-(хинолин-4-ил)замещенные цистеина.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF SOME S-(CHINOLIN-4-IL)SUBSTITUTES OF CYSTEIN

М.М. Kornet, O.A. Brazhko, M.P. Zavorodniy, L.O. Omelyanchyk
ZAPORZHYAN NATIONAL UNIVERSITY

Summary

Some physico-chemical characteristics of S-(chinolin-4-il) substitutes of cystein, synthesized in laboratory of the physiologically active substances of Zaporizhyan National were studied University. Their structure was confirmed by data element analysis, PMR-, IR spectroscopy, mass- spectroscopy, purity was tested by the method of thin-layer chromatography. It was realized that explored compounds show low toxicity or they are not toxic according to K.K. Sydorov's classification, they do not show cytotoxicity to plants, some compounds have weak bacteriostatic activity.

KEY WORDS: acute toxicity, cytotoxicity, bacteriostatic activity, S-(chinolin-4-il) substitutes of cystein.

Отримано 23.04.2007 р.

Адреса для листування: М.М. Корнет, Запорізький національний університет, пр. Маяковського, 26, Запоріжжя, 69035, Україна.

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ПРОТЕОЛІЗУ, ФІБРИНОЛІЗУ ТА ПЕРЕКИСНОГО ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ У КІРКОВІЙ РЕЧОВИНІ НИРОК ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

А.О. Міхєєв, Є.М. Горбань

БУКОВИНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ЧЕРНІВЦІ
ІНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ, КИЇВ

В інтактних лабораторних щурів різного віку – молодих (2-3 міс.), дорослих (5-7 міс.) і старих (18-20 міс.) – виявлено вікові особливості перебігу процесів перекисного окиснення ліпідів, необмеженого протеолізу і фібринолізу в тканині нирок, а також встановлено вікові особливості активності антиоксидантних ферментів. Отримані результати свідчать про відмінності перебігу цих процесів у нирковій тканині в різні вікові періоди, що може суттєво впливати на взаємодію нирок із ксенобіотиками і повинно враховуватись при проведенні токсикологічних досліджень.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нирки, вік, протеоліз, фібриноліз, перекисне окиснення ліпідів.

ВСТУП. Обмін речовин та енергії досить повно вивчено у дорослої людини, організм якої перебуває у стані відносної рівноваги із зовнішнім середовищем. У дитячому та старечому віці біохімічні процеси змінюються, при цьому енергопластичне забезпечення організму зазнає кількісних та якісних змін [2, 9]. Тому за сучасних екологічних умов особливого значення набуває визначення вікових особливостей реакції організму, його клітин, тканин, органів і систем на поліплютантне навантаження. Це стосується, зокрема, функції нирок та водно-сольового обміну, оскільки нирки є одним з основних органів виведення ксенобіотиків з організму [6].

Відомо, що ферментативна активність ниркової тканини у лабораторних щурів істотно відрізняється залежно від віку. В старих тварин у мембранах щіткової облямівки проксимального каналця істотно знижується активність ендопептидази [КФ 3.4.21.16] [13]. У 18-місячних щурів у клубочках нирок збільшується вміст супероксиданіона, пероксиду водню та каталази [КФ 1.11.1.6] поряд із зростанням вмісту продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою [14]. З віком у тканинах органів щурів (печінка, серце) спостерігається підвищення активності глутатіонредуктази [КФ 1.6.4.1], глутатіонпероксидази [КФ 1.11.1.9],

© А.О. Міхєєв, Є.М. Горбань, 2007.

каталази [КФ 1.11.1.6] за зниження активності супероксиддисмутази [КФ 1.15.1.1] [15]. Встановлено циркадіанну організацію фібринолітичної та протеолітичної активності тканин органів, зокрема нирок [1]. Проте в літературі відсутні дані про перебіг процесів ліпопероксидації, протеолітичну та фібринолітичну активність тканини нирок щурів різного віку, хоча відомо, що перебіг цих біохімічних процесів істотно впливає на функціонування нирок та підтримання гомеостазу [7].

Тому метою нашої роботи було дослідження та зіставлення перебігу процесів протеолізу, фібринолізу та перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у кірковій речовині нирок інтактних щурів різного віку.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти виконано на 45 білих безпородних щурах-самцях трьох вікових груп: молодих (2-3 міс., маса тіла – 60-80 г), статевозрілих (5-7 міс., маса тіла – 120-180 г) і старих (18-20 міс., маса тіла – 350-450 г).

Евтаназію тваринам проводили під легкою ефірною анестезією. Нирки забирали та заморожували у рідкому азоті. З кіркової речовини готували гомогенати – 120 мг кіркової речовини у 1,2 мл 0,05 М Трис-НСІ буфера (рН-7,4).

Стан ПОЛ у тканині кіркової речовини нирок оцінювали за рівнем малонового діальдегіду

(МДА) [8] та дієнових кон'югат (ДК) [3]. Крім того, визначали активність ферментів анти-оксидантного захисту – каталази (Кат) [КФ 1.11.1.6] [4], супероксиддисмутази (СОД) [КФ 1.15.1.1] [10] та глутатіонпероксидази (ГПО) [КФ 1.11.1.9] [5]. Рівень білка у кірковій тканині нирок визначали за методом Лоурі [12].

Стан ферментативного та неферментативного фібринолізу оцінювали за рівнем лізису азофібрину ("Simko Ltd.", Львів). Внаслідок лізису азофібрину за наявності ϵ -амінокапронової кислоти як інгібітора ферментативного фібринолізу визначався неферментативний фібриноліз, а за її відсутності – сумарний фібриноліз. Різниця між цими показниками відображала стан ферментативного фібринолізу. За аналогічною методикою вивчали стан протеолітичної активності на основі результатів реакцій з азоальбуміном, азоказеїном та азоколом.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Дослідження перебігу процесів ліпопероксидації у тканині кіркової речовини нирок тварин усіх вікових груп не виявили змін вмісту ДК (табл. 1), тоді як рівень МДА зростав на 158 % ($p < 0,01$) у дорослих порівняно з молодими тваринами,

а у старих знижувався на 20 % ($p < 0,001$) відносно рівня у молодих щурів та на 50 % ($p < 0,01$) відносно рівня у дорослих щурів.

Рівень білка у кірковій речовині нирок з віком практично не змінювався, а активність СОД знижувалась на 21 % у дорослих та на 19 % у старих тварин порівняно з молодими. Активність Кат була найвищою у молодих щурів, а активність ГПО кіркової речовини нирок зростала у дорослих на 169 % та знижувалась у старих на 30 % ($p < 0,05$).

У дорослих щурів у кірковій речовині нирок, порівняно з молодими, зростав лізис низькомолекулярних білків, величина якого у старих щурів дещо знижувалась (табл. 2). Колагеназна активність зростала у дорослих тварин втричі (на 309 %, $p < 0,001$) і залишалась високою у старих щурів (273 % від рівня молодих тварин, $p < 0,001$). Лізис високомолекулярних білків, навпаки, з віком починав знижуватися – у дорослих на 21 % ($p < 0,01$) порівняно з молодими, у старих на 33 % ($p < 0,001$) порівняно з молодими тваринами та на 15 % ($p < 0,01$) порівняно з дорослими щурами.

Активність тканинної фібринолітичної системи була найвищою у дорослих щурів. Зростав сумарний фібриноліз на 138 % ($p < 0,05$),

Таблиця 1 – Перекисне окиснення ліпідів у кірковій речовині нирок щурів різного віку ($x \pm Sx$)

Показники	Вікові групи тварин		
	Молоді, n=15	Дорослі, n=15	Старі, n=15
Дієнові кон'югати, нмоль/мг білка	0,45 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,05	0,47 $\pm$ 0,05
Малоновий діальдегід, нмоль/мг білка	0,65 $\pm$ 0,04	1,03 $\pm$ 0,12*	0,52 $\pm$ 0,05*#
Білок за Лоурі, мг/г тканини	176,33 $\pm$ 6,11	200,68 $\pm$ 18,29	170,91 $\pm$ 11,89
Супероксиддисмутаза, Од/хв/мг білка	0,23 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,02
Глутатіонпероксидаза, мкмоль G-HS/хв/мг білка	0,26 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,07	0,23 $\pm$ 0,03*
Каталаза, мкмоль/хв/мг білка	25,19 $\pm$ 0,83	16,58 $\pm$ 1,35*	17,63 $\pm$ 1,04*

Примітка. n – кількість спостережень;

* – відмінність показників вірогідна порівняно з молодими тваринами;

– відмінність показників вірогідна порівняно з дорослими тваринами.

Таблиця 2 – Стан необмеженого протеолізу та фібринолізу кіркової речовини нирок щурів різного віку ($x \pm Sx$)

Показники	Вікові групи тварин		
	Молоді, n=15	Дорослі, n=15	Старі, n=15
Протеоліз за азоальбуміном, E_{440} /год/г тканини	51,75 $\pm$ 3,39	59,57 $\pm$ 1,14*	56,33 $\pm$ 5,38
Протеоліз за азоколом, E_{440} /год/г тканини	3,32 $\pm$ 0,23	10,29 $\pm$ 0,77*	9,08 $\pm$ 0,86*
Протеоліз за азоказеїном, E_{440} /год/г тканини	69,40 $\pm$ 3,44	54,33 $\pm$ 3,11*	46,12 $\pm$ 2,41*#
Сумарний фібриноліз, E_{440} /год/г тканини	86,66 $\pm$ 4,99	120,28 $\pm$ 12,25*	64,72 $\pm$ 4,90*#
Неферментативний фібриноліз, E_{440} /год/г тканини	23,61 $\pm$ 1,85	46,76 $\pm$ 5,19*	33,25 $\pm$ 3,98*#
Ферментативний фібриноліз, E_{440} /год/г тканини	63,05 $\pm$ 4,69	73,53 $\pm$ 14,52	31,48 $\pm$ 6,94*#

Примітка. n – кількість спостережень;

* – відмінність показників вірогідна порівняно з молодими тваринами;

– відмінність показників вірогідна порівняно з дорослими тваринами.

в основному за рахунок підвищення рівня неензиматичного розщеплення фібрину (на 198 %, $p < 0,001$). У старих тварин показники рівня фібринолізу кіркової речовини нирок були різко знижені порівняно як з дорослими, так і з молодими щурами.

З огляду на отримані дані, можна зробити такі висновки. Активність антиоксидантних ферментів у кірковій речовині нирок підвищується в дорослому віці, що забезпечує стійкий захист від пероксидної модифікації ліпідів мембран клітин та їх ефективне функціонування. Зниження цієї активності з віком є наслідком вікових змін, що в кінцевому результаті призводить до дистрофії епітелію каналців, гіпертрофії із розростанням сполучної тканини та до зміни функціонування ниркових клітин.

Зростання рівня процесів необмеженого протеолізу в кірковій речовині нирок щурів сягає максимуму в дорослому віці, особливо це стосується лізису білків різної молекулярної

маси із стійким підвищенням колагеназної активності впродовж усього періоду спостереження. Це свідчить про підвищення з віком рівня процесів катаболізму білка у кірковій речовині нирок. Крім того, максимуму в дорослому віці сягає також і тканинна фібринолітична активність, що забезпечує ефективне розщеплення новоутвореного фібрину в ниркових каналцях. Зниження її рівня у старих тварин може призводити до відкладання фібрину в ниркових структурах з наступним фібриноїдним переродженням тканини [11].

ВИСНОВКИ. Виявлені зміни перебігу біохімічних процесів у кірковій речовині нирок інтактних щурів різного віку можуть істотно впливати на функціональний стан нирок. Це, у свою чергу, впливатиме на взаємодію нирок з різноманітними ксенобіотиками та повинно враховуватися при проведенні токсикологічних досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бойчук Т.М. Біоритми тканинного фібринолізу // Експерим. та клін. фізіол. та біохім. – 1998. – № 1. – С. 16-21.
2. Вельтищев Ю.Е., Ермолаев М.В., Ананенко А.А., Князев Ю.А. Обмен веществ у детей. – М.: Медицина, 1983. – 464 с.
3. Гаврилов В.Б., Мишкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33-35.
4. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-18.
5. Мещишен И.Ф. Механизм действия четвертичных аммониевых соединений (этония, тиония, додекония и их производных) на обмен веществ в норме и патологии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.04 – биохимия. – К., 1991. – 37 с.
6. Наточин Ю.В. Основы физиологии почки. – Л.: Медицина, 1982. – 208 с.
7. Рябов С.И., Наточин Ю.В. Функциональная нефрология. – С.Пб.: Лань, 1997. – 304 с.
8. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
9. Фролькис В.В. Физиологические механизмы старения. – К.: Наукова думка, 1982. – 320 с.
10. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678-681.
11. Kafner A. Role of coagulation in glomerular injury // Toxicol. Lett. – 1989. – **46**, № 1-3. – P. 81-93.
12. Lowry O.H., Rosebrough N.I., Parr A.L., Randall R.I. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – **193**, № 1. – P. 265-275.
13. Reckelhoff J.F., Baylis C. Proximal tubular metalloprotease activity is decreased in the senescent rat kidney // Life Sci. – 1992. – **50**, № 13. – P. 959-963.
14. Ruiz-Torres P., Lucio J., Gonzales-Rubio M. et al. Oxidant/antioxidant balance in isolated glomeruli and cultured mesangium cells // Free Rad. Biol. and Med. – 1997. – **22**, № 1-2. – P. 49-56.
15. Tian L.Q., Cai Q.Y., Wei H.C. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage of macromolecules in different organs of rats during aging // Free Rad. Biol. Med. – 1998. – **24**, № 9. – P. 1477-1484.

ОСОБЕННОСТИ ТЕЧЕНИЯ ПРОТЕОЛИЗА, ФИБРИНОЛИЗА И ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ В КОРКОВОМ ВЕЩЕСТВЕ ПОЧЕК КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

А.А. Михеев, Е.Н. Горбань

БУКОВИНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ЧЕРНОВЦЫ
ИНСТИТУТ ГЕРОНТОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ, КИЕВ

Резюме

У интактных лабораторных крыс разного возраста – молодых (2-3 мес.), взрослых (5-7 мес.) и старых (18-20 мес.) – обнаружены возрастные особенности протекания процессов перекисного окисления липидов, неограниченного протеолиза и фибринолиза в ткани почек, а также установлены возрастные особенности активности антиоксидантных ферментов. Полученные результаты свидетельствуют об отличиях протекания этих процессов в почечной ткани в различные возрастные периоды, что может существенно влиять на взаимодействие почек с ксенобиотиками и должно учитываться при проведении токсикологических исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: почки, возраст, протеолиз, фибринолиз, перекисное окисление липидов.

PECULIARITIES OF PROTEOLYSIS, FIBRINOLYSIS AND LIPID PEROXIDATION IN RENAL CORTICAL SUBSTANCE AT DIFFERENT-AGED RATS

A.O. Mikheev, Ye.M. Horban

BUCOVYNIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY, CHERNIVTSI
INSTITUTE OF GERONTOLOGY OF AMS OF UKRAINE, KYIV

Summary

In intact laboratory rats of different age: young (2-3 mon), adult (5-7 mon) and old (18-20 mon) the peculiarities of lipid peroxidation, unlimited proteolysis and renal tissue fibrinolysis processes were detected and the age peculiarities of antioxidant enzymes activity were determined as well. The obtained results prove the differences of these processes course in renal tissue during different life periods, that can significantly influence the renal interactions with xenobiotics and must be taken into account during the toxicological investigations.

KEY WORDS: kidneys, age, proteolysis, fibrinolysis, lipid peroxidation.

Отримано 11.04.2007 р.

Адреса для листування: А.О. Михеев, Буковинський державний медичний університет, вул. Чапаса 43А/48, Чернівці, 58022, Україна.

Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua

ГЕПАТОТОКСИЧНІ ПРОЯВИ ЛАНСОПРАЗОЛУ, МЕТРОНІДАЗОЛУ І КЛАРИТРОМІЦИНУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

В.В. Підгірний

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

В експерименті на здорових білих щурах вивчено гепатотоксичні прояви метронідазолу, лансопразолу і кларитроміцину. Встановлено, що введення цих препаратів супроводжується активацією перекисного окиснення ліпідів, порушенням антиоксидантного захисту, цитолітичним синдромом, зниженням у печінці вмісту глікогену. Виявлені зміни нарастають із збільшенням медикаментозного навантаження на печінку і досягають максимуму після поєднаного введення усіх трьох препаратів. Отримані результати свідчать про необхідність розробки методів підвищення резистентності печінки в комплексному лікуванні хворих на виразкову хворобу шлунка і дванадцятипалої кишки, що вимагає поглибленого доклінічного вивчення.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гепатотоксичність, противиразкові препарати.

ВСТУП. Незважаючи на значні досягнення в лікуванні хворих на виразкову хворобу шлунка і дванадцятипалої кишки (ВХ), питанню побічної дії противиразкових препаратів приділяється недостатня увага. Висока клінічна ефективність сучасних засобів терапії ВХ відкидає на другий план сукупність побічних ефектів, які супроводжують антигелікобактерне лікування. У поодиноких публікаціях наголошується на обережності його застосування при порушенні функції печінки, можливості виникнення гепатиту на тлі використання амоксациліну і метронідазолу, розвитку холестатичного гепатиту після застосування похідних нітроїмідазолу [19], зростанні активності амінотрансфераз після приймання кларитроміцину [5]. Без належного аналізу залишаються такі побічні ефекти, як нудота, біль в епігастральній ділянці, діарея, які, очевидно, пов'язані з порушенням функції органів травлення. Їх частота, за даними різних авторів, складає від 30 до 63 %, а у 3-10 % хворих є причиною відмови від лікування [4, 10].

Гепатотропний вплив противиразкових препаратів потенціюється при поєднаному застосуванні і зумовлений їх біотрансформацією в печінці цитохром-Р-450-асоційованими ферментами, що викликає додаткове напруження детоксикаційної системи гепатоцитів [13, 14, 18].

Розбіжність літературних даних щодо побічної дії препаратів, які використовують для терапії ВХ, їх впливу на печінку зумовлює необхідність проведення спеціального дослідження.

Метою роботи було вивчити в експерименті гепатотоксичні прояви препаратів, які використовують для потрійної терапії ВХ: лансопразолу, метронідазолу і кларитроміцину.

© В.В. Підгірний, 2007.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експерименти виконано на 48 білих нелінійних щурах-самцях масою 170-180 г. Усіх тварин було поділено на 8 груп (по шість тварин у кожній): 1-ша група – контрольна, щурам 2-ї групи внутрішньошлунково вводили метронідазол (МН), 3-ї – лансопразол (ЛП), 4-ї – кларитроміцин (КМ), 5-ї – МН+ЛП, 6-ї – МН+КМ, 7-ї – ЛП+КМ і 8-ї – ЛП+КМ+МН. Дози препаратів відповідали середнім терапевтичним дозам при лікуванні хворих на ВХ: ЛП – 60 мг на добу, КМ і МН – по 1000 мг на добу [13, 17]. Зазначені дози перераховувались на еквівалентні дози для білих щурів [8] і становили для ЛП 5,4 мг·кг⁻¹, КМ і МН – по 90,7 мг·кг⁻¹. ЛП вводили у вигляді желатинової суспензії для запобігання руйнуванню у шлунку. Курс введення склав 7 днів.

В експериментах використовували ЛП торгової марки ЛАНЗА (виробник "Дженом", Індія), МН і КМ – фірми "Здоров'я" (Україна). Дослідження проводили відповідно до Європейської конвенції із захисту лабораторних тварин [16].

На 8-му добу експерименту тварин умертвляли методом швидкої декапітації і забирали кров для визначення біохімічних показників та шматочки печінки для визначення в них вмісту глікогену [7], ТБК-активних продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) [12], дієнових кон'югат (ДК) [11] і SH-груп [15]. У крові визначали загальну пероксидазну активність (ЗПА) [6], у сироватці крові встановлювали концентрацію церулоплазміну (ЦП) [3]. Крім цього, за допомогою наборів реактивів фірми "Lachema" (Czech Republic) у сироватці крові визначали активність аланін- та аспартат-

амінотрансфераз (АлАТ і АсАТ) і вміст загального холестеролу.

Отриманий цифровий матеріал обробляли методом варіаційної статистики з використанням критерію Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Одержані результати показали (табл. 1), що порівняно з контрольною групою під впливом введення окремо МН і ЛП відмічалася тенденція до підвищення вмісту в гомогенаті печінки ТБК-активних продуктів ПОЛ – на 11,0 і 8,9 % відповідно ($p > 0,05$). Після застосування КМ рівень досліджуваного показника статистично достовірно зростав – на 19,3 % ($p < 0,05$). Аналогічне достовірне збільшення вмісту ТБК-активних продуктів ПОЛ відмічалася після застосування комбінацій препаратів по два: МН+ЛП – на 23,9 % ($p < 0,01$), МН+КМ – на 75,7 % ($p < 0,001$), ЛП+КМ – більше ніж у два рази ($p < 0,001$). Найбільше зростання цього показника відмічалася після поєднаного введення одночасно усіх трьох протівиразкових препаратів – у 2,67 рази ($p < 0,001$).

Аналогічно підвищувався у гомогенаті печінки вміст ДК. Звертає на себе увагу той факт, що вже після введення самого МН концентрація цієї речовини статистично достовірно переважала аналогічну контрольної групи (на 17,7 %, $p < 0,05$). ЛП викликав помірне зростання досліджуваного показника ($p > 0,05$). На тлі КМ його величина, порівняно з контролем, зростала на 21,3 % ($p < 0,01$). Ще більше підвищувався вміст ДК у сироватці крові після застосування цих препаратів у комбінаціях по два ($p < 0,001$). Найбільше зростання відмічалася після введення одночасно усіх трьох препаратів – на 55,5 % ($p < 0,001$).

На тлі введення ЛП і КМ окремо та в комбінаціях (МН+ЛП, МН+КМ) відмічалася помірне збільшення вмісту в сироватці крові ЦП, проте результат виявився статистично недостовірним ($p > 0,05$). Після застосування самого МН відзначалося статистично достовірне зростання величини цього показника (на 7,7 %, $p < 0,05$). Призначення комбінації ЛП+КМ супроводжувалося тенденцією до зниження концентрації ЦП у сироватці крові, а після поєднаного введення усіх трьох протівиразкових препаратів рівень цієї речовини статистично достовірно зменшувався (на 7,8 %, $p < 0,05$).

Вміст SH-груп у гомогенаті печінки в комбінаціях препаратів окремо і по два статистично достовірно не змінювався порівняно з контролем, проте на тлі введення усіх трьох препаратів рівень цієї речовини істотно зменшувався (на 12,5 %, $p < 0,01$). Такі відхилення спостерігалися і за величиною ЗПА. Звертає на себе ува-

гу той факт, що на тлі МН величина цього показника істотно зростала (на 10,4 %, $p < 0,05$), проте після введення усіх трьох препаратів статистично достовірно знижувалася (на 20,0 %, $p < 0,01$).

Активність АлАТ і АсАТ у сироватці крові після введення комбінацій досліджуваних препаратів статистично достовірно зростала ($p < 0,01$ – $0,001$). Застосування самого ЛП викликало лише тенденцію до підвищення величин досліджуваних показників. Найбільший ступінь зростання активності АлАТ і АсАТ, порівняно з контрольною групою, відмічався після застосування комбінації усіх трьох протівиразкових препаратів – більше ніж у 3 рази ($p < 0,001$).

Комбіноване введення протівиразкових препаратів зумовлювало також статистично достовірне збільшення вмісту загального холестеролу в сироватці крові: після застосування МН+ЛП – на 11,4 % ($p < 0,05$), МН+КМ – на 19,3 % ($p < 0,01$), ЛП+КМ – на 14,3 % ($p < 0,05$). Введення усіх трьох препаратів викликало найбільше підвищення вмісту досліджуваної речовини – на 38,6 % ($p < 0,001$).

Аналіз вмісту глікогену в печінці показав, що після застосування досліджуваних препаратів його концентрація зменшувалася. Статистично достовірне зниження відмічалася після введення самого МН і МН+КМ – на 8,6 % ($p < 0,05$), ЛП+КМ – на 11,6 % ($p < 0,01$), усіх трьох препаратів – на 13,8 % ($p < 0,001$).

Отримані дані свідчать про те, що внаслідок застосування протівиразкових препаратів настає активація ПОЛ. Помірне зростання ПОЛ, яке відмічається після введення препаратів по одному, перебуває, очевидно, в межах гомеостатичного регулювання і супроводжується стимуляцією антиоксидантного захисту. Останнє знаходить своє підтвердження в одночасному збільшенні вмісту ЦП, ЗПА і тенденції до підвищення концентрації SH-груп. Застосування ЛП, КМ і МН у комбінаціях по два супроводжуються ще більшою активацією вільнорадикального окиснення, яка стає максимальною після застосування усіх трьох препаратів. За цих умов настає виснаження антиоксидантного захисту, яке проявляється істотним зниженням концентрації в сироватці крові ЦП, ЗПА і SH-груп.

Відповідно до мембранної теорії розвитку патологічних процесів, наведені зміни вказують на порушення структури і функції клітинних мембран [1] та зумовлюють цитолітичні порушення, про які свідчать зростання активності амінотрансфераз і підвищення вмісту холестеролу в сироватці крові [2]. У кінцевому результаті введення комбінації з трьох препаратів викликає порушення енергетичних процесів у гепатоцитах, про що свідчить зниження вмісту глікогену в тканині печінки.

Таблиця 1 – Динаміка показників функціонального стану печінки і біохімічних показників крові після введення МН, ЛП і КМ (М±m)

Контроль, n=6	МН, n=6	ЛП, n=6	КМ, n=6	МН+ЛП, n=6	МН+КМ, n=6	ЛП+КМ, n=6	МН+ЛП+КМ, n=6
ТБК-активні продукти ПОЛ, мкмоль·кг ⁻¹							
2,985±0,144	3,312±0,166	3,251±0,112	3,560±0,190	3,698±0,077***	5,246±0,234***	6,123±0,254***	7,980±0,210***
ДК, ум. од·г ⁻¹							
1,410±0,075	1,660±0,072*	1,517±0,060	1,710±0,047**	1,837±0,049***	2,027±0,053***	2,057±0,103***	2,193±0,078***
ЦП, мг·л ⁻¹							
211,8±4,3	228,1±5,6*	217,0±5,2	226,0±4,9	215,0±3,8	220,4±3,1	208,4±5,6	195,3±3,0*
SH-групи, ммоль·кг ⁻¹							
4,128±0,122	4,171±0,104	4,094±0,094	4,155±0,133	3,993±0,156	3,960±0,162	3,889±0,099	3,611±0,104**
ЗПА, mIU							
219,0±4,8	241,9±6,5*	234,3±10,1	238,1±8,8	207,6±6,4	210,5±4,8	207,6±5,4	175,2±8,8**
АлАТ, ммоль·год ⁻¹ ·л ⁻¹							
0,31±0,02	0,42±0,01***	0,35±0,02	0,43±0,02***	0,48±0,02***	0,50±0,4***	0,52±0,05***	0,95±0,05***
АсАТ, ммоль·год ⁻¹ ·л ⁻¹							
1,48±0,07	1,79±0,06**	1,59±0,03	1,74±0,03**	2,12±0,09***	2,20±0,09***	4,53±0,33***	4,62±0,39***
Загальний холестерол, ммоль·л ⁻¹							
1,40±0,04	1,54±0,05	1,36±0,05	1,48±0,04	1,56±0,04*	1,67±0,07*	1,60±0,06*	1,94±0,07***
Глікоген печінки, г·кг ⁻¹							
25,32±0,58	23,14±0,63*	24,87±0,54	24,37±0,36	24,17±0,92	23,14±0,66*	22,37±0,37**	21,83±0,39***

Примітка. * – достовірність відмінностей порівняно з контрольною групою (* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001).

Відповідно до літературних даних [9], отримані відхилення можна трактувати як прояви гепатотоксичного впливу, вони вказують на необхідність застосування гепатопротекторів у комплексному лікуванні хворих на ВХ, що вимагає подальшого поглибленого доклінічного вивчення.

ВИСНОВКИ. 1. Поєднане застосування метронідазолу, лансопразолу і кларитроміцину у здорових білих щурів супроводжується активацією перекисного окиснення ліпідів, виснаженням антиоксидантного захисту, цитолітичним синдромом і зниженням вмісту глікогену в печінці.

2. Встановлені відхилення біохімічних показників на тлі застосування противиразкових препаратів є проявами їх гепатотоксичної дії, які наростають із збільшенням медикаментозного навантаження на печінку і досягають максимуму після поєднаного введення усіх трьох препаратів.

3. Отримані результати свідчать про необхідність подальшого дослідження гепатотоксичного впливу противиразкових препаратів і розробки методів підвищення резистентності печінки в комплексному лікуванні хворих на виразкову хворобу шлунка і дванадцятипалої кишки, що вимагає поглибленого доклінічного вивчення.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гонський Я.І., Кубант Р.М. Корекція порушень вільнорадикальних процесів у щурів з токсичним ураженням печінки за допомогою металокомплексів // Науковий вісник Ужгородського університету. Серія: Медицина. – 2001. – Вип. 14. – С. 28-30.
2. Дроговоз С.М., Сальникова С.И., Скакун Н.П., Слышков В.В. Методические рекомендации по экспериментальному изучению желчегонной, холе-спазмолитической, холелитиазной и гепатопротекторной активности новых лекарственных веществ. – К.: ФКМЗ Украины, 1994. – 46 с.
3. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. – Минск: Беларусь, 1982. – 311 с.
4. Маев И.В., Вьючнова Е.С., Петрова Е.Г. Побочные действия современной антихеликобактерной терапии // Клин. мед. – 2002. – 6. – С. 7-12.
5. Передерій В.Г., Ткач С.М., Швеє О.В., Кля-

- риська І.Р. Побічні ефекти різних видів антихеликобактерної терапії // Фармакол. вісник. – 1999. – № 5. – С. 66-68.
6. Попов Т., Нейковская Л. Метод определения пероксидазной активности крови // Гигиена и санитария. – 1971. – № 10. – С. 89-91.
7. Прохорова М.И., Тушикова З.Н. Большой практикум по углеводному обмену и липидному обмену. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1995. – С. 53-65.
8. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Доклады Академии наук СССР. – 1979. – 247, № 6. – С. 1513-1516.
9. Савченко Р.П., Сторожук И.К. Клинико-лабораторная оценка компенсаторных возможностей при циррозах печени с использованием высокоинформативных тестов // Клин. лаб. диагностика. – 2001. – № 11. – С. 5.

10. Скрыпник И.Н. Обоснование комплексной терапии для лечения больных с пептической язвой и сопутствующими заболеваниями органов пищеварения // Укр. мед. часопис. – 2001. – № 5. – С. 111-115.

11. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных жирных кислот // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 43-44.

12. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича. – М.: Медицина, 1977. – С. 44-46.

13. Chainuvat S., Nafziger A.N., Leeder J.S. et al. Combined phenotypic assessment of cytochrome p450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the "Cooperstown 5+1 cocktail" // Clin. Pharmacol. Ther. – 2003. – **74**, № 5. – P. 437-447.

14. Desta Z., Zhao X., Shin I.O., Flockhart D.A. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19

genetic polymorphism // Clin. Pharmacokinet. – 2002. – **41**. – P. 913-958.

15. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – **82**. – P. 70-77.

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

17. Leung W.K., Graham D.Y. Clarithromycin for Helicobacter pylori infection // Expert. Opin. Pharmacother. – 2000. – **1**, № 3. – P. 507-514.

18. Miki I., Aoyama N., Sakai T. et al. Impact of clarithromycin resistance and CYP2C19 genetic polymorphism on treatment efficacy of Helicobacter pylori infection with lansoprazole- or rabeprazole-based triple therapy in Japan Eur. J // Gastroenterol. Hepatol. – 2003. – **15**. – P. 27-33.

19. Tabak F., Ozaras R., Erzin Y. et al. Ornidazole-induced liver damage: report of three cases and review of the literature // Liver Int. – 2003. – **23**, № 5. – P. 351-354.

ГЕПАТОТОКСИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ЛАНСОПРАЗОЛА, МЕТРОНИДАЗОЛА И КЛАРИТРОМИЦИНА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В.В. Підгірний

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

В эксперименте на здоровых белых крысах изучено гепатотоксические проявления метронидазола, лансопразола и кларитромицина. Установлено, что введение этих препаратов сопровождается активацией перекисного окисления липидов, нарушением антиоксидантной защиты, цитолитическим синдромом, снижением в печени содержания гликогена. Выявленные изменения нарастают по мере увеличения медикаментозной нагрузки на печень и достигают максимума после введения одновременно всех исследуемых препаратов. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости разработки методов повышения резистентности печени в комплексном лечении больных с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, что требует углубленного доклинического изучения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гепатотоксичность, противоязвенные препараты.

HEPATOTOXIC INFLUENCE OF LANSOPRAZOLE, METRONIDAZOLE AND CLARITHROMYCINE IN EXPERIMENT

V.V. Pidgirnyy

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

In experiments on healthy white rats was studied hepatotoxic effect of metronidasole, lansoprazole and clarithromycine. It has been shown an activation of lipidperoxidation processes, antioxidation protection destroying, development of cytotoxic syndrome and glycogen reducing in the liver. Some pathologic changes due to remedies overdoing in an organism has been reached the highest level as result of combined action of there three preparation. Obtained results are the early manifestations of anti-ulcer drugs hepatotoxic activity and point on importance of elaboration of their side effects correction methods.

KEY WORDS: hepatotoxic influence, anti-ulcer drugs.

Отримано 13.04.2007 р.

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

**КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЕКОНАЗОЛУ ТА КСЕРОФОРМУ
В СКЛАДІ МАЗІ НА ПЕО-ОСНОВІ****І.О. Криклива, В.О. Грудько, О.А. Рубан**
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

У процесі складання аналітичної нормативної документації на нову мазь розроблено методику кількісного визначення еконазолу і ксероформу в її складі методом адсорбційної спектрофотометрії з попереднім виділенням діючих речовин. Відносні невизначеності окремого визначення для еконазолу і бісмуту (III) оксиду складають 1,70 і 1,66 % відповідно.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: еконазол, ксероформ, спектрофотометричний аналіз.

ВСТУП. Найбільш поширені дерматози, на які хворіє людина, мають грибкову етіологію. У природі налічується понад 100 тисяч різних видів грибків, з них більше 500 [1] спричиняють виникнення цих захворювань.

Арсенал протигрибкових засобів, які випускаються промисловістю, не досить великий, тому впровадження у виробництво нових препаратів, що мають високу фунгіцидну активність і одночасно діють на супровідну бактеріальну мікрофлору, є актуальним.

Серед лікарських препаратів, які планується впровадити у виробництво, є розроблена на кафедрі промислової фармації НФаУ мазь для лікування дерматологічних захворювань, до складу якої входять новий високоефективний протигрибковий лікарський засіб з групи похідних імідазолу – еконазол та ксероформ – в'язучий засіб, що добре зарекомендував себе в дерматологічній практиці, а носієм є гідрофільна поліетиленоксидна основа.

Впровадження у виробництво нового лікарського засобу потребує складання аналітичної нормативної документації для контролю його якості. Розробка методики кількісного визначення еконазолу та ксероформу є метою нашої роботи.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Одним із найрозповсюдженіших методів аналізу готових лікарських засобів є адсорбційна спектрофотометрія на УФ- та видимій ділянках спектра. Дослідження проводили на спектрофотометрії СФ-46 в кюветах з товщиною шару 1 см.

Для проведення кількісного визначення використовують смуги поглинання, які називають

© І.О. Криклива, В.О. Грудько, О.А. Рубан, 2007.

аналітичними. Вони повинні бути вільними від накладання смуг поглинання інших компонентів. Спектрофотометричне дослідження діючих речовин системи показало (рис. 1), що трибромфенол, який є складовою частиною ксероформу, заважає кількісному визначенню еконазолу нітрату, тому нами був застосований метод розділення, що базується на різній розчинності компонентів системи. Розділені компоненти визначали спектрофотометрично методом однокомпонентного однохвильового аналізу (ДФУ 2.2.25 [4]).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Адсорбційний спектр поглинання 0,04 % розчину робочого стандартного зразка (РСЗ) еконазолу нітрату в суміші "етанол – 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої" (9:1) в інтервалі від 240 до 300 нм (див. рис. 1) характеризується наявністю широкої смуги поглинання в межах 250-285 нм, утвореної за рахунок накладання смуг поглинання ароматичних та гетероциклічних циклів молекули. Про це свідчить той факт, що смуга має три максимуми при 266, 272 та 281 нм. Серед них для проведення кількісного визначення добре підходить максимум при 266 нм. Хоча він менш інтенсивний, ніж максимум при 272 нм, проте більш широкий та стійкий.

Як відомо, адсорбційний спектр препарату на УФ- та видимій ділянках є складною сумою всіх компонентів системи. До складу мазі, окрім еконазолу, входять диметилсульфоксид і поліетиленоксиди, які майже не поглинають світла в УФ-ділянці, а також ксероформ – основний трибромфенолят бісмуту, який при розчиненні гідролізується з утворенням трибромфенолу.

1,0 г мазі розчиняли в спирті в мірній пробірці ємністю 10 мл, доводили до позначки спиртом та відцентрифугували нерозчинний ксероформ.

У спектрі центрифугату виявлено широкий інтенсивний максимум у межах 290-300 нм та три регіони смуг поглинання при 265-266; 271-273; 282-285 нм, які відповідають максимумам поглинання еконазолу нітрату.

У спектрі мазі без еконазолу виявлено пік при 290-300 нм. І хоча максимум поглинання еконазолу збігався з мінімумом поглинання мазі без еконазолу, рівень її оптичної густини при 260-280 нм свідчив про неможливість прямого спектрофотометричного визначення за такою методикою.

У ході проведених досліджень нами запропоновано такий шлях розв'язання проблеми: основа еконазолу не розчиняється у воді та лугах, а поліетиленоксидна основа мазі та трибромфенол добре розчиняються в лугах.

1,0 г мазі (точна наважка) в мірній пробірці ретельно змішували з 8 мл 1 М розчину натрію гідроксиду, відцентрифугували осад бісмуту (III) оксиду та основи еконазолу, центрифугат, який містив мазеву основу та натрію трибромфенолят, видаляли, до осаду додавали 10 мл води, ретельно перемішували, відцентрифугували, центрифугат видаляли. Одержаний осад суспендували в 8 мл спирту, добре перемішували та доводили до позначки тим самим розчинником. При цьому в розчин переходила основа еконазолу, а в осаді залишався бісмуту (III) оксид. Осад відцентрифугували, 4 мл центрифугату вміщували в пікнометр ємністю 10 мл, додавали 1 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої, доводили до 10 мл спиртом, ретельно перемішували та знімали

спектр поглинання. Паралельно 0,05 г РСЗ еконазолу нітрату вміщували в мірну колбу ємністю 25 мл, розчиняли в 10 мл спирту, доводили до позначки тим самим розчинником та перемішували, 2 мл отриманого розчину вміщували в пікнометр ємністю 10 мл, додавали 1 мл 0,1 М розчину кислоти хлористоводневої, доводили до позначки спиртом і також знімали спектри поглинання. Одержаний таким чином спектр за положенням максимумів поглинання та їх інтенсивністю цілком збігався зі спектром поглинання РСЗ еконазолу нітрату, а його дані можуть бути використані для кількісного визначення (рис. 2).

Проведена перевірка показала, що підпорядкування закону Бугера-Ламберта-Бера відбувається в межах від $0,5 \cdot 10^{-4}$ до $8,0 \cdot 10^{-4}$ г/мл еконазолу нітрату.

Розроблену методику застосували для кількісного визначення еконазолу нітрату в експериментально виготовлених модельних зразках мазі з точними наважками компонентів.

Кількість еконазолу нітрату (г/100 г мазі) розраховували за формулою:

$$X = \frac{A \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot m_{cm} \cdot V_{cm2} \cdot 100}{A_{cm} \cdot m \cdot V_2 \cdot V_{cm1} \cdot V_{cm3}} = \frac{A \cdot 10 \cdot 10 \cdot m_{cm} \cdot 2 \cdot 100}{A_{cm} \cdot m \cdot 4 \cdot 25 \cdot 10} = \frac{A \cdot m_{cm} \cdot 20}{A_{cm} \cdot m}$$

Отримані дані представлено в таблиці 1.

Як видно з наведених даних, розроблений метод кількісного визначення еконазолу нітрату в складі мазі з еконазолом та ксероформом є досить точним. Відносна невизначеність результату окремого визначення цим методом становить 1,70 %.

Ксероформ – трибромфінолят бісмуту основний з бісмуту (III) оксидом – стандартизували за вмістом бісмуту (III) оксиду, якого повинно бути від 50 до 55 %. У субстанції кіль-

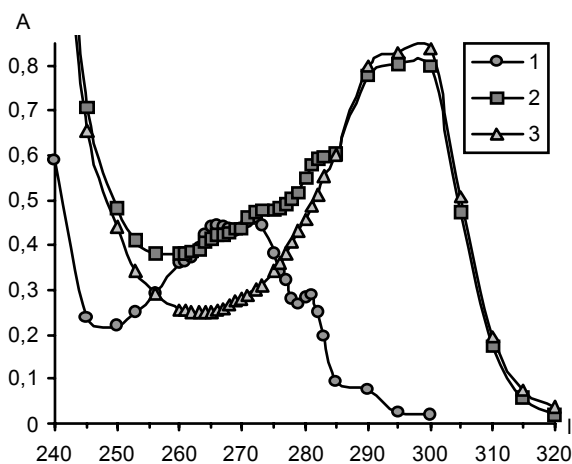


Рис. 1. Адсорбційні спектри поглинання: 1) РСЗ еконазолу нітрату; 2) мазі з еконазолом та ксероформом; 3) мазі, яка не містить еконазолу в суміші "етанол – 0,1 М розчин кислоти хлористоводневої" (9:1).

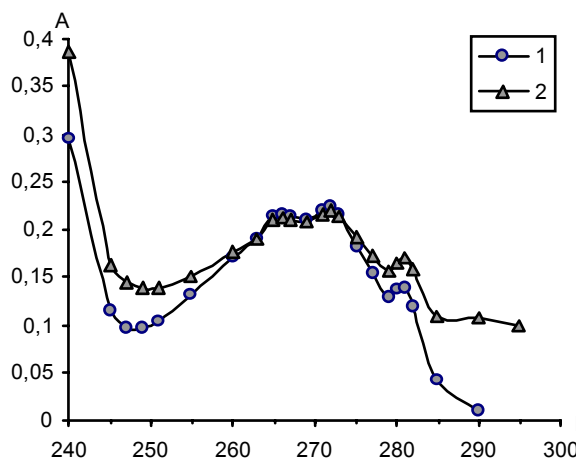


Рис. 2. УФ-спектр розчину: 1) РСЗ еконазолу нітрату; 2) еконазолу, виділеного з мазі в суміші "спирт – 0,1 М розчин HCl" (9:1).

Таблиця 1 – Результати кількісного визначення еконазолу в модельних зразках мазі

№ за/п	Маса наважки мазі, г	Оптична густина, А	Вміст еконазолу, г/ 100 г мазі	Метрологічні характеристики методу аналізу
1	0,9991	0,431	1,022	$\bar{X} = 0,9985$
2	0,9977	0,424	1,007	$S^2 = 0,261 \cdot 10^{-3}$
3	1,0065	0,422	0,993	$S = 0,0016156$
4	0,9983	0,410	0,973	$\Delta x = 0,016957$
5	1,0036	0,428	1,011	$P, \% = 95$
6	1,0012	0,416	0,985	$\epsilon, \% = 1,698$

кість бісмуту (III) оксиду визначали комплексно-метрично після мінералізації – окиснення органічної частки молекули перхлоратною кислотою [3]. У мазі, де вміст ксероформу складає всього 5 %, такий метод потребуватиме великих витрат часу та окисника, що робить його застосування нераціональним.

У літературі описано спектрофотометричне визначення сполук бісмуту у вигляді комплексів з натрію едетатом [2].

УФ-спектри поглинання комплексів бісмуту з натрію едетатом, одержаних з бісмуту (III) оксиду та ксероформу (рис. 3) в межах від 220 до 340 нм, практично ідентичні та мають високо-інтенсивний максимум поглинання при 264 нм, який може бути використаний для кількісного визначення бісмуту (III) оксиду та ксероформу.

Проведена перевірка показала, що підпорядкування закону Бугера-Ламберта-Бера відбувається в межах від $0,3 \cdot 10^{-5}$ до $2,1 \cdot 10^{-5}$ г/мл бісмуту (III) оксиду.

Для кількісного визначення ксероформ, осад якого залишився після екстрагування спиртом основи еконазолу, ще раз суспендували з 8 мл спирту, відцентрифугували, центрифугат видаляли, залишок розчиняли у 10 мл розведеної нітратної кислоти, кількісно переносили в мірну колбу ємністю 25 мл,

додавали 5 мл 0,05 М розчину натрію едетату, доводили до позначки водою та ретельно перемішували (розчин мазі 1). 1 мл розчину мазі 1 вміщували в мірну колбу ємністю 100 мл, доводили до позначки водою і ретельно перемішували (розчин мазі 2). Оптичну густина одержаного розчину визначали на спектрофотометрі при довжині хвилі 264 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм.

Паралельно 0,050 г стандартного бісмуту (III) оксиду вміщували у мірну колбу ємністю 500 мл, розчиняли в 50 мл розведеної нітратної кислоти, додавали 5 мл 0,05 М розчину натрію едетату, доводили до позначки водою та ретельно перемішували. 10 мл отриманого розчину переносили в мірну колбу ємністю 100 мл, доводили до позначки водою, ретельно перемішували і визначали оптичну густина одержаного розчину.

Кількість бісмуту (III) оксиду в грамах на 100 г мазі розраховували за формулою:

$$X = \frac{A \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot m_{CT} \cdot V_{2CT} \cdot 100}{A_{CT} \cdot m_H \cdot V_2 \cdot V_{1CT} \cdot V_{3CT}} = \frac{A \cdot 25 \cdot 100 \cdot m_{CT} \cdot 10 \cdot 100}{A_{CT} \cdot m_H \cdot 1 \cdot 500 \cdot 100} = \frac{A \cdot m_{CT} \cdot 50}{A_{CT} \cdot m_H}$$

Отримані результати наведено в таблиці 2.

Як видно з наведених даних, розроблений метод кількісного визначення бісмуту (III) оксиду в складі мазі з еконазолом та ксероформом є досить точним. Відносна невизначеність результату окремого визначення становить 1,66 %.

ВИСНОВКИ. 1. Вивчено адсорбційні спектри еконазолу нітрату, мазі з еконазолом і ксероформом та комплексу бісмуту з натрію едетатом.

2. Розроблено методику розділення компонентів мазі, придатну для наступного спектрофотометричного визначення.

3. Вивчено межі підпорядкування закону Бугера-Ламберта-Бера. Встановлено, що спиртові розчини еконазолу та розчини комплексу бісмуту з натрію едетатом відповідають закону в межах від $0,5 \cdot 10^{-4}$ до $8,0 \cdot 10^{-4}$ г/мл еконазолу і від $0,3 \cdot 10^{-5}$ до $2,1 \cdot 10^{-5}$ г/мл бісмуту (III) оксиду.

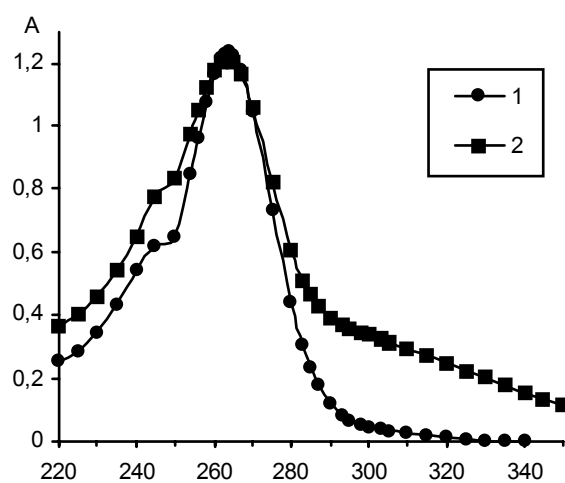


Рис. 3. Адсорбційні спектри поглинання комплексів бісмуту з натрію едетатом, отриманих з: 1) бісмуту (III) оксиду; 2) ксероформу.

Таблиця 2 – Результати кількісного визначення бісмуту (III) оксиду в модельних зразках мазі

№ за/п	Маса наважки мазі, г	Оптична густина, А	Вміст бісмуту (III) оксиду, г/100 г мазі	Метрологічні характеристики методу аналізу
1	0,9963	0,446	2,515	$\bar{X}=2,4902$
2	1,0148	0,446	2,469	$S^2=0,1547 \cdot 10^2$
3	1,0217	0,452	2,485	$S=0,03934$
4	1,0936	0,490	2,517	$P, \%=95$
5	0,9852	0,425	2,424	$\Delta x=0,0413$
6	0,9874	0,443	2,521	$\varepsilon, \%=1,6580$

4. Розроблено спектрофотометричну методику кількісного визначення еконазолу нітрату і ксероформу після попереднього розділення за поглинанням спиртового роз-

чину еконазолу та комплексу бісмуту з натрію едетатом. Встановлено, що відносні невизначеності окремого визначення для еконазолу і бісмуту (III) оксиду складають 1,70 і 1,66 % відповідно.

ЛІТЕРАТУРА

1. Беньяс Л. Грибковые заболевания кожи, их этиология и лечение // Новости фармации и медицины. – 1999. – № 6 (166). – С. 138-140.
2. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотоколориметрическим и спектрофотометрическим методам анализа. – Ленинград:

Химия, 1972. – 408 с.

3. Государственная Фармакопея СССР. – 10-е изд. – М.: Медицина, 1968. – 1080 с.

4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр. – 1-ше вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКОНАЗОЛА И КСЕРОФОРМА В СОСТАВЕ МАЗИ НА ПЭО-ОСНОВЕ

И.А. Крикливая, В.А. Грудько, Е.А. Рубан
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

В процессе составления аналитической нормативной документации на новую мазь разработана методика количественного определения эконазола и ксероформа в ее составе методом адсорбционной спектрофотометрии с предварительным выделением действующих веществ. Относительные неопределенности отдельного определения для эконазола и бисмута (III) оксида составляют 1,70 и 1,66 % соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эконазол, ксероформ, спектрофотометрический анализ.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF ECONASOL AND XEROFORM IN THE OINTMENT COMPOSITION ON THE BASE OF MACROGOL

I.O. Kryklyva, V.O. Hrudko, O.A. Ruban
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

The quantitative determination method for the content of econasol and xeroform in the ointment composition has been developed while elaborating analytical and normative documentation by means of adsorption spectrophotometry with the preliminary isolation of the active substances. Relative indefinites of the separate determination for econasol and bismuth (III) oxide are 1,70 and 1,66 % respectively.

KEY WORDS: econasol, xeroform, spectrophotometrical analysis.

Отримано 26.12.2006 р.

Адреса для листування: І.О. Криклива, пр. Гагаріна, 49а, кв. 107, Харків, 61002, Україна.

СИНТЕЗ ПОХІДНИХ ОКСАНІЛОВИХ КИСЛОТ ЯК НАПІВПРОДУКТІВ У СИНТЕЗІ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

В.А. Георгіянец, Н.В. Шиньова, Л.О. Перехода, І.А. Сич
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ
ДОНЕЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

У результаті взаємодії діетилових ефірів щавлевої кислоти з похідними аніліну синтезовано відповідні амідовані похідні оксанілової кислоти, які, у свою чергу, використовували як вихідні речовини в реакції з 2,2-диметоксіетиламіном. Будову синтезованих похідних (2,2-диметоксіетил)-оксанілів доводили методами УФ- та ПМР-спектроскопії. Простота синтетичних методик та низька собівартість виробництва похідних оксанілових кислот створюють реальні можливості для використання їх як напівпродуктів у синтезі нових біологічно активних речовин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: синтез, щавлева кислота, ПМР-спектроскопія.

ВСТУП. Пошук нових біологічно активних речовин традиційно базується на використанні доступних та природних речовин. До таких речовин серед багатьох інших належить і щавлева кислота, яка має велике значення в життєдіяльності людини [6, 9, 12], тварин та рослин [5, 11, 13]. Крім того, її широко застосовують у промисловості [10] та сільському господарстві, наприклад як акарицидний засіб, у бджільництві [8].

Чимало даних наукової літератури свідчить про перспективність пошуку біологічно активних речовин серед амідованих похідних щавлевої кислоти. Так, наприклад, похідні феноксифенілоксамінових кислот виявили кардіоваскулярні ефекти та вплив на обмін холестерину [14].

Синтез нових біологічно активних речовин на основі функціональних похідних щавлевої кислоти є традиційним спрямуванням робіт науковців Національного фармацевтичного університету. В результаті таких досліджень, зокрема, було встановлено, що β -N-ацилгідррази 2-гідроксіоксанілової кислоти мають помірні гепатозахисні властивості, а також слабкий анагетичний та протизапальний ефекти [1].

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Продовжуючи дослідження вчених у цьому напрямку, ми поставили за мету вивчити гетероциклічні

© В.А. Георгіянец, Н.В. Шиньова, Л.О. Перехода, І.А. Сич, 2007.

сполуки, синтезовані на основі функціональних похідних щавлевої кислоти.

Підґрунтям для цього стали численні факти використання оксамінових кислот та оксамідів в органічному синтезі [4, 7, 15]. Крім того, наявність у молекулі залишку щавлевої кислоти дозволить синтетичним продуктам реакції наблизитись за властивостями до звичайних біогенних речовин.

Для подальших перетворень нами були синтезовані етилові ефіри N-R-оксанілових кислот відповідно до схеми 1.

Взаємодія отриманих етилових ефірів (3-9) з 2,2-диметоксіетиламіном (10) приводить до утворення відповідних амідованих похідних (11-17).

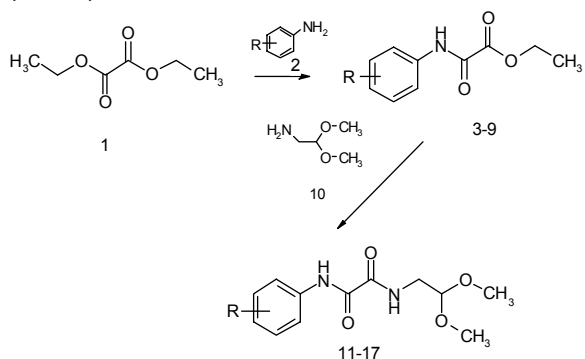


Схема 1

Синтез ефірів (3-9) здійснювали шляхом нагрівання розчинів відповідних анілінів (2) у діетилоксалаті (1) за розробленою раніше методикою [2]. Подальше амідовання отриманих ефірів проводили в середовищі диметил-

формаїду при кип'ятінні протягом 3 год. Високий вихід (50-90 %) одержаних сполук (табл. 1) доводить, що вихідні речовини мають велику реакційну здатність. Подовження терміну реакції не впливає на вихід синтезованих речовин, а заміна розчинника на полярний протонний (етанол, метанол) призводить до зменшення виходів цільових продуктів. Крім того, диметилформаїд, що є органічною основою, створює в реакційному середовищі умови для основного каталізу, оптимальні при перебігу цієї реакції.

Синтезовані сполуки являють собою білі або білі з жовтуватим відтінком кристалічні речовини, не розчинні у воді, розчинні в спиртах та більшості органічних розчинників.

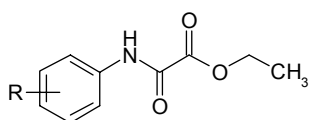
РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Будову одержаних речовин було доведено даними елементного аналізу (табл. 1, 2), ходом синтезу та даними спектроскопії ПМР (табл. 3, 4). УФ-спектри (2,2-диметоксіетил)-оксанілів характеризуються наявністю одного максимуму високої інтенсивності та практично не відрізняються від спектрів вихідних анілінів.

Аналізуючи спектри ПМР синтезованих речовин, можна зробити висновок, що всі вони

мають спільні сигнали протона амідної групи NH анілідного залишку у вигляді синглету (10,4-11,58 м.д.) та сигнали, характерні для ароматичних протонів (6,73-7,75 м.д.) у вигляді мультиплету з інтегральною інтенсивністю, що відповідає наявності трьох або чотирьох протонів залежно від присутності та відсутності замісника. Зокрема, п-заміщені аніліни (3,9,11,17) проявляють сигнал у вигляді симетричного дублету дублетів, що характеризує ароматичні протони як магнітоеквівалентні. Таке розщеплення сигналів ароматичних протонів є очікуваним і відповідає загальним принципам спектроскопії ПМР. У речовин 11-17 з'являються також сигнали протонів алкіламідної групи. Ідентифікувати ці протони дозволяють їх інтенсивність, зсув у більш сильне поле, а також вигляд триплету. Крім того, наслідком амідування є поява у спектрах сигналів метинових, метиленових, а також метильних протонів (табл. 4). З огляду на наведені дані, спектроскопія ПМР дозволяє надійно підтвердити всі гідрогенвмісні функціональні групи синтезованих сполук [3].

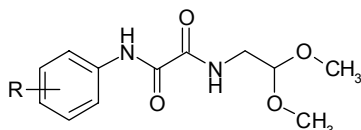
Доведена будова синтезованих речовин дає змогу використовувати їх у подальшому в синтезі біологічно активних речовин.

Таблиця 1 – Вихід, температури плавлення та дані елементного аналізу етилових ефірів оксанілових кислот загальної формули



Сполука	R	Вихід, %	Т.пл., °C	Вирах. %N	Брутто-формула	Знайд. %N	R _f
3	4-F	71	94-96	6,6	C ₁₀ H ₁₀ FN ₂ O ₃	6,65	0,56
4	3,4-(CH ₃) ₂	68	108-110	6,33	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃	6,41	0,59
5	3,5-(CH ₃) ₂	72	124-126	6,33	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₃	6,29	0,70
6	3-OCH ₃	75	176-178	6,27	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₄	6,34	0,63
7	3,4-(OCH ₃) ₂	68	155-157	5,53	C ₁₂ H ₁₅ N ₂ O ₅	5,60	0,56
8	H	65	134-136	7,65	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₃	7,70	0,57
9	4-Cl	74	148-150	6,44	C ₉ H ₁₂ ClN ₂ O ₃	6,50	0,66

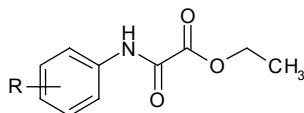
Таблиця 2 – Вихід, температури плавлення та дані елементного аналізу (2,2-диметоксі)-етиламідів оксанілових кислот загальної формули



Сполука	R	Вихід, %	Т.пл., °C	Вирах. %N	Брутто-формула	Знайд. %N	R _f
11	4-F	68	124-126	10,37	C ₁₂ H ₁₅ FN ₂ O ₄	10,5	0,70
12	3,4-(CH ₃) ₂	78	118-120	9,99	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₄	10,12	0,59
13	3,5-(CH ₃) ₂	79	134-136	9,99	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₄	10,15	0,69
14	3-OCH ₃	76	96-98	9,92	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₅	9,85	0,63
15	3,4-(OCH ₃) ₂	81	126-128	8,97	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₆	9,20	0,67
16	H	63	146-148	10,52	C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ₄	10,70	0,59
17	4-Cl	65	130-132	9,31	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₂ O ₄	9,50	0,65

Примітка. Значення R_f наведено в системі "бутанол – концентрована оцтова кислота – вода" (40:10:1).

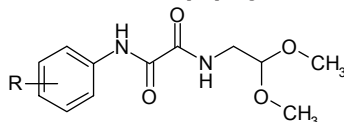
Таблиця 3 – Спектри ПМР синтезованих етилових ефірів оксанілових кислот загальної формули



Сполука	NH, 1H, с	Ar-H	Сигнали протонів інших функціональних груп
3	10,85	7,75-7,19, 4H, м	4,25, 2H, м (CH ₂) 1,35, 3H, т (CH ₃)
4	11,58	7,32-6,75, 3H, д	4,25, 2H, м (CH ₂ -CH ₃) 2,25, 6H, т, (2xCH ₃) 1,23, 3H, м (CH ₂ CH ₃)
5	10,66	7,35-6,88, 3H, м	4,28, 2H, м (CH ₂ -CH ₃) 3,72, 6H, т (2 x CH ₃) 1,27, 3H, м (CH ₃ -CH ₂)
6	10,69	7,33-6,50, 4H, м	4,28, 2H, м (CH ₂ -CH ₃) 1,27, 3H, м (CH ₃ -CH ₂) 3,72, 6H, т (2 x OCH ₃)
7	10,80	7,15-7,84, 4H, м	4,25, 2H, м (CH ₂ -CH ₃) 1,23, 3H, м (CH ₂ CH ₃) 2,25, 6H, т, (2xOCH ₃)
8	10,70	7,35-6,73, 4H, м	4,28, 2H, м (CH ₂) 3,72, 3H, з (CH ₂ -CH ₃) 1,27, 3H, т (CH ₃ -CH)
9	10,66	7,30-6,81, 4H, м	4,25, 2H, м (CH ₂ CH ₃) 1,23, 3H, т (CH ₂ CH ₃)

Примітка. Нумерація сполук в таблиці 3 відповідає нумерації в таблиці 1.

Таблиця 4 – Спектри ПМР синтезованих (2,2-диметоксі)-етиламідів оксанілових кислот загальної формули



Сполуки	NH, 1H, с	Ar-H	NH-CH ₂ , 1H, т	Сигнали протонів інших функціональних груп
11	10,74	7,15-7,84, 4H, м	8,87	3,28, 6H, м (2*CH ₃) 4,55, 2H, т (CH ₂ -CH) 3,75, 6H, з (2*CH ₃)
12	10,40	7,38-6,75, 3H, д	8,78	4,50, 1H, т (CH) 3,35, 2H, т (CH ₂ -CH) 3,26, 6H, з (2*CH ₃) 2,20, 6H, з (2*CH ₃)
13	10,45	7,54-6,93, 3H, м	8,82	4,51, 1H, т (CH) 3,74, 6H, м (2*CH ₃) 3,32, 2H, д (CH ₂ -CH) 3,21, 6H, з (2*CH ₃)
14	10,61	6,72-7,48, 4H, м	8,85	4,55, 2H, т (CH ₂ -CH) 3,75, 6H, з (2*CH ₃) 3,32, 4H, д (CH ₃ +CH)
15	10,48	7,55-7,02, 3H, м	8,81	4,50, 1H, т (CH) 3,34, 2H, д (CH ₂ -CH) 3,25, 6H, т (2*CH ₃) 2,15, 6H, з (2*CH ₃)
16	10,41	6,70-7,30, 4H, м	8,89	4,50, 1H, т (CH) 3,35, 2H, т (CH ₂ -CH) 3,26, 6H, з (2*CH ₃) 2,20, 6H, з (2*CH ₃)
17	10,75	6,76-7,45, 4H, м	8,80	4,50, 1H, т (CH) 3,35, 2H, т (CH ₂ -CH)

Примітка. Нумерація сполук в таблиці 4 відповідає нумерації в таблиці 2.

Спектри ПМР синтезованих речовин знято на приладі Bruker DRx500, розчинник – ДМСО – d_6 , внутрішній стандарт – тетраметилсилан (ТМС). Хімічні зсуви наведено в шкалі δ (м.д.). Величини R_f визначено на пластинках "Силуфол" та "Сорбфіл" у системі розчинників "н-бутанол – концентрована оцтова кислота – вода" (10:40:1), проявник – пари йоду. Речовини наносили на пластинки для хроматографування у вигляді 0,1 % розчину в кількості 0,01 мл (10 мкг досліджуваної речовини). Перевірку придатності хроматографічної системи проводили згідно з вимогами ДФУ.

Отримання етилового ефіру п-фтороксанілової кислоти (3).

Розчин 55,56 г (0,5 моль) п-фтораніліну в 200 мл діетилового ефіру щавлевої кислоти нагрівають при температурі 150 °С протягом 3-5 год. Після охолодження суміш розводять 500 мл ізопропанолу і залишають у холодильнику до утворення кристалів етилового ефіру п-фтороксанілової кислоти. Осад, що випав, відфільтровують та промивають ізопропанолом. Вихід – 75 г (72 %). Т. пл. – 94-96 °С (ізопропанол). Сполуки 4-9 отримано аналогічно.

Отримання 2,2-диметоксietiламіду – п-фтороксанілової кислоти (11).

До розчину 6,36 г (0,03 моль) етилового ефіру п-фтороксанілової кислоти (3) в 30 мл

диметилформаміду додають 3,47 мл (0,033 моль) 2,2-диметоксietiламіну та кип'ять протягом 3 год зі зворотним холодильником. Після охолодження додають 500 мл ізопропанолу. Осад, що утворився, відфільтровують та промивають ізопропанолом. Вихід – 55,13 г (68 %) Т. пл. – 124-126 °С (ДМФА-ізопропанол). Сполуки 12-17 отримано аналогічно.

Весь експериментальний біологічний матеріал оброблено методом варіаційної статистики з урахуванням критерію Стюдента.

Проведений первинний фармакологічний скринінг показав, що синтезовані речовини є перспективними для подальших досліджень.

ВИСНОВКИ. 1. У результаті взаємодії діетилових ефірів щавлевої кислоти з похідними аніліну отримано відповідні похідні оксанілової кислоти. На основі реакції похідних оксанілової кислоти з 2,2-диметоксietiламіном одержано похідні (2,2-диметоксietiл)-оксанілів.

2. Структуру синтезованих речовин доведено даними елементного аналізу, УФ- та ПМР-спектроскопії.

3. Фармакологічний скринінг синтезованих сполук довів перспективність подальшого пошуку потенційних біологічно активних речовин у цьому ряду.

ЛІТЕРАТУРА

1. Безуглий П.О., Георгіянц В.А., Гриненко В.В., Сич І.А. Синтез та фармакологічна активність β -N-ацилгідрозидів 2-гідроксiоксанілової кислоти // Запорожский мед. журн. – 2004. – **2**, № 1. – С. 30-32.
2. Безуглый П.А., Трескач В.И., Украинец И.В и др. // Журн. орган. химии. – 1991. – **27**, вып. 7. – С. 1410-1412.
3. Браун Д., Флорид А., Сейнзбери М. Спектроскопия органических веществ. – М.: Мир, 1992. – 300 с.
4. Yang L., Liu L., Olsen B.A. et al. // J. of Pharm. and Biomed. Analysis. – № 22. – P. 487-493.
5. Bhandari M.R., Kawabata J. // Food Chemistry. – 2004. – № 88. – P. 163-168.
6. Eiss M., Schieferstein G., Wahl R. // Fertility and Sterility. – 2000. – **73**, № 5. – P. 961-966.
7. Giri S., Samanta S., Maji S. et al. // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. – 2005. – № 285. –

P. 296-302.

8. Gregorc A., Planing I. // The Veterinary Journal. – 2002. – № 163. – P. 306-310.

9. Kerminen V., Ojanen Ch., Pakkanen T. et al. // J. Aerosol Sci. – 2000. – **31**, № 3. – P. 349-362.

10. Meyer-Pinson V., Ruel K., Gaudard F. et al. // C.R. Biologies. – 2004. – № 327. – P. 917-925.

11. Palaniswamy U.R., Bible B.B., McAvoy R.J. // Scientia Horticulturae. – 2004. – № 102. – P. 267-275.

12. Rodrigues A., Ferreira P., Monteiro L. // Tetrahedron. – 2004. – № 60. – P. 8489-8496.

13. Smirnoff N. // Current Opinion in Plant Biology. – 2000. – № 3. – P. 229-235.

14. Stanton J.L., Cahill E., Dotson R. et al. Synthesis and biological activity of phenoxyphenyl oxamic acid derivatives related to L-thyronine // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2000. – **10**, № 5. – P. 1661-1663.

15. Zhang J., Wu L., Fan Yu. // J. Molec. Struct. – 2003. – № 660. – P. 119-129.

СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ ОКСАНИЛОВЫХ КИСЛОТ КАК ПОЛУПРОДУКТОВ В СИНТЕЗЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

В.А. Георгиянц, Н.В. Шинёва, Л.А. Перехода, И.А. Сыч
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ
ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

В результате взаимодействия диэтиловых эфиров щавелевой кислоты с производными анилина синтезированы соответствующие амидированные производные оксаниловой кислоты, которые, в свою очередь, использовали как исходные вещества в реакции с 2,2-диметоксиэтиламином. Строение синтезированных производных (2,2-диметоксиэтил)-оксанилов доказывали методами УФ- и ПМР-спектроскопии. Простота синтетических методик и низкая себестоимость производства производных оксаниловых кислот создают реальные возможности для использования их как полупродуктов в синтезе новых биологически активных веществ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: синтез, щавелевая кислота, ПМР-спектроскопия.

SYNTHESIS OF DERIVATIVES OF OXALIC ACIDS AS SEMI-PRODUCTS IN THE SYNTHESIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

V.A. Georgiyants, N.V. Shynyova, L.O. Perekhoda, I.A. Sych
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV
DONETSK NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY

Summary

The correspondent amidized derivatives of oxalic acids were synthesized by the interaction of diethylic ethers of oxalic acid with aniline derivatives. These substances were used as initial matters in the reaction with 2,2-dymethoxyethylamine. Structure of synthesized derivatives (2,2-dymetoxylethyl)-oxaniles was proved by UV- and NMR-spectroscopy methods. Simplicity of synthetic methods and low production cost of derivatives of oxanylic acids creates the real possibilities to use them as semi-products in the synthesis of new biologically active substances.

KEY WORDS: synthesis, oxalic acid, NMR-spectroscopy.

Отримано 26.12.2006 р.

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

Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ У ЛОСЬЙОНАХ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ІНФЕКЦІЙНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ШКІРИ

О.В. Рехлецька, Т.Г. Калинюк, Н.І. Гудзь, Н.К. Федущак

ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

Предмет дослідження – стандартизація лосьйонів для лікування інфекційних захворювань шкіри за кількісним вмістом флавоноїдів як діючих речовин. З метою кількісного визначення флавоноїдів за присутності кислоти саліцилової використали їх здатність утворювати забарвлені комплекси з алюмінію хлоридом. Оптичну густину утворених комплексів вимірювали при довжині хвилі (408 ± 2) нм. Похибка методу не перевищувала 7,69 %.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: лосьйон, флавоноїди, спектрофотометрія, алюмінію хлорид, стандартний зразок.

ВСТУП. Усі готові лікарські засоби підлягають обов'язковій стандартизації, мета якої – гарантувати їх максимальну безпеку, фармакологічну дію та високу якість на всіх етапах застосування [8]. Розробка чутливого, легко відтворюваного, простого у виконанні методу визначення кількісного вмісту діючих речовин у лікарських засобах є важливим етапом їх стандартизації.

Метою роботи було опрацювання способу стандартизації лосьйонів для зовнішнього застосування, які містять флавоноїди рослинної сировини як одні з діючих речовин.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідженню підлягали лосьйони для лікування інфекційних захворювань шкіри та поліетіологічних дерматологічних захворювань, у розвитку яких відіграє роль інфекція шкіри. Компонентами лосьйонів є рідкий екстракт бруньок або листя берези бородавчастої, цинку ундециленат, пропіленгліколь, кислота саліцилова, етанол.

Досліджувані лосьйони являють собою складний багатокомпонентний розчин. Основним діючим компонентом лосьйонів є рідкий екстракт бруньок (лосьйон "Бетунцин-1") або листя берези бородавчастої (лосьйон "Бетунцин-2"), який завдяки вмісту біологічно активних речовин сировини (флавоноїдів, ефірної олії) проявляє антимікробну, протизапальну, загоюючу дію.

© О.В. Рехлецька, Т.Г. Калинюк, Н.І. Гудзь, Н.К. Федущак, 2007.

Нами запропоновано стандартизувати досліджувані лосьйони за сумарним вмістом флавоноїдів у перерахунку на гіперозид спектрофотометричним методом (абсорбційна спектрофотометрія, метод стандарту), який характеризується високою точністю, чутливістю та експресністю [5, 9].

Досліджувані лосьйони містять кислоту саліцилову, яка має високу здатність до світлопоглинання. Спектр поглинання кислоти саліцилової характеризується двома максимумами: (236 ± 2) і (299 ± 2) нм. Спектр поглинання флавоноїдів рідких екстрактів бруньок та листя берези має характерний максимум світлопоглинання при (270 ± 1) нм. За рахунок високої оптичної активності кислоти саліцилової і близько розташованих максимумів світлопоглинання на спектральній кривій спектрофотометричне визначення флавоноїдів за присутності кислоти саліцилової є неможливим.

Тому було вирішено використати здатність флавоноїдів утворювати забарвлені комплекси із спиртовим розчином алюмінію хлориду, які викликають батохромне зміщення максимуму світлопоглинання у довгохвильову ділянку спектра (довжина хвилі $\lambda > 400$ нм). Цей метод широко застосовується в аналітичній практиці для аналізу фітопрепаратів та рослинної сировини, що містять флавоноїди [1-7, 10-14]. Використання методу дозволить встановити кількісний вміст флавоноїдів та кислоти саліцилової при їх одночасній присутності у розчині.

Як розчин порівняння використовували комплекс стандартного зразка (СЗ) гіперозиду з алюмінію хлоридом.

Експериментально було обґрунтовано основні параметри реакції комплексоутворення: об'єм розчину алюмінію хлориду, необхідний для повноти утворення комплексу (4 мл), та час, протягом якого утворюється комплекс (40 хв).

Визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів у лосьйоні проводили за такою методикою: 1 мл лосьйону на основі рідкого екстракту бруньок берези або 0,5 мл лосьйону на основі рідкого екстракту листя берези вносили у мірну колбу місткістю 50 мл, додавали 4 мл 10 % розчину алюмінію хлориду в 70 % етанолі, доводили об'єм розчину етанолом 70 % до позначки і перемішували. Через 40 хв вимірювали оптичну густину утвореного комплексу в інтервалі довжин хвиль від 300 до 500 нм. Спектри поглинання комплексів досліджуваних лосьйонів і СЗ гіперозиду з алюмінію хлоридом представлено на рисунку 1.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Як видно з рисунка 1, спектри поглинання досліджуваних лосьйонів характеризуються максимумом світлопоглинання при довжині хвилі (408 ± 2) нм. Отже, для розрахунків кількісного вмісту флавоноїдів оптичну густину розчину досліджуваних лосьйонів та розчину СЗ гіперозиду визначали при максимумі світлопоглинання $\lambda = 408$ нм (аналітична довжина хвилі).

Як компенсаційний використовували розчин, що містить 1 або 0,5 мл лосьйону відповідно й етанол 70 % до 50 мл.

Паралельно за тих самих умов вимірювали оптичну густину розчину порівняння: 1 мл розчину СЗ гіперозиду переносили у мірну колбу

зі шліфом місткістю 25 мл, додавали 4 мл 10 % розчину алюмінію хлориду в 70 % етанолі, доводили об'єм розчину етанолом 70 % до позначки і перемішували.

Кількісний вміст суми флавоноїдів у лосьйоні в перерахунку на гіперозид обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A_x \times C_c}{A_c} \times W,$$

де X – кількісний вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид, %;

A_x – оптична густина розчину досліджуваного лосьйону;

C_c – концентрація розчину порівняння, %;

A_c – оптична густина розчину порівняння;

W – розведення досліджуваного лосьйону.

Примітки:

1. Приготування розчину стандартного зразка гіперозиду. Близько 0,05 г (точна наважка) стандартного зразка гіперозиду, висушеного при температурі 100-105 °С до сталої маси, кількісно переносять у мірну колбу зі шліфом місткістю 100 мл, додають 50 мл 70 % етанолу і нагрівають на водяній бані у колбі зі зворотним холодильником до повного розчинення кристалів. Після охолодження доводять об'єм розчину 70 % етанолом до мітки і перемішують.

2. Приготування 10 % розчину алюмінію хлориду. 18 г алюмінію хлориду гексагідрату розчиняють у 70 % етанолі в мірній колбі місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину етанолом 70 % до мітки і перемішують. Розчин придатний протягом 1 місяця при зберіганні у добре закупореній тарі.

Результати кількісного визначення представлено у таблиці 1.

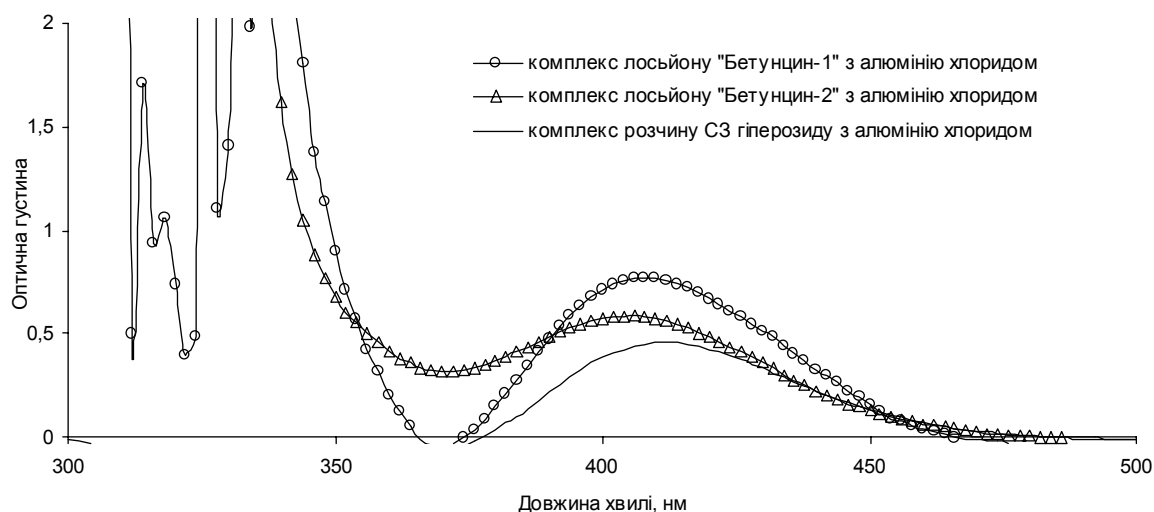


Рис. 1. Спектри поглинання комплексів досліджуваних лосьйонів і СЗ гіперозиду з 10 % розчином алюмінію хлориду в 70 % етанолі.

Таблиця 1 – Результати спектрофотометричного визначення суми флавоноїдів (у перерахунку на гіперозид) у досліджуваних лосьйонах (n=5, P₂=95 %)

Об'єкт дослідження	Серії визначень	Вміст флавоноїдів, %	Метрологічні характеристики
Лосьйон "Бетунцин-1"	1	0,17	$\bar{X} = 0,17$
	2	0,16	$S = 0,01$
	3	0,16	$\Delta_X = 0,03$
	4	0,18	$\Delta_{\bar{X}} = 0,01$
	5	0,17	$\bar{\varepsilon} = 5,88 \%$
Лосьйон "Бетунцин-2"	1	0,24	$\bar{X} = 0,26$
	2	0,28	$S = 0,02$
	3	0,27	$\Delta_X = 0,06$
	4	0,28	$\Delta_{\bar{X}} = 0,02$
	5	0,25	$\bar{\varepsilon} = 7,69 \%$

ВИСНОВКИ. 1. У результаті проведених досліджень розроблено метод стандартизації лосьйонів під умовними назвами "Бетунцин-1" і "Бетунцин-2" за сумою флавоноїдів як діючих речовин – метод абсорбційної спектрофотометрії.

2. Застосування методу дозволяє визна-

чити кількісний вміст флавоноїдів при одночасній присутності у розчині кислоти саліцилової. Похибка методу не перевищує 7,69 %.

3. Розроблений метод кількісного визначення може бути використаний при аналізі лікарських засобів на основі рослинної сировини, яка містить флавоноїди.

ЛІТЕРАТУРА

1. Андреева В.Ю., Калинкина Г.И. Разработка методики количественного определения флавоноидов в манжетке обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L.S.L. // Химия растительного сырья. – 2000. – № 1. – С. 85-88.
2. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
3. Ковальов В.М., Васильева О.А., Краснікова Т.О. Кількісне визначення суми флавоноїдів у пагонах ожини сизої // Вісник фармації. – 2001. – № 3 (27). – С. 38.
4. Куркин В.А., Стеняева В.В. Стандартизация листьев березы // Фармация. – 2004. – № 6. – С. 10-12.
5. Лобанова А.А., Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия растительного сырья. – 2004. – № 1. – С. 47-52.
6. Матюченко Н.В., Степанова И.А. Стандартизация плодов рябины // Фармация. – 2003. – № 5. – С. 16-18.
7. Сур С.В., Макаренко О.Г., Герасимчук Т.В.

Методи ідентифікації та кількісного визначення флавоноїдів у рослинних зборах // Фармац. журн. – 2001. – № 4. – С. 85-90.

8. Технология и стандартизация лекарств // Сб. научных трудов. – Харьков: ООО "Рипер", 1996. – 784 с.

9. Alcaraz M., Jimenez M. Flavonoids as anti-inflammatory agents // Fitoterapia. – 1988. – **59**, № 1. – P. 25-38.

10. Baby A.R., Maciel C.P., Kaneko T.M., Velasco M.V. UV spectrophotometric determination of bioflavonoids from a semisolid pharmaceutical dosage form containing *Trichilia catigua* Adr. Juss and *Ptychopetalum olacoides* Benth standardized extract: analytical method validation and statistical procedures // J. AOAC Int. – 2006. – **89**, № 6. – P. 1532-1537.

11. Baranowska I., Rarog D. Application of derivative spectrophotometry to determination of flavonoid mixtures // Talanta. – 2001. – **55**, № 1. – P. 209-212.

12. Carnat A., Lacouture I., Fraisse D., Lamaison J.L. Standardisation de la feuille de bouleau // Ann. Pharm. Fr. – 1996. – **54**, № 5. – P. 231-235.

13. Hui R.H., Hou D.Y., Guan C.X., Liu X.Y. Quantitative determination of total flavonoids in sea-

buckthorn fruit juice by three wavelength spectrophotometry // Guang Pu Xue Yu, Guang Pu Fen Xi. – 2005. – 25, № 2. – P. 266-269.

14. Stratil P., Klejdus B., Kuban V. Determination

of total content of phenolic compounds and their anti-oxidant activity in vegetables-evaluation of spectrophotometric methods // J. Agric. Food Chem. – 2006. – 54, № 3. – P. 607-616.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ЛОСЬОНАХ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОЖИ

Е.В. Рехлецкая, Т.Г. Калинюк, Н.И. Гудзь, Н.К. Федущак

ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ДАНИЛА ГАЛИЦКОГО

Резюме

Предмет исследования – стандартизация лосьонов для лечения инфекционных заболеваний кожи по количественному содержанию флавоноидов как действующих веществ. С целью количественного определения флавоноидов в присутствии кислоты салициловой использовали их способность образовывать окрашенные комплексы с алюминия хлоридом. Оптическую плотность образованных комплексов измеряли при длине волны (408±2) нм. Ошибка метода не превышала 7,69 %.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: лосьон, флавоноиды, спектрофотометрия, алюминия хлорид, стандартный образец.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF FLAVONOIDS IN LOTIONS INTENDED TO INFECTIOUS SKIN DISEASES TREATMENT

O.V. Rekhletska, T.G. Kalynyuk, N.I. Hudz, N.K. Feduschak

LVIV NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY DANYLO HALYTSKY

Summary

The subject of investigation is the standardization of the lotions intended to infectious skin diseases treatment by quantitative amount of flavonoids as active substances. The ability of flavonoids to react with aluminium chloride and to create the coloured complexes has been used. The transmission density of the created complexes has been measured under wave-length (408±2) nm. The margin of errors did not exceed 7,69 %.

KEY WORDS: lotion, flavonoids, spectrophotometry, aluminium chloride, standard sample.

Отримано 19.04.2007 р.

Адреса для листування: О.В. Рехлецька, вул. Сихівська, 12, кв. 81, Львів, 79066, Україна.

**Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua**

УДК 637.127.576

ВИДІЛЕННЯ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНО ГОМОГЕННОЇ ФРАКЦІЇ
β-CN-5P-КАЗЕЇНУ КОРОВ'ЯЧОГО МОЛОКА

В.Г. Юкало, Л.А. Сторож

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. І. ПУЛЮЯ

Запропоновано метод повторної гель-фільтрації для виділення фракції β-казеїну. Вихід електрофоретично гомогенного β-казеїну становив близько 7,5 %. Гель-фільтрацію проводили за умов мінімального впливу денатуруючих факторів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: β-CN-5P-казеїн, гель-фільтрація, електрофорез.

ВСТУП. Казеїнова фракція β-CN-5P-казеїн (далі β-казеїн) є джерелом найбільшої кількості різноманітних біологічно активних пептидів серед білків казеїнового комплексу коров'ячого молока. У процесі протеолітичного розщеплення β-казеїну виявлено пептиди з антигіпертензивною дією, імуномодуляторні пептиди, опіоїдні пептиди, фосфопептиди, пептиди, що стимулюють синтез ДНК, та деякі інші [5]. Для дослідження і моделювання процесів утворення біологічно активних пептидів необхідно використовувати препарати β-казеїну, які є не тільки гомогенними, але і мають максимально збережену структуру та хімічний склад, оскільки це може впливати на специфічність і послідовність протеолізу β-казеїну. Існуючі методи виділення β-казеїну включають дію ряду денатуруючих факторів (рН, температура, органічні розчинники, дезагрегуючі агенти) [3, 7, 8, 9], а також є довготривалими. У зв'язку з цим, актуальною є розробка методу виділення β-казеїну за "м'яких" умов з максимальним збереженням його структури і складу. На основі отриманих в нашій лабораторії результатів було показано, що, незважаючи на близькі значення молекулярних мас, для розділення казеїнів можна використати гель-фільтрацію на сефадексах [1]. При цьому ефективно відділяється лише фракція κ-CN-1P (далі κ-казеїн).

Метою даної роботи було виділення β-казеїну шляхом гель-фільтрації з мінімальним використанням денатуруючих факторів.

© В.Г. Юкало, Л.А. Сторож, 2007.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Загальний казеїн виділяли із знежиреного коров'ячого молока за умов інактивації природних протеолітичних ферментів, як описано у статті [9].

Фракційний склад казеїнів та гомогенність виділених білкових препаратів аналізували методом електрофорезу на вертикальних пластинках поліакриламідного гелю в апараті типу Стадієра, виготовленому в нашій лабораторії. При цьому була використана лужна буферна система однорідного гелю, запропонована раніше [2]. Електрофоретичний буфер і гель готували, використовуючи реактиви фірми "Reanal" (Угорщина).

Гель-фільтрацію проводили на хроматографічній колонці (1,5×70 см, "Reanal", Угорщина), яку заповнювали сефадексом G-150 ("Pharmacia", Швеція), за умов, описаних у статті [1]. Концентрацію білків визначали на спектрофотометрі СФ-46 (λ=180 нм). При цьому використовували встановлені раніше коефіцієнти поглинання ($D_{1\text{см}}^{1\%}$) казеїнів [6].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для фракціонування загального казеїну коров'ячого молока було вибрано сефадекс G-150. На відміну від попередніх досліджень [9], об'єм фракцій, які відбирали на колекторі, зменшили до 2 мл елюенту. Такий підхід дозволив чіткіше встановити хроматографічний профіль казеїнів. Результати гель-фільтрації препарату загального казеїну на колонці із сефадексом G-150 показано на рисунку 1. На хроматограмі можна

умовно виділити три піки. Для ідентифікації казеїнів у складі кожного піку було відібрано й об'єднано фракції, які входили до заштрихованих секторів, як показано на рисунку 1. З об'єднаних фракцій кожного сектора відбирали зразки для електрофоретичного аналізу. Результати електрофорезу показано на рисунку 3. На електрофореграмі видно, що до складу першого піку входять в основному κ -казеїн і сліди β -казеїну. Мінорні фрагменти

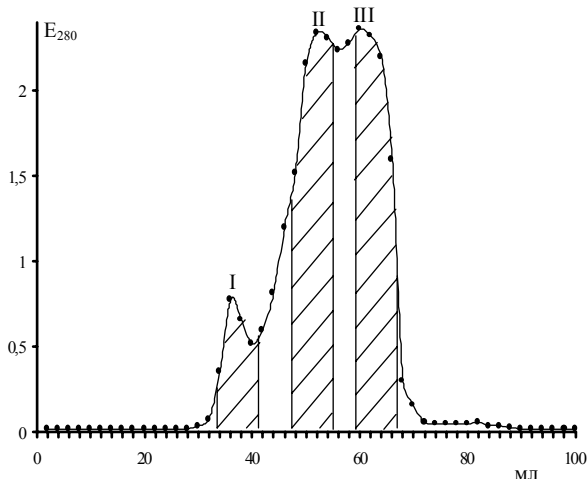


Рис. 1. Хроматограма загального казеїну, одержана на сефадексі G-150. Фракції заштрихованих секторів відбирали для подальшого очищення і електрофоретичного аналізу.

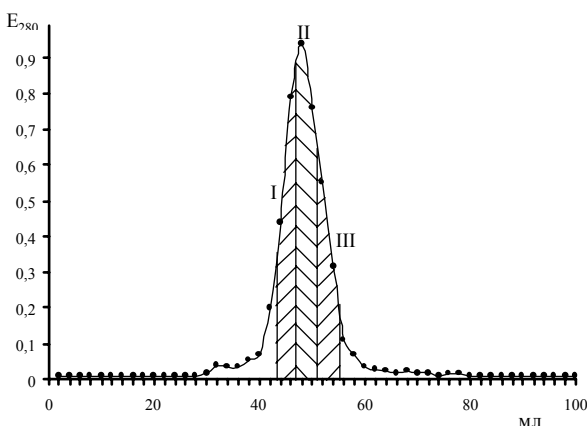


Рис. 2. Хроматограма білків об'єднаних фракцій піку II (див. рис. 1) після розділення загального казеїну на сефадексі G-150.

β -казеїну з низькою електрофоретичною рухливістю відсутні. В обох піках II і III містяться α_s - і β -казеїни. Причому до складу піку II входить більше β -казеїну, а у складі піку III переважають α_s -казеїни.

Розділення α_s - і β -казеїнів при фракціонуванні загального казеїну на сефадексі не ефективне. Це перш за все зумовлено малою різницею їх молекулярних мас – близько 400 Да [4]. Проте нерівномірність співвідношення фракцій α_s - і β -казеїнів при відборі піків II і III свідчить про те, що розділення цих казеїнів певною мірою відбувається (див. рис. 3). У зв'язку з цим, з метою отримання гомогенної фракції β -казеїну ми відбирали не всі хроматографічні фракції, а лише певні сектори піків. Для визначення меж фракцій було проведено повторно гель-фільтрацію об'єднаних фракцій заштрихованої частини піку II (див. рис. 1) на колонці із сефадексом G-150.

Результати гель-фільтрації показано на рисунку 2. На хроматограмі видно один симетричний пік, а також незначну кількість білків, що виходять з колонки з більшим об'ємом елюенту. Фракції піку розділили на три сектори, як показано на рисунку. Білки кожного сектора діалізували, осаджували й аналізували методом електрофорезу в ПААГ. Результати електрофорезу показано на рисунку 3.

Як свідчать результати електрофорезу, в секторі I міститься найбільш очищений β -CN. У секторі II помітні сліди α_{s1} -казеїну. Сектор III містить значну кількість α_s -казеїнів. Також у цьому секторі, за даними електрофорезу, знаходяться фрагмент β -казеїну β -CN-1P (f 29-209), який має меншу молекулярну масу, і α_s -казеїни, які переважно представлені групою α_{s2} -казеїнів. Це можна пояснити більшою масою α_{s2} -казеїнів порівняно з α_{s1} -казеїнами. Отже, із трьох секторів хроматографічного піку лише перший містить електрофоретично чистий β -CN, який може бути використаний для протеолітичного розщеплення. β -CN із сектора II потребує незначного додаткового очищення.

Таблиця 1 – Відсоток виходу κ - і β -казеїнів при фракціонуванні загального казеїну (79,1 мг) на колонці із сефадексом G-150

Етап фракціонування казеїну	Об'єм, мл	E_{280}	Кількість білків, мг	Вихід, %
Загальний казеїн після переосадження із знежиреного молока	7	9,27	79,1	100
Гель-фільтрація загального казеїну (пік I)	8	0,684	5,7	7,21
Повторна гель-фільтрація піку I (κ -казеїн)			3,9 ¹	4,93
Повторна гель-фільтрація піку II (β -казеїнів)	Сектор I		5,9 ¹	7,45
	Сектор II		8,1 ¹	10,24 ²

Примітка. 1 – маса препаратів, ліофільно висушених після діалізу; 2 – препарати, що містять сліди α_{s1} -казеїну.

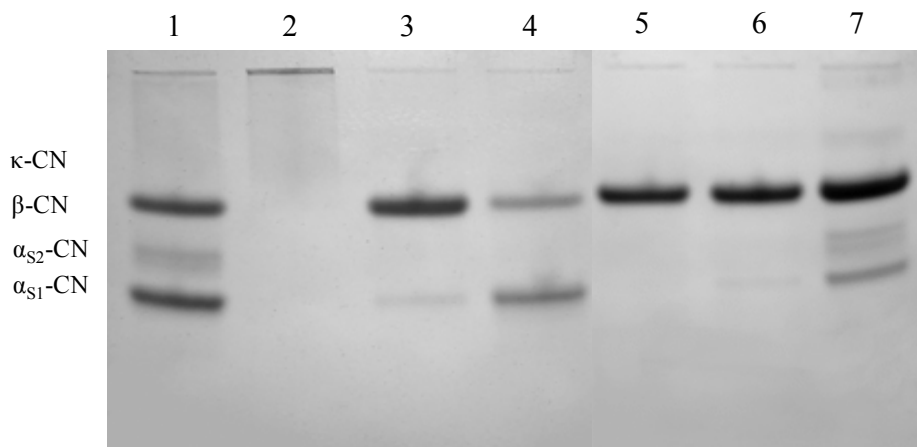


Рис. 3. Електрофореграма загального казеїну (1), об'єднаних фракцій піків I (2), II (3), II (4) після гель-фільтрації на сефадексі G-150; секторів I (5), II (6) і III (7) після повторної хроматографії фракцій піку II (див. рис. 2) на сефадексі G-150.

Таким чином, шляхом повторної гель-фільтрації загального казеїну на сефадексі G-150 можна виділити, окрім κ -казеїну, також електрофоретично гомогенний β -казеїн. Для визначення виходу білків нами була розрахована їх кількість на різних етапах одного повного циклу фракціонування загального казеїну. Концентрацію казеїнів визначали спектрофотометрично за відомими коефіцієнтами поглинання [6]. Після повторної гель-фільтрації кількість білків визначали гравіметрично у діалізованих і ліофільно висушених препаратах. Результати показано в таблиці 1.

Проведені розрахунки показали, що вихід очищеного β -казеїну після повторної гель-фільтрації становить близько 7,5 %, а κ -казеїну – приблизно 5%. Це мале значення для β -казеїну порівняно з іншими методами, при використанні яких вихід перевищує 10 % [8,

9]. Проте метод, що базується на гель-фільтрації, реалізується швидко і включає мінімум дії денатуруючих факторів. Що ж стосується κ -казеїну, то поширений метод із застосуванням сірчаної кислоти (при pH 1,5) і етанолу забезпечує вихід до 6,5 % [3]. При повторній гель-фільтрації вдалося отримати близько 5 % очищеного κ -казеїну.

ВИСНОВКИ. У результаті повторної гель-фільтрації білків казеїнового комплексу коров'ячого молока на колонці із сефадексом G-150 і відбору окремих секторів хроматографічних піків виділено частину β -казеїну в електрофоретично гомогенному стані. Виділення відбувалося за умов мінімального впливу денатуруючих факторів. Вихід гомогенного β -казеїну становив приблизно 7,5 % від кількості препарату загального казеїну.

ЛІТЕРАТУРА

1. Юкало В.Г. Гель-фільтрація білків казеїнового комплексу // Мед. хімія. – 2001. – **3**, № 2. – С. 35-38.
2. Юкало В.Г. Електрофорез білків молока // Мед. хімія. – 2000. – **2**, № 4. – С. 79-82.
3. Coolbear K.P., Elgar D.F., Coolbear T., Ayers J.S. Comparative study of methods for the isolation and purification of bovine κ -casein and its hydrolysis by chymosin // J. Dairy. Res. – 1996. – **63**, № 1. – P. 61-71.
4. Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T. Nomenclature of the proteins of cows' milk – sixth revision // J. Dairy Sci. – 2004. – **87**, № 6. – P. 1641-1674.
5. Hartman R., Meisel H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food appli-

- cations // Current Opinion in Biotechnology. – 2007. – **18**. – P. 163-169.
6. Ribadeau-Dumas B., Grappin R. Milk protein analysis // Lait. – 1989. – **69**, № 5. – P. 357-416.
7. Vreeman H.J., Van Riel J.A.M. The large-scale isolation of α S2-casein from bovine casein // Neth. Milk Dairy J. – 1990. – **44**, № 1. – P. 43-48.
8. Whitney R. Proteins of milk // Fundamentals of dairy chemistry. – Gaithersburg, Maryland: Aspen publishers, 1999. – P. 81-169.
9. Yukalo V.G. Obtaining of casein protein complex fractions from cow milk // Nutracos. – 2005. – № 5. – P. 17-19.

ВЫДЕЛЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИ ГОМОГЕННОЙ ФРАКЦИИ β -CN-5P-КАЗЕИНА КОРОВЬЕГО МОЛОКА

В.Г. Юкало, Л.А. Сторож

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. И. ПУЛЮЯ

Резюме

Предложен метод повторной гель-фильтрации для выделения фракции β -казеина. Выход электрофоретически гомогенного β -казеина составлял приблизительно 7,5 %. Гель-фильтрацию проводили в условиях минимального воздействия денатурирующих факторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: β -CN-5P-казеин, гель-фильтрация, электрофорез.

ISOLATION OF ELECTROPHORETICAL HOMOGENOUS β -CN-5P FRACTION OF COW MILK CASEIN

V.H. Yukalo, L.A. Storozh

TERNOPIL STATE TECHNICAL UNIVERSITY BY I. PULYUI

Summary

The repeated gel-filtration method for isolation of pure β -casein fraction has been offered. The yield of electrophoretically homogenous β -casein on sephadex G-150 was approximately 7,5 %. Gel-filtration has been performed without effect of strong denaturation factors.

KEY WORDS: β -CN-5P-casein, gel-filtration, electrophoresis.

Отримано 23.05.2007 р.

Адреса для листування: В.Г. Юкало, Тернопільський державний технічний університет ім. І. Пулюя, вул. Руська, 56, Тернопіль, 46001, Україна.

Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua

СИНТЕЗ, ПЕРЕТВОРЕННЯ, ПРОТИМІКРОБНА ТА ПРОТИГРИБКОВА АКТИВНІСТЬ У РЯДІ 5-(ПІРИДИН-3-ІЛ)-4-Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТІОНІВ

Ю.В. Маковик, Є.Г. Книш, О.І. Панасенко
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Здійснено синтез нових 5-(піридин-3-іл)-4-Н-1,2,4-триазол-3-тіонів і 3-(алкілтіо)-5-(піридин-3-іл)-4-Н-1,2,4-триазолів. Будову отриманих сполук підтверджено за допомогою елементного аналізу, ІЧ-спектроскопії, а їх індивідуальність – тонкошарової хроматографії. Вивчено протимікробну та проти-грибкову активність синтезованих сполук. Встановлено взаємозв'язок між досліджуваною біологічною активністю і будовою отриманих речовин.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: 1,2,4-триазили, біологічна активність, реакції алкілювання.

ВСТУП. Як відомо з літературних джерел, похідні 3-тіо-1,2,4-триазолу являють собою нетоксичні або малотоксичні [3, 8] сполуки з високою біологічною активністю, перспективні щодо створення нових лікарських препаратів. Тому, займаючись пошуком біологічно активних речовин у ряді 1,2,4-триазолу, ми вважали за доцільне отримати 5-(піридин-3-іл)-4-Н-1,2,4-триазол-3-тіон й 5-(піридин-3-іл)-4-феніл-1,2,4-триазол-3-тіон і на їх основі синтезувати ряд алкілтіопохідних, а також вивчити протимікробну і протигрибкову активність одержаних речовин.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. 5-(піридин-3-іл)-4-Н-1,2,4-триазол-3-тіон (I а) та 4-феніл-5-(піридин-3-іл)-4Н-1,2,4-триазол-3-тіон (I б) [1] (табл. 1) отримано шляхом циклізації в лужному середовищі відповідних 2-(3-піридил)-1-гідразинокарбтіоаміду і 2-(3-піридин)-N-феніл-1-гідразинокарбтіоаміду [3, 5, 6, 7].

Сполуки (I а, б) являють собою кристалічні речовини жовтого кольору, важкорозчинні у воді, розчинні в лугах, кислотах та органічних розчинниках. Для аналізу тіони (I а, б) очищено шляхом перекристалізації із диметилформаміду.

Продовжуючи пошук біологічно активних сполук у ряді 1,2,4-триазолу, нами проведено алкілювання тіонів (I а, б) галоїдними алканами (етилом йодистим, пропілом йодистим, ізопропілом йодистим, амілом йодистим, гепти-

лом хлористим, октилом бромистим, децилом хлористим).

Отримані 3-алкілтіопохідні являють собою кристалічні речовини білого (II в, з) або жовтого (II а, б, г-ж, і) кольору, важкорозчинні у воді, водних розчинах лугів, розчинні в органічних розчинниках. Для аналізу сполуки (II а, б, г-і) перекристалізовано із суміші "метанол-вода" (1:3), сполуку (II в) – із суміші "етанол-вода" (1:1).

Будову синтезованих речовин підтверджено за допомогою елементного аналізу та ІЧ-спектроскопії, а їх індивідуальність – тонкошарової хроматографії [2].

Для синтезованих сполук було вивчено протимікробну і протигрибкову активність [4]. Результати наведено в таблиці 2.

Експериментальна хімічна частина. 5-(піридин-3-іл)-4-Н-1,2,4-триазол-3-тіон I а (табл. 2).

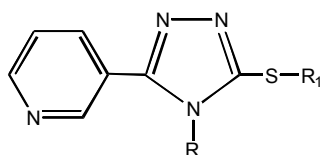
До 30 мл 5 % водного розчину гідроокису натрію додають 0,01 М 2-(3-піридил)-1-гідразинокарбтіоаміду. Суміш кип'ятять 1 год, додають ацетатної кислоти до pH=7, осад відфільтровують.

4-феніл-5-(піридин-3-іл)-4Н-1,2,4-триазол-3-тіон I б (див. табл. 2).

До 30 мл 5 % водного розчину гідроокису натрію додають 0,01 М 2-(3-піридин)-N-феніл-1-гідразинокарбтіоаміду. Суміш кип'ятять 1 год, додають ацетатної кислоти до pH=7, осад відфільтровують.

3-(алкілтіо)-5-(піридин-3-іл)-4-Н-1,2,4-триазили II а-і (див. табл. 2).

Таблиця 1 – 5-(піридин-3-іл)-4-R-1,2,4-триазол-3-іони (I а, б) та 3-(алкілтіо)-5-(піридин-3-іл)-4-R-1,2,4-триазолі (II а-і)



Сполука	R	R ₁	Температура плавлення, °C	Брутто-формула
I а	H	H	288-290	C ₇ H ₆ N ₄ S
I б	C ₆ H ₅	H	163-165	C ₁₃ H ₁₀ N ₄ S
II а	H	C ₃ H ₇	147-149	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ S
II б	H	C ₃ H ₇ -i	131-133	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ S
II в	H	C ₅ H ₁₁	171-173	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ S
II г	C ₆ H ₅	C ₂ H ₅	193-195	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ S
II д	C ₆ H ₅	C ₂ H ₇	120-122	C ₁₆ H ₁₆ N ₄ S
II е	C ₆ H ₅	C ₅ H ₁₁	133-135	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ S
II ж	C ₆ H ₅	C ₇ H ₁₅	210-212	C ₂₀ H ₂₄ N ₄ S
II з	C ₆ H ₅	C ₈ H ₁₇	69-71	C ₂₁ H ₂₆ N ₄ S
II і	C ₆ H ₅	C ₁₀ H ₂₁	95-97	C ₂₃ H ₃₀ N ₄ S

Продовження табл. 1

Сполука	Вирахувано, %		Знайдено, %		Вихід, %
	N	S	N	S	
I а	31,46	17,98	31,44	17,95	85,7
I б	22,05	12,59	22,03	12,60	95,6
II а	25,45	14,55	25,44	14,52	83,4
II б	25,45	14,55	25,43	14,55	72,2
II в	22,58	12,91	22,55	12,89	62,1
II г	19,86	11,35	19,83	11,33	69,9
II д	18,92	10,81	18,89	10,78	80,2
II е	17,28	9,88	17,26	9,90	74,2
II ж	15,91	9,09	15,93	9,88	80,7
II з	15,30	8,74	15,33	8,70	75,2
II і	14,21	8,12	14,17	8,09	81,9

Таблиця 2 – Протимікробна активність 3-(алкілтіо)-5-(піридин-3-іл)-4-R-1,2,4-триазолів

Сполука	S. aureus	B. anthrac	E. coli	Ps. Aeru-ginosa	Pr. vulgaris
II а		200	400		
II б					
II в		400			
II г				400	
II д			400		200
II е	100	100	400		
II ж					400
II з		100	200	100	
II і	100	25	50		200
Етакридину лактат	60,3	125	50	62,5	125
Фурацилін	4,0	32	50	50	250

До розчину 0,01 М NaOH в 30 мл етанолу додають 0,01 М відповідного тіону (I а, б) та 0,01 М відповідного галогеналкану. Суміш кип'ятять до нейтрального середовища, фільтрують, фільтрат випаровують.

Протимікробну активність вивчали на окремих тест-культурах мікроорганізмів, представниках як грампозитивної, так і грамнегативної мікрофлори, таких, як стафілокок (S. aureus),

антракоїд (B. anthrac.), кишкова паличка (E. coli), протей (Pr. vulgaris), синегнійна паличка (Ps. aeruginosa).

Антимікробну активність оцінювали методом мінімальної бактеріостатичної концентрації хімічної речовини в мкг/мл [6]. Як еталони порівняння використовували етакридину лактат та фурацилін. Результати досліджень наведено в таблиці 2.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В ІЧ-спектрах тіонів I а, б наявні смуги поглинання $\text{C}=\text{N}$ -груп – $1600\text{--}1550\text{ см}^{-1}$, $\text{C}-\text{S}$ -груп – $700\text{--}680\text{ см}^{-1}$ та смуги при $2590\text{--}2550\text{ см}^{-1}$, що характеризують валентні коливання SH -груп. Крім того, в ІЧ-спектрі тіону I а, а також продуктів його алкілювання (II а-в) виявлено смуги поглинання NH -груп у межах $3550\text{--}3500\text{ см}^{-1}$. В ІЧ-спектрах сполук (I б, II г-і) виявлено чіткі смуги у межах $1620\text{--}1550\text{ см}^{-1}$, що свідчить про наявність C_6H_5 -груп. В ІЧ-спектрах 3-алкілтіо-1,2,4-триазолів (II а-і) смуги поглинання SH -груп відсутні.

Як видно з отриманих даних, сполуки даного класу мають помірну протимікробну дію, особливо відносно стафілокока, антракоїду та кишкової палички. Причому сполуки, що містять фенільний радикал (II г-і), в четвертому положенні 1,2,4-триазолового циклу проявля-

ють більш виражений протимікробний ефект. Подовження вуглеводневого ланцюга алкільного радикала також підсилює протимікробний ефект. Особливу увагу привертає 3-децилтіо-5-(4-піридил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол (IIi), що дорівнює або перевищує за показниками своєї активності еталони порівняння – фурацилін і етакридину лактат.

ВИСНОВКИ. Синтезовано 5-(піридин-3-іл)-4-*R*-1,2,4-триазол-3-тіони (I а, б) та 3-(алкілтіо)-5-(піридин-3-іл)-4-*R*-1,2,4-триазоли (II а-і). Будову отриманих сполук підтверджено за допомогою елементного аналізу, ІЧ-спектроскопії, а їх індивідуальність – тонкошарової хроматографії. Вивчено протимікробну та протигрибкову активність синтезованих сполук. Встановлено взаємозв'язок між досліджуваною біологічною активністю і будовою отриманих речовин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Казлицына Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ПМР-спектроскопии в органической химии. – М.: Высшая школа, 1971. – 264 с.
2. Маковик Ю.В., Кныш Е.Г., Панасенко А.И. Производные 5-бензилиден-2-(пиридин-3-ил)-тиазоло-(3,2-В)-1,2,4-триазол-6-(5Н)-онов как биологические активные вещества //Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. – Запоріжжя, 2004. – Вип. XII. – С. 223-226.
3. Панасенко О.І. Синтез, перетворення, фізико-хімічні та біологічні властивості похідних 1,2,4-триазолу: Дис... д-ра фармац. наук. – К., 2005. – 396 с.
4. Парченко В.В., Маковик Ю.В., Кныш Е.Г. Изучение противомикробной и противогрибковой активности некоторых производных 5-гетерил-2,4-дигидро-1,2,4-триазол-3-тионов, 2-бензилиден-1,2,4-триазоло-(3,4-В)-тиазол-3-(2Н)-онов и бензилиденгидразидов-5-гетарил-2,4-дигидро-1,2,4-триазол-3-меркаптоуксусных кислот //Актуальні питання

фармац. та мед. науки та практики. – Запоріжжя, 2004. – Вип. XII. – С. 72-76.

5. Парченко В.В., Маковик Ю.В., Панасенко О.І. 5-*R*-2,4-дигідро-1,2,4-триазол-3-тіооцтові кислоти та їх солі як біологічно активні сполуки //Запоріжский медицинский журнал. – 2004. – 2, № 1. – С. 37-39.

6. Парченко В.В., Панасенко А.И., Кныш Е.Г. Синтез и биологическая активность некоторых алкилпроизводных 5-фуран-2-ил-4-фенил-2,4-дигидро-1,2,4-триазол-3-тионов //Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики. – Запоріжжя, 2005. – Вип. XIV. – С. 263-266.

7. Pat. 2824325 France. Nouveaux derivatives d'azole ou de triazole, leur precede de preparation et leur application comme fungicides // D. Barbin, J. Weston (France). – Decl. 28.1.92, publ. 08.11.02.

8. Yale Harry L., Pila Josef J. Substituted 1,2,4-triazoles and their compounds // J. Med. Chem. – 1966. – № 1. – P. 42-46.

СИНТЕЗ, ПРЕВРАЩЕНИЕ, ПРОТИВОМИКРОБНАЯ И ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ В РЯДУ 5-(ПИРИДИН-3-ИЛ)-4-*R*-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ТИОНОВ

Ю.В. Маковик, Е.Г. Кныш, А.И. Панасенко
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Осуществлен синтез новых 5-(пиридин-3-ил)-4-*R*-1,2,4-триазол-3-тионов и 3-(алкилтио)-5-(пиридин-3-ил)-4-*R*-1,2,4-триазолов. Строение полученных соединений подтверждено при помощи элементного

анализа, ИК-спектроскопии, а их индивидуальность – тонкослойной хроматографии. Изучена противомикробная и противогрибковая активность синтезированных соединений. Установлено взаимосвязь между исследуемой биологической активностью и строением полученных веществ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **1,2,4-триазолы, биологическая активность, реакции алкилирования.**

SYNTHESIS, TRANSFORMATION, ANTIMICROBICAL AND ANTIFUNGUS ACTIVITY OF 5-(PYRIDIN-3-IL)-4-R-1,2,4- TRIAZOLE-3-THIONS

Yu.V. Makovyk, Ye.H. Knysh, O.I. Panasenko
ZAPORIZHYAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Summary

The synthesis of new 5-(pyridin-3-il)-4-R-1,2,4-triazol-3-thions and 3-(alkilthio)-5-(pyridin-3-il)-4-R-1,2,4-triazoles has been carried out. The structure of receiving substances has been confirmed by means of element analysis, IR-spectroscopy and their individuality – by means of thin-layer chromatography. The antimicrobial, and antifungus activity of synthesized compounds has been investigated. The relationship between researched biological activity and structure of obtained substances has been established.

KEY WORDS: **1,2,4-triazoles, biological activity, alkilliration reactions.**

Отримано 20.12.2006 р.

Адреса для листування: Ю.В. Маковик, вул. Вороніна, буд. 9а, кв. 19, Запоріжжя, 69120, Україна.

**Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua**

КІЛЬКІСНИЙ ОПИС ВЗАЄМОДІЇ НАНОРОЗМІРНОГО КРЕМНЕЗЕМУ З ЕРИТРОЦИТАМИ

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

Представлено кількісний опис адсорбційної взаємодії нанорозмірного кремнезему з поверхнею еритроцитів. Показано, що ця взаємодія підпорядковується рівнянню, що характеризує взаємодію лікарських речовин з рецепторами плазматичної мембрани клітин. Результати статті можуть бути корисними для розробки тесту визначення неоднорідності еритроцитів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: адсорбція, нанорозмірний кремнезем (нано-SiO₂), еритроцити, гемоліз.

ВСТУП. У зв'язку із значним розповсюдженням нанотехнологій, у тому числі впровадженням високо- та нанодисперсних матеріалів у медицину, виникає потреба поглибленого вивчення взаємодії мінеральних наночастинок з клітинами організму. Цей напрям можна окреслити як попереднє біотестування дисперсних матеріалів, або вивчення їх біосумісності.

Як перспективний для впровадження в біомедицину галузь матеріал останнім часом розглядають нанорозмірний діоксид кремнію (нано-SiO₂). На основі нано-SiO₂ створено ентросорбент "Силікс" і кілька комплексних препаратів для лікування ран [2, 6]. Очевидно, взаємодія частинок нано-SiO₂ з поверхнею клітини макроорганізму або одноклітинного організму впливатиме на їх життєві функції, такі, як стан мембрани і транспортування речовин через неї, швидкість ділення клітини і т. ін. [7, 12]. Розгляд біологічного впливу нано-SiO₂ на клітину виходить за межі даної роботи. Хімічному механізму взаємодії реакційних центрів поверхні кремнезему з біомембранами присвячено чимало робіт [4], але в них не розглядається кількісна оцінка такої взаємодії.

У багатьох роботах наводяться результати вивчення взаємодії нано-SiO₂ з еритроцитами людини *in vitro*, наслідком якої є гемоліз. Ці дослідження мають прикладний інтерес, оскільки за їх допомогою можна типувати еритроцити з діагностичною метою [1, 4, 11], здійснювати швидкий контроль якості донорської

крові [5]. Наприклад, для гематології важливим є визначення спектра еритроцитів крові з огляду на їх функціональну неоднорідність, зокрема неоднакову стійкість до дії гемолітичних агентів. На даний час запропоновано багато методик встановлення неоднорідності еритроцитів: вивчення осмотичної резистентності [8], метод кислотних еритрограм [5] і т. ін.

Метою даного теоретичного дослідження було на прикладі гемолітичної дії нано-SiO₂ на еритроцити людини розробити загальний підхід до кількісної оцінки адсорбційної взаємодії наночастинок з поверхнею клітини.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом дослідження були літературні джерела інформації, у тому числі власні дані, що містять результати вивчення гемолітичних властивостей кремнеземів. Для побудови кількісної теорії користувалися методами зіставлення та узагальнення.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Для створення кількісної теорії взаємодії мембранопшкоджувальних мінеральних наночастинок з поверхнею клітини було вибрано еритроцити людини, які доволі часто використовують у біофізичних моделях. Ступінь пошкодження еритроцитів зазвичай оцінюють за кількістю гемоглобіну, що вивільняється під час гемолізу [1]. Якщо порівнювати графік залежності ступеня кремнеземіндукованого гемолізу від концентрації нано-SiO₂, який наведений, наприклад, в роботі [13], з адсорбцією білків на поверхні кремнезему, яка описана як

ізотерма адсорбції Ленгмюра [3, 10], то схожість залежностей є очевидною (рис. 1). Іншими словами, адсорбція частинок нано-SiO₂ на еритроцитах, що призводить до гемолізу, й адсорбція білків на поверхні нано-SiO₂ підпорядковуються однаковим концентраційним закономірностям. Як відомо, класична ізотерма Ленгмюра є графічним відображенням закону діючих мас і описує процес насичення [9]. Є й інші, біологічно значущі процеси, які відповідають закону діючих мас та підпорядковуються аналогічним рівнянням, наприклад: 1) кінетика утворення ферментосубстратного комплексу, що підпорядковується рівнянню Михаеліса-Ментен і 2) взаємодія лікарської речовини (ЛР) з рецепторами клітинних мембран, описана рівняннями класичної теорії дії ліків (фізико-хімічної фармакології) Кларка-Аренса [9]. Очевидно, остання модель є найбільш адекватною для кількісного опису процесу кремнеземіндукованого гемолізу. Це зумовлено, по-перше, аналогією між молекулами ЛР і наночастинками SiO₂, що відіграють роль "ефекторів" (термін теорії Кларка-Аренса), а по-друге, обидва процеси включають дві однакові, за сутністю, стадії: 1) адсорбцію ЛР або наночастинок SiO₂ на реакційних центрах чи рецепторах мембрани і 2) відповідь клітини у вигляді фармакологічного ефекту або гемолізу.

Адсорбція нано-SiO₂ на мембрані відповідає рівновазі:



де [R] – концентрація незайнятих центрів адсорбції (рецепторів) на мембрані; [R·SiO₂] – концентрація комплексів "рецептор-частинка SiO₂".

Відповідна константа рівноваги:

$$K = \frac{[R \cdot SiO_2]}{[R][SiO_2]}. \quad (2)$$

Далі для константи дисоціації маємо:

$$K_{-1} = \frac{\{R_{max} - [R \cdot SiO_2]\}[SiO_2]}{[R \cdot SiO_2]}, \quad (3)$$

де R_{max} – загальна кількість центрів адсорбції на мембрані.

З попереднього рівняння випливає:

$$[R \cdot SiO_2] = \frac{R_{max}[SiO_2]}{K_{-1} + [SiO_2]} \quad (4)$$

або

$$C_{R \cdot SiO_2} = \frac{R_{max} C_{SiO_2}}{K_{-1} + C_{SiO_2}}. \quad (5)$$

Згідно з теорією Кларка-Аренса, величина фармакологічного ефекту прямо пропорційна концентрації комплексів $E = \alpha[R \cdot LB]$, де коефі-

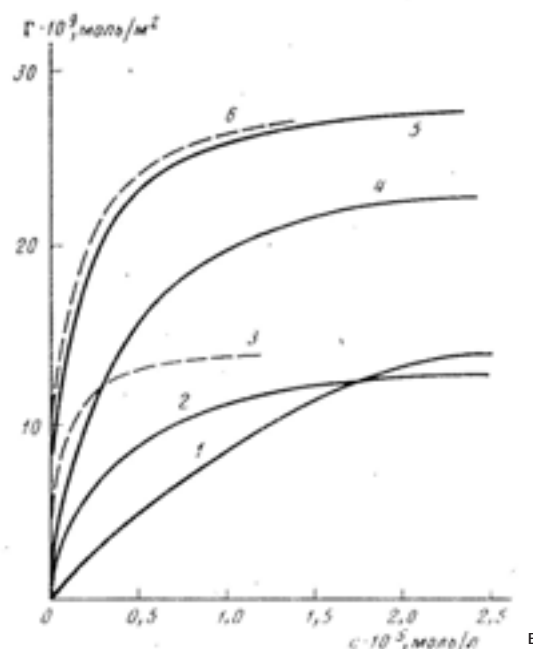
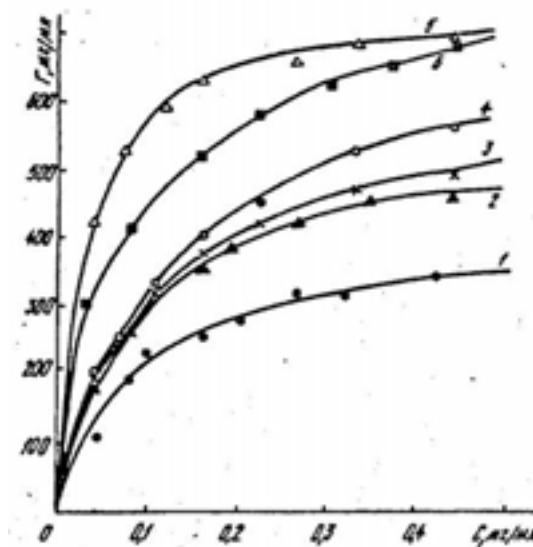
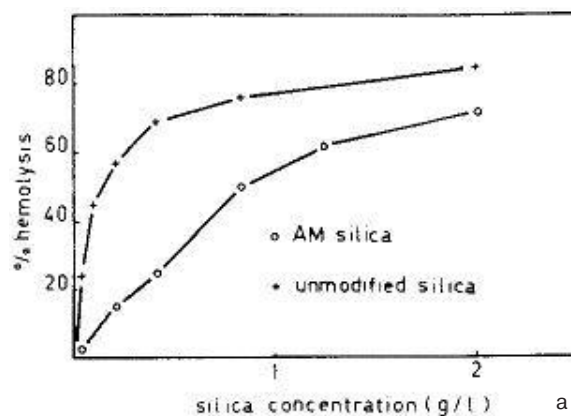


Рис. 1. Залежність ступеня гемолізу від концентрації нано-SiO₂ в суспензії (а) за даними [13]; ізотерми адсорбції білків (сироваткового і яєчного альбумінів, гемоглобіну) на поверхні нано-SiO₂ (б, в) за даними [3, 10].

цієнтом пропорційності α слугує константа внутрішньої активності. При гемолізі це виглядає таким чином:

$$D = \alpha[R \cdot \text{SiO}_2], \quad (6)$$

де D – спектральна оптична густина, яку використовують як міру гемолізу. Іншими словами, для того щоб нано- SiO_2 викликав гемоліз, недостатньо лише адсорбції на рецепторах, а необхідно, щоб взаємодія з рецепторами була ефективною (гемолітичною). Якщо $\alpha=0$, то, незалежно від кількості адсорбованого нано- SiO_2 , гемоліз відсутній (взаємодія кремнезему з резистентними еритроцитами), якщо $\alpha=1$, то кожна адсорбована частинка SiO_2 призводить до гемолізу (взаємодія зі старими еритроцитами).

За одиницю виміру взято ступінь гемолізу, який визначають за оптичною густиною певної смуги поглинання гемоглобіну $D/D_{\max}$ (зазвичай виражають у відсотках). Виходячи з рівняння (4), можна записати рівняння для ступеня гемолізу:

$$\gamma = \frac{[R \cdot \text{SiO}_2]}{R_{\max}} = \frac{[\text{SiO}_2]}{K_{-1} + [\text{SiO}_2]} \quad (7)$$

або

$$\gamma = \frac{K[\text{SiO}_2]}{1 + K[\text{SiO}_2]}. \quad (8)$$

З рівняння (7) випливає, що K_{-1} дорівнює рівноважній концентрації $[\text{SiO}_2]$, при якій реєструється 50 % гемоліз. Рівняння (8) є аналогом рівняння Ленгмюра, на основі якого можна оцінити зміну вільної енергії відповідного процесу:

$$\Delta G = -RT \ln \left(\frac{\gamma}{[\text{SiO}_2](1-\gamma)} \right). \quad (9)$$

Наведені рівняння описують гемоліз еритроцитів, представлених однією популяцією з однаковою константою внутрішньої активності. У реальній крові пул еритроцитів складається з кількох популяцій ("юні", "дорослі", "старі", патологічно змінені еритроцити і т. ін.). Відповідь кожної з популяцій на адсорбцію нано- SiO_2 може бути неоднаковою. Незважаючи на те, що межі між популяціями розмиті, і-попу-

ляцію можна охарактеризувати власною константою внутрішньої активності α_i і її внесок у загальний гемоліз має такий вигляд:

$$D_i = \gamma \alpha_i \frac{m_i}{m} R_{\max}, \quad (10)$$

де m_i – кількість еритроцитів в i -популяції; m – загальна кількість еритроцитів у пулі.

Сумарний гемоліз буде описаний рівнянням:

$$D = \frac{\gamma R_{\max}}{m} \sum_{i=1}^n \alpha_i m_i. \quad (11)$$

Рівняння (11) одержано для спрощеної моделі, в якій $R_{\max}$ однакова для усіх різновидів еритроцитів, тобто резистентність клітин до гемолізу визначається лише внутрішніми властивостями мембрани, а не кількістю рецепторів, яка може бути неоднаковою для різних популяцій:

$$D = \frac{\gamma}{m} \sum_{i=1}^n \alpha_i m_i R_{\max,i}. \quad (12)$$

Рівняння (12) є узагальнюючим, тобто таким, що враховує відповідь усього пулу еритроцитів на мембранопшкоджувальну дію нано- SiO_2 . Наведені рівняння можна розглядати як теоретичне підґрунтя для розробки методики типування еритроцитів за допомогою стандартизованої суспензії нано- SiO_2 . Матеріал статті може бути цікавим для гематологів, лікарів-лаборантів, спеціалістів з фізико-хімії поверхні.

ВИСНОВКИ. 1. Процес адсорбції нанорозмірного діоксиду кремнію (нано- SiO_2) на поверхні еритроцитів і взаємодія лікарських речовин з рецепторами плазматичних мембран клітин кількісно описуються однаковим рівнянням, що характеризує процес насичення.

2. Адсорбційна взаємодія нано- SiO_2 з еритроцитами людини призводить до гемолізу, ступінь якого залежить від функціональної неоднорідності пулу еритроцитів крові. Запропоновано рівняння, яке враховує внесок кожної популяції в сумарний гемоліз.

ЛІТЕРАТУРА

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

2. Геращенко И.И. Силикс – отечественный сорбент многоцелевого назначения // Провизор. –

2005. – № 9. – С. 22-23.

3. Геращенко И.И., Штатко Е.И., Богомаз В.И. Изучение обратимости процесса адсорбции белка на дисперсном кремнеземе // Коллоид. журн. – 1992. – **54**. – С. 226-229.

4. Геращенко И.И., Штатко Е.И., Бондарчук О.И., Чуйко Н.А. Мембранотропные свойства силикса //

В кн.: Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. – К.: Наукова думка, 2003. – С. 168-179.

5. Горбачевский Г.К., Игнатенко В.А., Кузнецов Б.К. Метод определения неоднородности периферического пула эритронов // Здравоохранение. – 1997. – Вып. 8. – С. 22-24.

6. Желіба М.Д., Чепляка О.М., Геращенко І.І. та ін. Вивчення фізико-хімічних, антимікробних та лікувальних властивостей композиції "Метроксан" // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2006. – № 6. – Р. 125-129.

7. Курдиш І.К., Чуйко А.А. Особенности взаимодействия микроорганизмов с высокодисперсным кремнеземом // В кн.: Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния. – К.: Наукова думка, 2003. – С. 153-167.

8. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.

9. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. Рецепторы физиологически активных веществ. – М.: Медицина, 1987. – 400 с.

10. Тертышная Е.В., Геращенко И.И., Луцюк Н.Б. и др. Влияние технологических особенностей производства высокодисперсного кремнезема на его белоксорбирующую способность // Укр. хим. журн. – 1996. – 62, № 12. – С. 87-90.

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

12. Gerashchenko B.I., Gerashchenko I.I., Kosaka T., Hosoya H. Stimulatory effect of aerosol on algal growth // Canadian J. Microbiol. – 2002. – 48. – Р. 170-175.

13. Depasse J. Influence of the sialic acid content of membranes on their sensitivity to silica and aluminate-modified silica // Environ. Research. – 1978. – 16. – Р. 88-91.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПИСАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОРАЗМЕРНОГО КРЕМНЕЗЕМА С ЭРИТРОЦИТАМИ

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

Резюме

Представлено количественное описание адсорбционного взаимодействия наноразмерного кремнезема с поверхностью эритроцитов. Показано, что данное взаимодействие подчиняется уравнению, характеризующему взаимодействие лекарственных веществ с рецепторами плазматической мембраны клеток. Результаты статьи могут быть полезными для разработки теста определения неоднородности эритроцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: адсорбция, наноразмерный кремнезем (нано-SiO₂), эритроциты, гемолиз.

QUANTITATIVE DESCRIPTION OF INTERACTION BETWEEN SILICA NANOPARTICLES AND RED BLOOD CELLS

I.I. Herashchenko, V.M. Hunko, O.O. Hatskiy
NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY O.O. BOHOMOLET
INSTITUTE OF SURFACE CHEMISTRY OF NAS OF UKRAINE, KYIV

Summary

The quantitative aspects of adsorption interaction between silica nanoparticles and erythrocyte surface are analyzed. It has been demonstrated that this interaction obeys an equation describing the interaction between the drug molecules and the receptors of cell membranes. Results of this work could be helpful for elaboration of a technique for determination of the heterogeneity of red blood cells.

KEY WORDS: adsorption, nano-sized silica (nano-SiO₂), erythrocytes, hemolysis.

Отримано 29.01.2007 р.

Адреса для листування: І.І. Геращенко, Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, вул. Пушкінська, 22, Київ, 01000, Україна.

СИНТЕЗ ТА ФАРМАКОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ У РЯДІ 5-БЕНЗИЛІДЕН-2-(2-,3-,4-НІТРОФЕНІЛ)ТІАЗОЛО[3,2-b][1,2,4]ТРІАЗОЛ-6-(5H)-ОНІВ

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

Синтезовано ряд нових 5-бензиліден-2-(2-,3-,4-нітрофеніл)тіазоло[3,2-b][1,2,4]тріазол-6-(5H)-онів. Структуру синтезованих сполук підтверджено елементним аналізом, ІЧ-спектроскопією і ПМР-спектрометрією, а їх індивідуальність – хроматографічно. Досліджено протимікробну, протигрибкову активність отриманих речовин і їх гостру токсичність. Встановлено закономірності "будова-дія". Вивчається діуретична, протисудомна та протизапальна активність.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: 1,2,4-тріазоли, біологічна активність.

ВСТУП. Постійний попит на лікарські засоби потребує все більших зусиль, спрямованих на створення нових оригінальних лікарських препаратів. Останнім часом велику увагу привертають дослідження вітчизняних [4, 5] і зарубіжних [7, 8] вчених, які працюють над пошуком біологічно активних сполук серед гетероциклічних систем. Так, за останні п'ять років створено препарати на основі 1,2,4-тріазолу "Ітраконазол", "Сперконазол" [3]. Привертають до себе увагу такі препарати, як "Румосол", "Магнесол" [5, 6], що також є похідними 1,2,4-тріазолу і перебувають на етапі впровадження у виробництво. Слід відзначити і біоактивність похідних тіазолу. Так, кокарбоксилаза, левамизол, бензилпеніцилін, ампіцилін мають високі фармакологічні показники і досить тривалий час користуються попитом на фармацевтичному ринку [3].

Але не слід забувати про високі біологічні властивості препаратів ароматичного або гетероциклічного ряду, що містять нітрофенільні замісники [3].

При плануванні експерименту ми вирішили дослідити, чи приведе поєднання вищезгаданих хімічних систем в одну структуру до підсилення фармакологічної активності або появи нових видів біологічної дії. Підсумовуючи вищесказане, а також спираючись на результати власних досліджень [2, 5], ми провели синтез 5-бензилідентіазоло[3,2-b][1,2,4]тріазол-6-(5H)-онів, вивчили їх біологічну дію та встановили закономірності між хімічною будовою і

фармакологічною активністю сполук даного ряду.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Як вихідні речовини використовували 2-(5-(2-,3-,4-нітрофеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)-ацетатні кислоти (I а-в) [2], які під дією ангідриду ацетатної кислоти перетворюються в сполуки формули III (схема 1, табл. 1).

Шляхом нагрівання кислот I з карбонільними сполуками в середовищі ацетатної кислоти в присутності ангідриду ацетатної кислоти нами було отримано ряд речовин формули IV а-л (див. схема 1, табл. 1).

Теоретично циклізація тіоацетатних кислот може проходити з утворенням відповідних 5-бензилідентіазоло[3,2-b][1,2,4]тріазол-6-(5H)-онів, ізомерних 6-бензилідентіазоло-[2,3-с][1,2,4]тріазол-5-онів або суміші цих сполук.

За елементним складом речовини III а-в і IV а-л, індивідуальність яких підтверджена методом тонкошарової хроматографії, відповідають ізомерним 5-бензилідентіазоло[3,2-b][1,2,4]тріазол-6-(5H)-онам і 6-бензилідентіазоло-[2,3-с][1,2,4]тріазол-5-онам. За даними рентгеноструктурного аналізу, остаточно встановлено, що циклізація 1,2,4-тріазол-3-тіоацетатних кислот під дією ангідриду ацетатної кислоти проходить з утворенням 5-бензилідентіазоло[3,2-b][1,2,4]тріазол-6-(5H)-онів. Зважаючи на те, що циклізацію 2-(5-(2-,3-,4-нітрофеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)-ацетатних кислот проводили в аналогічних умовах, можна стверджувати, що отримані сполуки формули

© А.Г. Каплаушенко, Є.Г. Книш, О.І. Панасенко, 2007.

III є 2-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)тіазоло[3,2-b][1,2,4]тріазол-6(5H)онами, речовини формули IV – 5-бензиліден-2-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)тіазоло[3,2-b][1,2,4]тріазол-6-(5H)-онами.

5-(4-(Диметиламіно)бензиліден)-2-(4-нітрофеніл)тіазоло[3,2-b][1,2,4]тріазол-6(5H)-он (IV л) синтезований також шляхом нагрівання ізоамілового естеру 2-(5-(4-нітрофеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)-ацетатної кислоти (II) з 4-диметиламінобензальдегідом у середовищі ацетатної кислоти під дією ангідриду ацетатної кислоти або взаємодією 2-(4-нітрофеніл)тіазоло[3,2-b][1,2,4]тріазол-6(5H)ону з 4-диметиламінобензальдегідом шляхом нагрівання в етанолі (див. схема 1). Змішана проба речовини IV л, отриманої різними методами, не дала депресії температури плавлення.

2-(2-, 3-, 4-Нітрофеніл)тіазоло[3,2-b][1,2,4]тріазол-6(5H)-они (III а-в, див. табл. 1)

Суміш 0,01 моль відповідної 2-(5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)-ацетатної кислоти (I а-в), 15 мл ацетатної кислоти та 10 мл ангідриду ацетатної кислоти кип'яють 1 год, охолоджують, осаді сполук II а-в відфільтровують.

Жовті кристалічні сполуки не розчинні у воді, розчинні в органічних розчинниках, для аналізу очищені перекристалізацією з ацетатної кислоти.

5-Бензиліден-2-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)тіазоло[3,2-b][1,2,4]тріазол-6(5H)-они (IV л, див. табл. 1)

А. Суміш 0,01 моль відповідної 2-(5-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)-ацетатної кислоти (I а-в), 0,01 моль відповідної карбонільної сполуки (н-бутаналь, бензальдегід,

о-метоксибензальдегід, п-хлорбензальдегід, п-нітробензальдегід, 3-окси-4-метоксибензальдегід, 2-окси-5-бромбензальдегід, 4-диметиламінобензальдегід), 15 мл ацетатної кислоти та 10 мл ангідриду ацетатної кислоти кип'яють 1 год, охолоджують, осаді сполук IV а-л відфільтровують.

Б. Суміш ізоамілового естеру 2-(5-(4-нітрофеніл)-1,2,4-тріазол-3-тіо)-ацетатної кислоти (II), 0,01 моль п-диметиламінобензальдегіду, 15 мл ацетатної кислоти і 10 мл ангідриду ацетатної кислоти кип'яють 1 год, охолоджують, осад сполуки IV л відфільтровують.

Жовті (IV а-к) або червона (IV л) кристалічні сполуки малорозчинні у воді, розчинні в органічних розчинниках. Для аналізу сполуки IV а-л перекристалізовані з ацетатної кислоти.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. В ІЧ-спектрах сполук III а-в, V а-л наявні смуги поглинання -C=N-груп – 1600-1550 cm^{-1} , CO-груп – 1725-1616 cm^{-1} , смуги поглинання ароматичного кільця в межах 1615-1600 cm^{-1} , а також симетричні й асиметричні смуги коливань ароматичних груп -NO₂ в межах 1515-1505 cm^{-1} і 1350-1335 cm^{-1} відповідно. ІЧ-спектр сполуки VI г додатково має смуги поглинання при 2975-2950 cm^{-1} і 1250-1175 cm^{-1} , що може свідчити про наявність, відповідно, метильного або метиленового радикала. Слід відзначити, що в ІЧ-спектрах сполук III а-в, V а-л відсутні смуги поглинання NH-груп у ділянці 3500 cm^{-1} , що також підтверджує проходження реакції циклізації [1].

У ПМР-спектрі 2-(4-нітрофеніл)тіазоло[3,2-b][1,2,4]тріазол-6(5H)ону виявлено сигнали протонів фенільного радикала при 7,8-8,3 м.ч.,

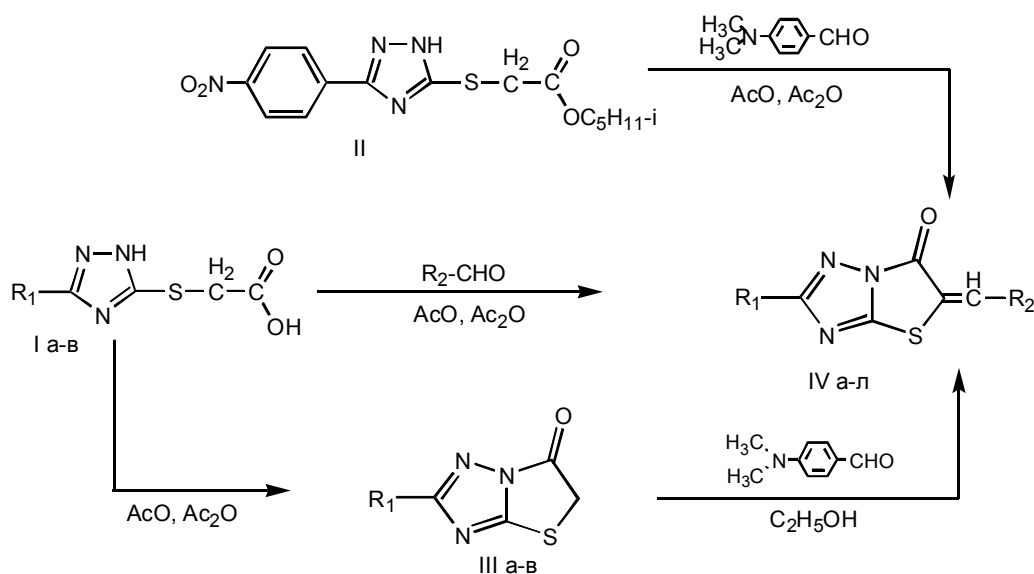
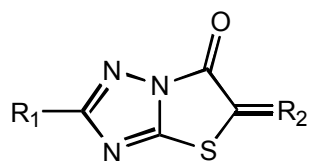


Схема 1. Синтез 5-бензиліден-2-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)тіазоло[3,2-b][1,2,4]тріазол-6-(5H)-онів.

Таблиця 1 – 2-(2-, 3-, 4-Нітрофеніл)тіазоло[3,2-*b*][1,2,4]тріазол-6(5Н)-они (III а-в) і 5-бензиліден-2-(2-, 3-, 4-нітрофеніл)тіазоло[3,2-*b*][1,2,4]тріазол-6-(5н)-они (IV а-л)



Сполука	R ₁	R ₂	Температура плавлення, °С	Брутто-формула	Вихід, %
III а	2-нітрофеніл	H ₂	216-218	C ₁₀ H ₆ N ₄ O ₃ S ₁	54
III б	3-нітрофеніл	H ₂	188-190	C ₁₀ H ₆ N ₄ O ₃ S ₁	38
III в	4-нітрофеніл	H ₂	220-222	C ₁₀ H ₆ N ₄ O ₃ S ₁	68
IV а	2-нітрофеніл	CHC ₆ H ₄ N(CH ₃) ₂ -4	348-350	C ₁₉ H ₁₅ N ₅ O ₃ S ₁	77
IV б	3-нітрофеніл	CHC ₆ H ₃ OH-4-OCH ₃ -3	211-213	C ₁₈ H ₁₂ N ₄ O ₅ S ₁	75
IV в	3-нітрофеніл	CHC ₆ H ₄ Cl-4	219-221	C ₁₇ H ₉ N ₄ O ₃ S ₁ Cl ₁	78
IV г	4-нітрофеніл	CHC ₆ H ₇	262-265	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₃ S ₂	42
IV д	4-нітрофеніл	CHC ₆ H ₅	254-256	C ₁₇ H ₁₀ N ₄ O ₃ S ₁	41
IV є	4-нітрофеніл	CHC ₆ H ₄ OCH ₃ -2	305-307	C ₁₈ H ₁₂ N ₄ O ₄ S ₁	88
IV ж	4-нітрофеніл	CHC ₆ H ₄ Cl-4	235-237	C ₁₇ H ₉ N ₄ O ₃ S ₁ Cl ₁	92
IV з	4-нітрофеніл	CHC ₆ H ₄ NO ₂ -4	301-303	C ₁₇ H ₉ N ₅ O ₅ S ₁	89
IV і	4-нітрофеніл	CHC ₆ H ₃ OH-4-OCH ₃ -3	274-276	C ₁₈ H ₁₂ N ₄ O ₅ S ₁	78
IV к	4-нітрофеніл	CHC ₆ H ₃ OH-2-Br-5	284-286	C ₁₇ H ₉ N ₄ O ₄ S ₁ Br	82
IV л	4-нітрофеніл	CHC ₆ H ₄ N(CH ₃) ₂ -4	352-354	C ₁₉ H ₁₅ N ₅ O ₃ S ₁	84

Продовження табл. 1

Сполука	Знайдено, %				Вирахувано, %			
	C	H	N	S	C	H	N	S
III а	44,94	2,52	21,54	12,25	45,80	2,29	21,37	12,21
III б	45,43	2,35	21,01	12,65	45,80	2,29	21,37	12,21
III в	45,72	2,22	21,52	12,25	45,80	2,29	21,37	12,21
IV а	57,77	3,98	17,45	7,89	58,12	3,82	17,81	8,14
IV б	54,48	3,17	13,95	8,09	54,55	3,03	14,14	8,08
IV в	53,44	2,11	17,38	9,41	53,06	2,34	14,56	8,32
IV г	53,02	3,86	18,11	9,98	53,16	3,80	17,72	10,13
IV д	57,98	2,99	16,04	9,08	58,29	2,86	16,00	9,14
IV є	57,01	3,08	14,54	8,71	56,84	3,16	14,74	8,42
IV ж	53,01	2,35	–	–	53,06	2,34	14,56	8,32
IV з	51,31	2,30	17,94	8,01	51,65	2,28	17,72	8,10
IV і	54,78	3,31	14,02	7,95	54,55	3,03	14,14	8,08
IV к	46,06	2,11	12,51	7,32	45,84	2,02	12,58	7,19
IV л	58,24	3,64	17,83	8,01	58,12	3,82	17,81	8,14

а також протонів, що зв'язані з п'ятим атомом вуглецю кільця при 4,0 м.ч.

Для синтезованих сполук було вивчено гостру токсичність. При цьому встановлено, що синтезовані сполуки, згідно з класифікацією І.К. Сидорова, належать до класу малотоксичних або нетоксичних сполук. Їх LD₅₀ становить 470-990 мг/кг при внутрішньочеревному введенні білим щурам.

Дослідження протимікробної та протигрибкової фармакологічної активності показали, що серед 2-(2-,3-,4-нітрофеніл)тіазоло[3,2-*b*][1,2,4]тріазол-6(5Н)онів найбільш активною є сполука, що містить 2-нітрофенільний радикал. На протимікробну активність відносно антра-

коїду в речовинах IV а-в, д-л значним чином впливає кількість замісників у залишку альдегіду. Так, найбільш активними виявились сполуки, що містять два замісники.

ВИСНОВКИ. Синтезовано ряд нових 5-бензиліден-2-(2-,3-,4-нітрофеніл)тіазоло[3,2-*b*][1,2,4]тріазол-6-(5н)-онів. Структуру синтезованих сполук підтверджено елементним аналізом, ІЧ-спектроскопією і ПМР-спектроскопією, а їх індивідуальність – хроматографічно. Досліджено протимікробну і протигрибкову активність отриманих речовин та їх гостру токсичність. Встановлено закономірності "будова-дія".

ЛІТЕРАТУРА

1. Казицина Л.А., Куплетская Н.Б. Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. – М.: Высш. шк., 1971. – 264 с.
2. Каплаушенко А.Г., Книш Є.Г., Панасенко О.І. 5-Нітрофеніл-2Н-1,2,4-тріазоліл-3-тіоацетатні кислоти та їх естери як біологічно активні сполуки // Мед. хімія. – 2005. – 7, № 1. – С. 92-94.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – Х.: Торсинг, 1998. – Т. 1. – 560 с.; Т. 2. – 592 с.
4. Панасенко А.И., Бакуменко М.Г., Книш Е.Г., Чепель П.В. Исследование противовоспалительного действия замещённых 1,2,4-триазоло (3,2-в)- и (3,4-в)-триазола // X Рос. нац. конгресс "Человек и лекарство": Тез. докл. – М., 2003. – С. 644.
5. Панасенко О.І. Синтез, перетворення, фізико-хімічні та біологічні властивості похідних 1,2,4-тріазолу: Дис... д-ра фармац. наук. – К., 2005. – 396 с.
6. Пат. 20388 Україна, С 07D 413/12 А 61 К 31/41. Морфоліній 3-(4-піридил)-1,2,4-тріазоліл-5-тіоацетат, що виявляє антиоксидантну, церебропротективну та кардіопротекторну активність / А.Д. Візір, В.А. Візір, С.М. Дроговоз та ін. – № 97052457; Заявл. 28.05.97; Опубл. 15.04.02, Бюл. № 4.
7. Pat. 6417187 USA, МПК7 C07D 413/14. 1,2,4-Triazole based compounds that can be used as insecticides or acaricides and processes / Hegde Vidyathar Babu, Bis Scott Jerome, Heo Emilie Chassat et al. – № 09/834845; Заявл. 13.04.2001; Опубл. 09.07.2002; НПК 514/236.2.
8. Synthesis and antifungal activity of novel thiazole-containing triazole antifungals. II. Optically active ER-30346 and its derivatives / Tsuruoka Akihiko, Kaku Yumiko, Kakinuma Hiroyuki et al. // Chem. and Pharm. Bull. – 1998. – 46, № 4. – P. 623-630.

СИНТЕЗ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ В РЯДУ 5-БЕНЗИЛИДЕН-2-(2-,3-,4-НИТРОФЕНИЛ)ТИАЗОЛО[3,2-В][1,2,4]ТРИАЗОЛ-6-(5Н)-ОНОВ

А.Г. Каплаушенко, Е.Г. Книш, А.И. Панасенко
ЗАПОРОЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Резюме

Синтезирован ряд новых 5-бензилиден-2-(2-,3-,4-нитрофенил)тиазоло[3,2-в][1,2,4]тріазол-6-(5Н)-онов. Структура синтезированных соединений подтверждена элементным анализом, ИК-спектроскопией и ПМР-спектрометрией, а их индивидуальность – хроматографически. Исследованы противомикробная, противогрибковая активность полученных веществ и их острая токсичность. Установлены закономерности "строение-действие". Изучается диуретическая, противосудорожная и противовоспалительная активность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: 1,2,4-тріазолы, биологическая активность.

THE SYNTHESIS AND PHARMACOLOGIC ACTIVITY IN THE LINE 5-BENZYLIDENE-2-(2-,3-,4-NITROPHENYL)THIAZOLO[3,2-B][1,2,4-TRIAZOL-6-(5H)-ONES

A.H. Kaplaushenko, Y.H. Knysh, O.I. Panasenko
ZAPORIZHYAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

Summary

The line of new 5-benzylidene-2-(2-,3-,4-nitrophenyl)thiazolo[3,2-b][1,2,4-triazol-6-(5H)-ones has been synthesized. The structure of receiving substances has been confirmed by means of element analysis, IR-spectroscopy and PMR-spectrometry. Their severe toxicology, antimicrobial antifungal, activities have been investigated. We arranged some regularities between chemical structure of synthesized compounds and their activities. Diuretical, anti-convulsive and anti-inflammatory activities are studied.

KEY WORDS: 1,2,4-tryazols, biological activity.

Отримано 18.09.2006 р.

Адреса для листування: А.Г. Каплаушенко, вул. Зернова, 30, кв. 6, Запоріжжя, 69121, Україна.

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК МІЖ ТРАНСМІСИВНИМИ СПОНГІФОРМНИМИ ЕНЦЕФАЛОПАТІЯМИ ТВАРИН ТА ЛЮДИНИ

В.В. Влізло, П.І. Вербицький
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ ТВАРИН УААН, ЛЬВІВ

У статті узагальнено результати досліджень, що стосуються трансмісивних спонгіформних енцефалопатій. Показано взаємозв'язок між пріонними інфекціями тварин і людини. Зокрема, хвороби мають подібні епізоотологічні та епідеміологічні особливості, клінічні симптоми, гістологічні ураження центральної нервової системи. Збудник хвороб – інфекційний пріон – може долати видовий бар'єр.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пріонні інфекції, енцефалопатії, пріон, людина, тварини.

Трансмісивні спонгіформні енцефалопатії (пріонні інфекції, губчастоподібні енцефалопатії) реєструються у тварин і людей. У тварин діагностують: скреїпі овець і кіз, губчастоподібну енцефалопатію великої рогатої худоби (ГЕ ВРХ), трансмісивну енцефалопатію норок (ТЕН), хронічну виснажливу хворобу (ХВХ) оленів, спонгіформну енцефалопатію котячих (СЕК). У людей зареєстровано різні варіанти Крейтцфельдта-Якоба хвороби (КЯХ), синдром Герстманна-Штройсслера-Шейнкера (СГШШ), хворобу куру, фатальне родинне безсоння (ФРБ). Збудником пріонних інфекцій є патологічний (інфекційний) пріон (PrP^{sc}) [2, 15].

Усі пріонні інфекції тварин і людей мають такі спільні особливості: 1) стовідсоткова смертність після інфікування; 2) прогресуюче порушення поведінки, чутливості та координації рухів; 3) локалізація патологічних змін у центральній нервовій системі з утворенням множинних дрібних вакуолей (губчастоподібна структура); 4) відсутність імунної відповіді з боку ураженого організму; 5) тривалий інкубаційний період; 6) здатність пріона долати видовий бар'єр і викликати захворювання в інших видів; 7) відсутність прижиттєвої діагностики; 8) відсутність ефективних засобів лікування; 9) відсутність специфічної профілактики.

Якщо провести історичний аналіз пріонних інфекцій, епізоотологічний та епідеміологічний моніторинг, то можна простежити певний взаємозв'язок між трансмісивними спонгіформними енцефалопатіями тварин і людини. Од-

нією з найбільш вивчених хвороб є скреїпі овець і кіз. Захворювання вперше було діагностовано ще в 1732 році в Англії. Сьогодні його реєструють у багатьох країнах Європи, Азії та Америки [8]. Інкубаційний період хвороби триває від декількох місяців до п'яти років. При клінічному перебізі скреїпі у тварин діагностують тремор, втрату координації рухів, свербіж. Клінічно хвороба триває декілька місяців і закінчується смертю. Гістологічні зміни виявляють у сірій речовині мозочка, цибулин та середнього мозку у вигляді губчастоподібних утворень. Вважається, що збудник скреїпі овець і кіз, проникаючи в організм інших видів тварин, може трансформуватися і викликати захворювання. Таким чином, можна зробити припущення, що від скреїпі овець і кіз виникли й інші трансмісивні спонгіформні енцефалопатії.

Губчастоподібну енцефалопатію великої рогатої худоби вперше зареєстровано у Великій Британії в 1986 році. На середину 2006 року її діагностували у 27 країнах світу. Загальна кількість випадків захворюваності великої рогатої худоби склала понад 190 тис. Джерелом інфікування великої рогатої худоби було м'ясо-кісткове борошно, контаміноване патологічним пріоном скреїпі овець [17]. Вказують [7], що розвиток хвороби може бути особливо активним, коли інфікування настає при надходженні збудника ГЕ ВРХ. Це пояснюється тим, що існує видовий бар'єр, тому вірулентність пріона в межах одного виду є сильнішою. Горизонтальна передача збудника є можливою у 1 % випадків, вертикальна (від матері до пло-

да) – в 10 %. Після зараження великої рогатої худоби інкубаційний період триває від 20 місяців до 10 років і більше. Основні симптоми GE BPX характеризуються порушенням чутливості (гіперестезія шкіри, різка реакція на звуки, інколи на світло), координації рухів (атаксія, спотикання, падіння на тазові кінцівки) і поведінки (нервовість, агресивність, буйство, лякливність, страх). З часу появи перших клінічних ознак хвороби і до смерті може минути від 3-х тижнів до 6-ти місяців, що залежить від кількості збудника, який проник в організм, і джерела інфікування (патологічний пріон великої рогатої худоби є більш вірулентним, ніж скреїпі). При гістологічному дослідженні центральної нервової системи встановлюють ураження у сірій речовині стовбурової частини мозку між мозочком і великими півкулями головного мозку, зокрема у довгастому мозку добре виражені симетрично розміщені дистрофічні зміни з утворенням великої кількості мікрокіст круглої або овальної форми (вакуолізація) [1].

Збудник GE BPX може уражати інші види тварин і людину.

Трансмісивна енцефалопатія норок виникла внаслідок поїдання інфікованих тканин овець, які хворіли на скреїпі, та великої рогатої худоби, яка хворіла на губчастоподібну енцефалопатію [13]. Після зараження норок інфекційним пріоном інкубаційний період триває 5-12 місяців. Клінічний перебіг хвороби може складати від 2 до 6 тижнів. Із симптомів, які реєструють при ТЕН, характерним є порушення поведінки (нервовість, лякливність, самопогризання). Після смерті норок гістологічно встановлюють дистрофічні зміни у сірій речовині мозку (кора та стовбур головного мозку, мозочок). Ураження у мозку норок, хворих на трансмісивну енцефалопатію, подібні до тих, які виявляють в овець і кіз, хворих на скреїпі, або великої рогатої худоби, яка хворіла на губчастоподібну енцефалопатію.

Вказують [19] на те, що пріон скреїпі овець і кіз є причиною появи хронічної виснажливої хвороби оленів, які перебували у неволі та споживали контаміноване м'ясо-кісткове борошно. Особливості перебігу хронічної виснажливої хвороби оленів і гістологічні зміни в мозку подібні до інших пріонних інфекцій тварин.

Починаючи з 1990 року, реєструється спонгіформна енцефалопатія котятих. Хвороба уражує домашніх та диких котів і зоопаркових тварин (гепарди, пуми, тигри, оцелоти). СЕК виникла після інфікування котятих інфекційним пріоном губчастоподібної енцефалопатії великої рогатої худоби. Зараження відбувається при поїданні уражених тканин хворої великої рогатої

худоби. Понад 90 % СЕК зареєстровано у Великій Британії, де і захворюваність худоби є найбільшою. Ураження мозку в котятих подібні до інших пріонних хвороб тварин [20].

Перше захворювання людей, яке характеризується губчастоподібними змінами в мозку, було описане німецькими лікарями Н.І. Creutzfeldt [6] та А. Jakob [11], від прізвищ яких і проходить назва хвороби – "Крейтцфельдта-Якоба хвороба" (КЯХ). На сьогодні відомі чотири форми Крейтцфельдта-Якоба хвороби: спорадична (сКЯХ), родинна (рКЯХ), ятрогенна (яКЯХ), атипова, або новий варіант (нвКЯХ). КЯХ реєструється на всіх континентах та в усіх країнах світу, в тому числі в Україні [3, 4, 5]. При Крейтцфельдта-Якоба хворобі інкубаційний період триває від декількох місяців до десятків років. Типовими симптомами хвороби є порушення функції органів чуття, розлади рухової сфери (атаксія), порушення психіки (депресія, сонливість, агресивність, недомумство). При гістологічному дослідженні мозку встановлюють ураження нейронів у вигляді дистрофічних змін, утворення мікрокіст, проліферацію астроцитів у великих півкулях головного мозку, стовбурі та мозочку. З усіх форм КЯХ спорадична реєструється найчастіше. Причини її виникнення не відомі. Можливо, різні шкідливі чинники впливають на ген пріона, викликаючи в ньому патогенні мутації, що зумовлює утворення PrP^{sc}.

Родинна КЯХ реєструється в окремих регіонах Чілі, Словаччини, Угорщини, Ізраїлю. Тут частота захворюваності може сягати до 100 і більше на 1 млн жителів. Родинна КЯХ спостерігається при аутосомно-домінантних типах спадковості, що існують в окремих родин і сімей. Хвороба пов'язана з мутаціями пріонгена, що виникають на 178, 180, 183, 200, 208, 210 та 232 кодонах [9].

Ятрогенна КЯХ розвивається при використанні інфікованих хірургічних та інших лікарських інструментів, а також після пересадки твердої мозкової оболонки або рогівки ока, при ін'єкціях гормону росту та лікарських препаратів, переливанні донорської крові [16]. Ятрогенна КЯХ може виникати при парентеральному проникненні в організм збудника різних форм Крейтцфельдта-Якоба хвороби (сКЯХ, рКЯХ, нвКЯХ).

Атипова форма, або новий варіант, КЯХ реєструється у Великій Британії з березня 1996 року. Її виникнення пов'язують з інфікуванням людей PrP^{sc}, який міститься у тканинах великої рогатої худоби, хворої на губчастоподібну енцефалопатію [18]. Тому особливу увагу приділяють сировині, яку отримують після забою

великої рогатої худоби та використовують в їжу, для виробництва лікарських препаратів і косметичних засобів. При застосуванні тканин великої рогатої худоби слід враховувати епізоотичну ситуацію щодо ГЕ ВРХ у країні та регіоні, звідки походить сировина для харчової, фармацевтичної, біологічної та косметичної промисловості.

Слід відмітити, що нвКЯХ відрізняється від інших форм хвороби за симптомами та змінами в мозку. Клінічні ознаки та ураження в мозку нагадують губчастоподібну енцефалопатію великої рогатої худоби. Експериментально відтворено хворобу на мавпах після їх інфікування мозком хворих корів [12].

Синдром Герстманна-Штройсслера-Шейнкера належить до родинних захворювань і передається за аутосомно-домінантним типом. При СГШШ мутація найчастіше локалізується на 102 кодоні, де амінокислоти проліну замінюються лейцином. Після зараження інкубаційний період триває від 4 до 50 років. Клінічно СГШШ характеризується атаксією, розладами ковтання і фонації, прогресуючою деменцією. Клінічний перебіг захворювання може тривати близько 5-ти років, після чого настає смерть. У мозку та корі мозочка відкладається амیلлід [16].

Куру – це пріонна інфекція, яку діагностують в аборигенів високогірних племен острова Папуа-Нова Гвінея, що сповідують ритуальний канібалізм [10]. Інкубаційний період хвороби триває від 2 до 30 років і більше. Клінічно хвороба триває від 6 місяців до 2 років і характеризується ознаками мозочкової атаксії, тремору, втрати мови, хворі недоречно сміються (з мови аборигенів "куру" – смерть, що регоче). Гістологічні зміни встановлюють у мозочку та мозкових півкулях (вакуолізація, відмирання нейронів, амیلлоїдні бляшки).

Фатальне родинне безсоння – спадкова хвороба, яка уражує членів однієї родини. У хворих виявлено мутацію на 178 кодоні (заміна аспарагінової кислоти на аспарагін). ФРБ проявляється порушенням сну, і жоден снодійний препарат хворій людині не допомагає. Гістологічно встановлюють патологічні зміни в таламусі, що характеризуються загибеллю нейронів, астрогліозом, вакуолізацією та відкладанням амیلлоїду [16].

Чи є небезпечною людина, яка має одну із пріонних інфекцій? Тут більше невідомого, ніж відомого. Пріонні хвороби, що мають генетичний зв'язок (рКЯХ, СГШШ, ФРБ), спостерігаються в окремих родинних групах, члени цих родин хворіють набагато частіше, ніж інші люди. Спорадична КЯХ пов'язана з мутаціями

і реєструється у різних країнах світу в межах 1 випадку на 1 млн жителів. Однак усі ці хвороби можуть спричинити ятрогенну КЯХ. Таким чином, збудником перелічених вище хвороб може інфікуватися здорова людина від хворої. Це буває, коли від хворих людей беруть для реципієнтів уражені паталогічним пріоном гормони гіпофіза (гормон росту, гонадотропін), тверду мозкову оболонку, рогівку ока, кров або застосовують контаміновані хірургічні інструменти.

Досі немає єдиної думки щодо небезпеки пріонних інфекцій для людства. Але, якщо взяти до уваги той факт, що Крейтцфельдта-Якоба хвороба з'являється переважно у Великій Британії, де захворюваність на ГЕ ВРХ найбільша, то небезпека є очевидною. Із середини 90-х років зростає кількість випадків нового варіанта Крейтцфельдта-Якоба хвороби у людей. Ці люди могли заразитися у 80-90 роках. Враховуючи тривалий інкубаційний період, вважаємо, що нв КЯХ буде продовжувати реєструватися у Великій Британії та інших країнах світу.

З усіх перелічених вище захворювань тварин лише збудник губчастоподібної енцефалопатії великої рогатої худоби може уражати людину. Що стосується штамів патологічних пріонів, які викликають захворювання інших видів тварин, то доведено [8] неможливість зараження людини збудником скреїпи овець і кіз. Але вже зараз проводять дослідження можливої трансформації збудника від великої рогатої худоби через овець і кіз до людини. Адже відомо [14], що відбувається не лише зараження великої рогатої худоби від овець чи кіз, а й ураження останніх патологічним пріоном губчастоподібної енцефалопатії. Ще не доведено інфікування людини м'ясними продуктами овець чи кіз, але вищеописаний шлях береться до уваги. Тому країни Європейського Союзу та інші провідні країни світу запровадили систему безпеки, що включає ліквідацію ризикованих продуктів (головний та спинний мозок, очі, мигдалики, весь кишечник, селезінка, тимус, видима лімфоїдна та нервова тканини), які залишаються після забою здорових тварин, не лише великої рогатої худоби, а й овець і кіз.

Основним завданням науки є розробити нові методи, які дали б можливість проводити типізацію штамів збудника у хворих тварин. Сьогодні в отарах овець може бути циркуляція збудника губчастоподібної енцефалопатії великої рогатої худоби. Трансформація пріона від великої рогатої худоби до вівці є вкрай небезпечною, оскільки скреїпа передається горизон-

тально, і якщо "новий" зворотно-трансформований пріон буде передаватися горизонтально, то це може спричинити масове зараження не лише овець, кіз, великої рогатої худоби та інших видів тварин, а й людей.

Що стосується інших пріонних інфекцій тварин і можливої їх передачі людині, то ніяких даних, які б доводили цей факт, немає. Однак людина має постійний контакт, якщо не з тваринами, то з їхньою продукцією. Так, норки

(трансмисивна енцефалопатія норок) дають цінне хутро, олені (хронічна виснажлива хвороба) – м'ясо та шкіру, без домашніх котів (губчастоподібна енцефалопатія котятих) мільйони людей не уявляють свого життя. Тому наукові дослідження з вивчення пріонних інфекцій слід поглиблювати, оскільки вони є дуже актуальними і мають важливе практичне та теоретичне значення як для ветеринарної, так і для гуманної медицини.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вербицький П.І. Губчастоподібна енцефалопатія великої рогатої худоби та інші пріонні інфекції. – К.: Ветінформ, 2005. – 240 с.
2. Влізло В.В., Вербицький П.І. Наукові та соціально-економічні проблеми щодо пріонних інфекцій // Вісник аграрної науки. – 2004. – № 5. – С. 14-17.
3. Коваль Т. Виявлення пріонових захворювань людини і обґрунтування принципів епідеміологічного нагляду та профілактики їх в Україні: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – К., 2001. – 20 с.
4. Шлопов В.Г. Пріонові інфекції: медико-соціальні та екологічні проблеми. – К.: KITIC, 2000. – 152 с.
5. Budka H. Tissue handling in suspected Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases) // Brain. Pathol. – 1995. – **5**. – P. 319-322.
6. Creutzfeldt H.G. Über eine eigenartige herdförme Erkrankung des Zentralnervensystems // Z. Neurol. Psychiatr. – 1920. – **57**. – P. 1-18.
7. Dahmus S., Harumann B., Wilesmith J.W. Die Ursache der BSE – Epidemie / Prionen und Prionkrankheit hrsg. Von B. Hornlimann. – Berlin, New York: de Gruyter, 2001. – S. 330-336.
8. Foster J.D. Age at death from natural scrapie in a flock of Suffolk sheep // Vet. Rec. – 1989. – **125**. – P. 415-417.
9. Gabizon R. Mutation and polymorphism of the prion protein gene in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) // Am. J. Hum. Genet. – 1993. – **55**. – P. 828-835.
10. Gajdusek D.C., Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea: The endemic occurrence of "kuru" in the native population // N. Engl. J. Med. – 1957. – **257**. – P. 974-978.
11. Jakob A. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (Spastische Pseudosklerotische – Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden) // Deutsch. Z. Nervenheilk. – 1921. – **70**. – P. 132-146.
12. Lasmez C.I. BSE transmission to macaques (letter) // Nature. – 1996. – **381**. – P. 743-744.
13. Marsh R.F. Epidemiologic and experimental studies on transmissible mink encephalopathy // Dev. Biol. Stand. – 1993. – **80**. – P. 111-118.
14. Prionen und Prionkrankheiten/ hrsg. Von Beat Hoernlimann. – Berlin, New York: de Gruyter, 2001. – 602 s.
15. Prusiner S.B. Prions // Sci. Am. – 1984. – **251**. – P. 50-59.
16. Prusiner S.B., Hsiao K.K. Human prion diseases // Am. Neurol. – 1994. – **35**. – P. 385-395.
17. Wilesmith J.W. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies // Vet. Rec. – 1988. – **123**. – P. 638-644.
18. Will R.G. A new variant of Creutzfeldt-Jakob Disease in the UK // Lancet. – 1996. – **347**. – P. 921-925.
19. Williams E.S. Spongiform encephalopathies in Cervidae // Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. – 1992. – **11**. – P. 551-567.
20. Wyatt J.M. Spongiform encephalopathy in a cat // Vet. Rec. – 1990. – **126**. – P. 513.

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ТРАНСМИССИВНЫМИ СПОНГИФОРМНЫМИ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯМИ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

В.В. Влизло, П.И. Вербицкий
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ УААН, ЛЬВОВ

Резюме

В статье обобщены результаты исследований, которые касаются трансмиссивных спонгиозных энцефалопатий. Показано взаимосвязь между прионными инфекциями животных и человека. В частности, болезни имеют похожие эпизоотологические и эпидемиологические особенности, клинические симптомы и гистологические поражения центральной нервной системы. Возбудитель болезней – инфекционный прион – может преодолевать видовой барьер.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: прионные инфекции, энцефалопатии, прион, человек, животные.

INTERRELATIONSHIP BETWEEN TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES OF ANIMALS AND HUMAN

V.V. Vlizlo, P.I. Verbytsky
INSTITUTE OF ANIMAL BIOLOGY OF UAAS, LVIV

Summary

The results of research of transmissible spongiform encephalopathy diseases of animals and human are presented in the article. Interrelationship between prion infections of animals and human was shown. Diseases have similar epizootological and epidemiological peculiarities, clinical symptoms and pathological signs of central nervous system. Disease causative agent infectious prion can take interspecies barrier.

KEY WORDS: prion infections, encephalopathy, prion, human, animals.

Отримано 29.08.2006 р.

Адреса для листування: В.В. Влізло, Інститут біології тварин УААН, вул. В. Стуса, 38, Львів, 79034, Україна.

**Для отримання оперативної інформації звертайтеся
до нашої сторінки в Інтернеті:
www.tdmu.edu.te.ua**

ГІПОТЕНЗИВНА ДІЯ КАРБОРЕНУ В УМОВАХ ІНДОМЕТАЦІЙНОЇ І ВАЗОРЕНАЛЬНОЇ ГІПЕРТЕНЗІЇ

О.І. Набока

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

У роботі представлено результати вивчення гіпотензивної дії карборену порівняно з гіпотіазидом. Доведено, що карборен в умовах індометаційної і вазоренальної гіпертензії в дозі, в 4 рази меншій, ніж у гіпотіазиду, проявляє виражений і практично однаковий з ним гіпотензивний ефект.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гіпотензія, артеріальний тиск, індометацин, карборен.

ВСТУП. В останні десятиріччя минулого століття діуретики зайняли одне із провідних місць у лікуванні гіпертонічної хвороби і хронічної серцевої недостатності. Не будучи безпосередньо антигіпертензивними препаратами, вони, сприяючи виведенню великої кількості рідини, проявляють гіпотензивну дію, знижуючи артеріальний тиск до фізіологічної норми [1, 2, 7].

Метою даного дослідження стало вивчення гіпотензивної дії карборену.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Експериментальну модель індометаційної гіпертензії одержували шляхом хронічного введення інгібітора синтезу простагландинів – індометацину – на фоні зміни функціонального стану нирок внаслідок сольового навантаження [4]. Експерименти проводили на нелінійних щурах-самцях масою 200-220 г.

У всіх тварин вимірювали артеріальний тиск (АТ) у хвостовій артерії модифікованим методом, що оснований на принципі Ріва-Роччі, на приладі BE RECORDER (Італія). Для визначення вихідного рівня АТ для кожного щура реєстрацію тиску проводили 2 рази протягом доби. При цьому середній рівень тиску (САТ) було розраховано як середню величину з 3-4 паралельних вимірів. У результаті встановлено, що величина САТ у щурів коливалася в межах 135-160 мм рт.ст. Для дослідів було відібрано тварин з уже підвищеним САТ, величина якого складала в середньому ($155 \pm 1,8$) мм рт.ст.

Артеріальну гіпертензію у щурів викликали шляхом щоденного введення протягом 6 тижнів

1 % розчину кухонної солі, який тварини одержували замість питної води в поєднанні із введенням усередину індометацину в дозі 2 мг/кг [4]. Через 6 тижнів у 70 % тварин спостерігали достовірне підвищення рівня САТ порівняно з вихідним: величина САТ перебувала в межах 175-210 мм рт.ст. і складала в середньому ($190 \pm 4,0$) мм рт.ст. Отримані результати свідчили про розвиток вираженої гіпертензії.

Щурів з розвинутою гіпертензією було поділено на 4 групи із приблизно однаковим САТ у кожній. Тварини 1-ї групи слугували контролем на природну регресію патологічного процесу, тварини 2-ї та 3-ї груп одержували всередину карборен – 10 і 40 мг/кг маси, щури 4-ї групи – гіпотіазид у тих же дозах. Тривалість введення карборену складала 10 днів, виходячи з того, що, за даними клініцистів, максимум гіпотензивної дії при безперервному застосуванні проявляється, в основному, на 5-10 доби [1]. Під час лікування реєстрацію САТ у щурів проводили через 1, 5 і 10 діб.

Вазоренальну гіпертензію викликали на кролях різної статі масою 3-3,5 кг. Систолічне АТ у тварин визначали на центральній вушній артерії за допомогою осцилометра [3]. Щодня протягом 10 діб у кожній тварини вимірювали САТ для встановлення вихідного рівня, що складав у середньому 112,0 мм рт.ст. Експериментальну вазоренальну гіпертонію викликали шляхом дозованого звуження однієї з ниркових артерій [3], використовуючи принцип класичного методу Голдблатта. Виходячи з того, що значне підвищення САТ в умовах вазоренальної ниркової гіпертензії відзначається через 4-5

тижнів від моменту звуження судин, вивчення гіпотензивної дії карборену і гіпотіазиду проводили через 1 місяць після відтворення патології. Рівень реєстрованого тиску на цей період коливався в межах 130-150 мм рт.ст. і був прийнятий як вихідне значення для вивчення гіпотензивної дії карборену порівняно з гіпотіазидом. Від моменту розвиненої вазоренальної гіпертензії всіх тварин поділили на 4 групи (по 5 кролів у кожній). Тварини 1-ї групи слугували контролем на природну регресію, тварини 2-ї і 3-ї груп одержували всередину карборену у дозах 10 і 40 мг/кг маси, тварини 4-ї групи – гіпотіазид в адекватних дозах. Тривалість введення препаратів – 10 днів. Реєстрацію тиску проводили на 1, 5 і 10 доби.

Дані обробляли методами непараметричної статистики з використанням t-критерію Стюдента [5].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані дані свідчать про те, що в групі контрольних тварин протягом перших 5 діб від початку оцінки динаміки природної регресії досягнутого рівня індометаційної гіпертензії виявлено подальше незначне підвищення САТ, що зберігалось на тому ж рівні протягом усього досліджу (табл. 1).

У дослідних групах тварин, які одержували карборен у дозі 10 мг/кг маси, вже на 1 добу спостерігали достовірне зниження САТ на 6-7 %. Після 5 доби лікування гіпотензивний

ефект карборену наростав і досягав 12-13 % порівняно з контролем. Наступна фармакотерапія карбореном призводила до подальшого зниження САТ у щурів, і до закінчення експерименту гіпотензивний ефект складав у середньому 16 %. Гіпотіазид у дозі 10 мг/кг практично не проявляв гіпотензивного ефекту. Це пов'язано, очевидно, з тим, що в цій дозі його діуретичний ефект у 2 рази слабший сечогінної дії карборену. В дозі 40 мг/кг гіпотіазид проявляв гіпотензивну дію, аналогічну дії карборену. В терапевтичній практиці вважається значимим зниження артеріального тиску вже на 10 % [1, 6, 7]. Отримані нами результати і дані літератури свідчать про те, що гіпотіазид саме в дозі 40 мг/кг проявляє діуретичну й гіпотензивну дії [5].

Результати, отримані при вивченні впливу карборену в умовах вазоренальної гіпертензії, представлено в таблиці 2.

Установлено, що у тварин контрольної групи протягом 10 діб спостереження рівень САТ залишався високим порівняно з вихідним. Карборен на фоні розвиненої вазоренальної гіпертонії проявляв гіпотензивний ефект. Зниження САТ у середньому на 9 мм рт.ст. спостерігалося вже на 1 добу лікування. Подальше введення карборену призводило до достовірного зниження тиску, і на 5 добу гіпотензивний ефект для обох дозувань карборену складав у середньому 10,65 %. У наступний період спостереження (10 доба)

Таблиця 1 – Вплив карборену і гіпотіазиду на рівень артеріального тиску в щурів в умовах індометаційної гіпертензії ($\bar{X} \pm S_x$)

Умови дослідів	Доза, мг/кг	Рівень САТ, мм рт.ст.				Гіпотензивний ефект, % щодо контролю
		Вих.	1 доба	5 доба	10 доба	
Гіпертензія, без лікування (контроль)	–	190±4,0	191±4,0	194±5,0	182±4,0	–
Карборен	10	192±5,3	180±4,3*	169±4,7	160±4,7**	16,6
	40	193±4,0	184±4,3*	171±5,3	161±5,8**	15,9
Гіпотіазид	10	189±3,8	186 ±4,5	182±3,9	182±4,0	3,8
	40	192±4,5	178±4,7*	167±4,0	161±4,0**	16,1

Примітка. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$ порівняно з контролем.

Таблиця 2 – Вплив карборену і гіпотіазиду на рівень САТ у кролів в умовах вазоренальної гіпертензії ($\bar{X} \pm S_x$)

Умови дослідів	Доза, мг/кг	Рівень САТ, мм рт.ст.				Гіпотензивний ефект, % щодо контролю
		Вих.	1 доба	5 доба	10 доба	
Гіпертензія, без лікування (контроль)	–	141±4,2	142±2,6	144±5,0	140±5,0	–
Карборен	10	142±4,2	133±3,2*	127±3,2	123±5,4**	13,3
	40	140±3,4	131±3,0*	125±3,9	120±5,4**	14,2
Гіпотіазид	10	140±5,3	142±2,4	143±6,2	140±5,0	–
	40	140±4,0	130±3,4*	124±3,0	121±3,2**	13,5

Примітка. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,001$ порівняно з контролем.

гіпотензивна дія карборену залишалася. При цьому рівень САТ знизився на 19-20 мм рт.ст. порівняно з контрольними величинами. Аналогічну гіпотензивну активність у гіпотіазиду ми відзначили тільки в дозі 40 мг/кг маси.

ВИСНОВОК. Карборен в умовах індометацинової і вазоренальної гіпертензії в дозі, в 4 рази меншій, ніж у гіпотіазиду, проявляє виражений і практично однаковий з ним гіпотензивний ефект.

ЛІТЕРАТУРА

1. Березняков И.Г., Черных В.Ф., Черных В.П. Гипертоническая болезнь. – Харьков: Магистр Валентина, 1995. – 325 с.
2. Гиляревский С.Р. Обеспечение безопасности применения диуретиков при лечении сердечно-сосудистых заболеваний: роль калийсберегающих диуретиков // Фарматека. – 2004. – № 8. – С. 70-74.
3. Западнюк І.П. Лабораторні тварини. Розведення, зміст; використання в експерименті. – К.: Вища школа, 1983. – С. 164, 211-212.
4. Матковский К.Л. Индометациновая гипертония // Врач. дело. – 1972. – № 3. – С. 98-99.
5. Сернов Л.Н., Гацура В.В. Элементы экспериментальной фармакологии. – М.: Медицина, 2000. – С. 117-320.
6. Сидоренко Б.А., Преображенский Д.В., Шатунова И.М. Тиазидные диуретики как краеугольный камень антигипертензивной терапии: Обзор // Кардиология. – 2000. – **40**, № 4. – С.80-86.
7. Сидоренко Б.А., Романов Н.Е. Место диуретиков в гипотензивной терапии больных артериальной гипертензией с сопутствующими заболеваниями // Кардиология. – 2000. – **40**, № 5. – С. 83-96.

ГИПОТЕНЗИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ КАРБОРЕНА В УСЛОВИЯХ ИНДОМЕТАЦИНОВОЙ И ВАЗОРЕНАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

О.И. Набока

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

В работе представлены результаты изучения гипотензивного действия карборена в сравнении с гипотиазидом. Доказано, что карборен в условиях индометациновой и вазоренальной гипертензии в дозе, в 4 раза меньшей, чем у гипотиазида, обладает выраженным и практически равным ему гипотензивным эффектом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гипотензия, артериальное давление, индометацин, карборен.

HYPOTENSIVE ACTION OF KARBOREN UNDER CONDITIONS OF INDOMETACIN AND VASORENAL HYPERTENSION

O.I. Naboka

NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

Summary

Results of the study of karboren hypotensive action are presented in work in comparison with hydrochlorothiazide. It is proved that karboren under conditions of indometacin and vasorenal hypertension in 4 times smaller dose than hydrochlorothiazide has expressed and practically equal hydrochlorothiazide hypotensive effect.

KEY WORDS: hypotension, arterial pressure, indometacin, karboren.

Отримано 11.04.2007 р.

Адреса для листування: О.І. Набока, Національний фармацевтичний університет, кафедра патологічної фізіології, вул. Мельникова, 12, Харків, 61002, Україна.

ВИВЧЕННЯ МІКРОЕЛЕМЕНТНОГО СКЛАДУ ЛИСТЯ АБРИКОСА ЗВИЧАЙНОГО

Л.В. Упир, В.С. Кисличенко, А.С. Тартинська
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

Проведено вивчення елементного складу листя абрикоса звичайного, заготовленого в різних місцях вирощування. Встановлено, що в найбільшій кількості накопичуються макроелементи K, Ca, Si, Mg. Серед мікроелементів переважають Al, Fe. Кількість макро- і мікроелементів у цілому більша у листі, заготовленому в Київській області, крім Mn та Na, якого виявилось більше у сировині, заготовленій у м. Харкові. Дослідження елементного складу листя абрикоса показало, що сировина може бути використана як джерело макро- і мікроелементів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: абрикос звичайний, хімічний склад, макро- та мікроелементи, лікарська рослинна сировина.

ВСТУП. Незважаючи на появу синтетичних ліків, інтерес до лікарських рослин як джерела нових лікарських засобів природного походження зростає. Перевагою лікарських рослин є їх значно менша токсичність і можливість тривалого використання без суттєвої побічної дії. У комплексній терапії хворих важливе місце також посідає дієтотерапія, яка має широкі терапевтичні можливості застосування овочів, ягід та фруктів. Так, лікувальне харчування є основним терапевтичним фактором при хворобах шлунково-кишкового тракту, відіграє важливу роль у комплексній терапії хворих на цукровий діабет. При лікуванні таких серцево-судинних хвороб, як атеросклероз, гіпертонія, інфаркт міокарда, широко використовують цілющі властивості багатьох харчових рослин.

Мікроелементи, що надходять в організм людини, мають різноманітне фізіологічне значення. Вони беруть участь у пластичних процесах (будові тканин, особливо кісткової), підтриманні кислотно-основної рівноваги і нормального стану крові, попередженні ендокринних захворювань. Високий вміст солей калію і незначний – натрію позитивно впливає на скорочувальну здатність серцевого м'яза, має діуретичний ефект, що дуже важливо при серцевих набряках [6].

Однією з рослин, що здавна використовується в лікувальному харчуванні, є абрикос звичайний *Armeniaca vulgaris* Mill. (*Prunus armeniaca* L.) родини розових – *Rosaceae*. Ліку-

© Л.В. Упир, В.С. Кисличенко, А.С. Тартинська, 2007.

вальна цінність плодів абрикоса зумовлена високим вмістом у них вітамінів, макро- та мікроелементів, цукрів, органічних кислот, фенольних сполук тощо. Так, встановлено, що 100 г абрикосів впливають на процес кровотворення так само, як 40 мг заліза або 250 г свіжої печінки, що і визначає лікувальну цінність цих плодів для хворих на анемію. Свіжі плоди містять 310-580 мг/100 г калію, 0,02-0,03 мг/100 г марганцю, 0,002-0,009 мг/100 г молібдену, 0,009-0,011 мг/100 г нікелю, 0,23-0,29 мг/100 г титану. Свіжі абрикоси і курагу корисно вживати під час вагітності, при анемії, захворюваннях шкіри, серцево-судинних захворюваннях, що супроводжуються набряками, а також дітям при гіповітамінозі [5, 6].

Абрикос звичайний належить до харчових рослин, що широко культивуються в Україні, особливо в південній частині, а також у Лісостепу й на Поліссі.

Оскільки плоди абрикоса містять велику кількість важливих мікроелементів та інших біологічно активних речовин, а також ця рослина культивується на значних територіях в Україні, Росії, європейських країнах та Середній Азії, дослідження вегетативних органів абрикоса як перспективного джерела БАР є актуальним.

Метою нашої роботи було розглянути мікроелементний склад листя абрикоса звичайного.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктом нашого дослідження було листя абрикоса звичайного,

заготовлене у серпні 2005 року в Київській області (1) та м. Харкові (2).

Вивчення якісного складу і визначення кількісного вмісту макро- та мікроелементів проводили з використанням методу атомно-емісійної спектрофотометрії. Проби випарювали з кратерів графітових електродів у розряді дуги перемінного струму силою 16 А при експозиції 60 с. Як джерело збуджування спектрів використовували ІБС-28. Спектри реєстрували на фотоплівці за допомогою спектрографа ДФС-8 з дифракційною решіткою 600 штр/мм і трилінзовою системою освітлювання щілини. Фотометрували лінії спектрів при довжині хвилі від 240 до 347 нм у пробах, порівнюючи зі стандартними зразками суміші мінеральних елементів, із застосуванням мікрофотометра МФ-4. Калібрувальні графіки будували за допомогою стандартних проб розчинів солей металів (ICORM-23-27). Відносне стандартне відхилення для п'яти паралельних вимірювань не перевищувало 30 % при визначенні числових величин концентрацій елементів [7, 8].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати порівняльного визначення елементного складу листя абрикоса звичайного, заготовленого у серпні в Київській області та м. Харкові, наведено у таблиці 1.

Було виявлено 16 елементів. Такі елементи, як Co, Cd, As, Hg, в листі абрикоса відсутні або їх вміст не можна визначити методом емісійної спектрометрії. У найбільшій кількості накопичуються K, Si, Mg, P, Al. Кількість елементів у цілому більша у листі, заготовленому в Київській області, крім Mn та Na, якого було більше у сировині, заготовленій у м. Харкові. У цілому співвідношення окремих елементів між собою в обох зразках сировини виявились близькими, крім Na, якого у 7 разів більше у сировині, заготовленій у м. Харкові.

У ході попередньо проведених фітохімічних досліджень було виявлено більшу кількість флавоноїдів у сировині, заготовленій у Київській області, що корелює з даними мікроелементного аналізу. Відомо, що Ni сприяє біосинтезу флавоноїдів і є стабілізуючим фактором для антоціанових пігментів [4].

Так, вміст K, який відіграє важливу роль у регуляції водно-сольового обміну, підтриманні тонуусу й автоматизму скорочення серцевого м'яза, виведенні з організму води, складає 2900-3330 мг/100 г і є близьким до вмісту цього цінного мікроелемента у плодах [3]. Ca (500-

Таблиця 1 – **Результати елементного аналізу листя абрикоса звичайного**

№ з/п	Елемент	Вміст елемента, мг/100г	
		1	2
Макроелементи			
1	K	3330	2900
2	Na	70	490
3	Ca	890	500
4	P	170	130
5	Mg	350	330
6	Si	670	660
Мікроелементи			
7	Fe	30	20
8	Mn	3	6
9	Al	80	50
10	Pb	0,03	0,03
11	Sr	3	2
12	Cr	3	3
13	Zn	2	0,8
14	Ni	0,1	0,03
15	Mo	0,1	0,04
16	Cu	0,6	0,2
17	Co	<0,03	<0,03
18	Cd	<0,01	<0,01
19	As	<0,01	<0,01
20	Hg	<0,01	<0,01

890 мг/100 г) нормалізує проникність клітинних мембран, сприяє утворенню кісткової тканини, впливає на функцію залоз м'язів та нервової системи, допомагає видаленню іонів Na з тканин, уповільнює розвиток запальних процесів. Високий вміст Si (660-670 мг/100 г) сприяє зниженню проникності судинної стінки, синтезу колагену, він бере участь в імунологічних процесах, стимулює фагоцитоз. Mg (330-350 мг/100 г) належить до макроелементів і бере активну участь у процесах нервового збудження, водного, вуглеводного і фосфатного обміну, сприяє зміцненню серцево-судинної системи, запобігає ішемії, стенокардії. Для нормального засвоєння цього мікроелемента необхідне його співвідношення з Ca 0,7:1 [1, 2, 9].

ВИСНОВКИ. 1. Високий вміст макро- і мікроелементів у сировині дозволяє вважати листя абрикоса звичайного перспективним джерелом важливих макро- і мікроелементів.

2. Найбільший вміст мікроелементів ідентифіковано в листі абрикоса, заготовленому в серпні у Київській області.

3. Мікроелементний склад сировини дозволяє припустити позитивний вплив на серцево-судинну й імунну системи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Исаев Ю.А. Лечение макроэлементами, металлами и минералами. – К.: Здоровье, 1992. – 192 с.
2. Кисличенко В.С., Яковлева Л.В., Заболотный В.А. и др. Фитотерапия аллергических проявлений. – Харьков: "Харьков", 1992. – 112 с.
3. Крецу Л.Г., Домашенко Л.Г., Соколов М.Д. Мир пищевых растений / Под ред. А.Ф. Палия. – Кишинев: Тимпул, 1989. – 328 с.
4. Круглов Д.С., Ханина М.А., Куценогий К.П. и др. Сравнительный анализ элементного состава наиболее распространенных видов медуницы // Матер. X Междунар. съезда "Фитофарм 2006". – С. Пб., 2006. – С. 187-190.
5. Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник / За ред. А.М. Гродзінського. – К.: УРЕ, 1991. – 542 с.
6. Соколов С.Я. Фитотерапия и фитофармакология: Руководство для врачей. – М.: Медицинское информационное агентство, 2000. – 976 с.
7. Тарасевич Н.И., Семененко К.А., Хлыстов А.Д. Методы спектрального и химико-спектрального анализа. – М.: МГУ, 1973. – 213 с.
8. Хавезов И., Цалев Д. Атомно-адсорбционный анализ. – Л.: Химия, 1983. – 144 с.
9. Хухрянский В.Г., Цыганенко А.Я., Павленко Н.В. Химия биогенных элементов: Учебное пособие. – К.: Вища школа, 1990. – 207 с.

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА ЛИСТЬЕВ АБРИКОСА ОБЫКНОВЕННОГО

Л.В. Упыр, В.С. Кисличенко, А.С. Тартынская
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

Резюме

Проведено изучение элементного состава листьев абрикоса обыкновенного, заготовленных в различных местах произрастания. Установлено, что в наибольшем количестве накапливаются K, Ca, Si, Mg. Среди микроэлементов преобладают Al, Fe. Количество макро- и микроэлементов в целом выше в листьях, заготовленных в Киевской области, кроме Mn и Na, которого было больше в сырье, заготовленном в г. Харькове. Исследование элементного состава листьев абрикоса показало, что сырье может быть использовано как источник макро- и микроэлементов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: абрикос обыкновенный, химический состав, макро- и микроэлементы, лекарственное растительное сырье.

STUDY OF MICROELEMENT COMPOSITION OF APRICOT LEAVES

L.V. Upyr, V.S. Kyslychenko, A.S. Tartynska
NATIONAL PHARMACEUTICAL UNIVERSITY, KHARKIV

Summary

The results of research of micro- and macroelement composition of apricot leaves depending on place of harvesting are presented. It has been defined that leaves of apricot contain the highest amounts of K, Ca, Si, Mg. Among microelements contents of Al, Fe prevails. Contents of micro- and macroelements excepting Mn and Na, is higher in leaves harvested in Kyiv region than in leaves harvested in Kharkiv. Conducted research shows that leaves of apricot would be the source of elements for organism.

KEY WORDS: apricot leaves, chemical composition, micro- and macroelements, plant raw material.

Отримано 16.10.2006 р.

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

ВПЛИВ ХЕЛАТУЮЧОГО АГЕНТА НА ЧУТЛИВІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДУ PSEUDOMONAS ДО НОВОГО ПОХІДНОГО АДАМАНТАНУ

Н.О. Вринчану

ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ, КИЇВ

В умовах *in vitro* проведено дослідження антибактеріальної активності похідного адамантану 4-(1-адамантил)-1(-1-амінобутил) бензолу та трилону Б відносно бактерій роду *Pseudomonas*. Встановлено, що при сумісному застосуванні сполуки АМ-166 та трилону Б (1 %) підвищується чутливість бактерій до адамантанвмісної речовини.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: антибактеріальна дія, похідне адамантану.

ВСТУП. На сьогодні для лікування хвороб, зумовлених інфекційними збудниками, застосовують близько 200 антимікробних засобів [18]. Незважаючи на своєчасне їх використання, кількість захворювань, викликаних мікроорганізмами, не зменшується. Так, тільки в Україні щорічно інфекційні захворювання реєструються у 10 млн людей [2]. Причинами цього є соціально-економічна ситуація, зниження імунного статусу організму, збільшення кількості хвороб, зумовлених мікробними асоціаціями, тощо. Зараз за різних умов, у тому числі внаслідок нераціонального використання антибіотиків широкого спектра дії, збільшується кількість захворювань, викликаних умовно-патогенними мікроорганізмами, зокрема представниками роду *Pseudomonas* [17].

Одним із основних збудників запальних процесів серед мікроорганізмів роду *Pseudomonas* є синьогнійна паличка. *P. aeruginosa* висівають зі шкіри здорових людей у 0,2 %, слизової оболонки носа – в 0,3 %, зіва – до 6 % випадків [10]. Даний мікроорганізм рідко викликає захворювання при достатньому функціонуванні імунної системи. Зниження захисних сил організму сприяє виникненню різноманітних патологічних станів, зумовлених цим збудником.

Так, *P. aeruginosa* є одним із основних збудників хірургічної інфекції та опікових ран, частота післяопераційних ускладнень, спричинених цим мікроорганізмом, складає близько 30 %, а смертність при септичних станах – до 90 % [6]. З інфікованих опікових ран синьогнійна паличка висівається в 16 % випадків [17]. Частота виявлення даного збудника в опіковій рані прямо пропорційна збільшенню терміну перебування хворих у стаціонарі. У перші

години цей мікроорганізм з опікової рани не висівається. Через 30 год виявляється у 20 % хворих, на 5 добу – в 60 % [10].

P. aeruginosa зумовлює захворювання сечостатевої [11] та нервової систем [1, 4]. Синьогнійна паличка є одним із етіологічних факторів менінгіту – в новонароджених цей патоген виявляється в 5 %, у хворих онкологічного профілю – в 10 % випадків [1, 4]. *P. aeruginosa* – один із основних збудників нозокоміальних інфекцій. Так, частка цього збудника при внутрішньолікарняній пневмонії складає 71,4 % [7, 10], при інфекціях сечових шляхів – 51,6 % [8, 12, 16].

Широко розповсюдженим патогеном теплокровних є *Xantomonas maltophilia*. За частотою виділення з біологічного матеріалу *Xantomonas maltophilia* посідає друге місце після синьогнійної бактерії. У хворих з імунodefіцитом цей збудник зумовлює пневмонію, менінгіт, інфекції сечових шляхів, ендокардити і т. ін. Патологічні стани здатні викликати і інші представники роду *Pseudomonas*, а саме: *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. putrefaciens* [3, 15, 20].

На сьогодні для лікування захворювань, зумовлених синьогнійною паличкою, застосовують препарати різних хімічних класів. Це пеніциліни (піперацилін/тазобактам), цефалоспорины (цефтазидим, цефепім), карбапеніми (іміпенем, меропенем), монобактами (азтреонам), аміноглікозиди (гентаміцин, амікацин, тобраміцин, нетилміцин), поліміксини (поліміксин В). Нерідко нераціональне використання антибіотиків призводить до появи резистентних штамів мікроорганізмів. Прикладом є часте застосування при нелікарняній пневмонії та загостренні хронічного бронхіту гентаміцину – препарату, який не ефективний відносно основних збудників респіраторних інфекцій,

погано проникає в бронхіальний секрет [11]. За даними багатоцентрових досліджень NPRS-3, проведених у 1997-1999 роках у Росії [11], до гентаміцину чутливі всього 38,7 % штамів *P. aeruginosa*. Цей збудник виявив стійкість і до інших антибіотиків. Частота піперацилінрезистентних штамів складає 44,7 %, піперацилін/тазобактамрезистентних – 29,7 %. Відмічається зростання імipенему- та ципрофлоксацинрезистентних штамів (відповідно, 19 та 30 %). 85,5 % штамів *P. aeruginosa* резистентні до 25 антибіотиків, серед яких пеніциліни, цефалоспорины, аміноглікозиди і т. ін. [5].

Отже, зростання частки бактерій роду *Pseudomonas* в етіології запальних процесів та збільшення кількості антибіотикорезистентних штамів свідчать про необхідність розробки нових препаратів, активних відносно цих мікроорганізмів.

За даними [9, 19], деякі речовини здатні знижувати резистентність бактерій до антимікробних засобів, порушуючи цілісність клітинної мембрани. Так, спостерігається зміна чутливості *P. aeruginosa* до ампіциліну в присутності фосфоліпиду – монопальмітоїл фосфату. Механізм дії зумовлений зв'язуванням іонів Ca^{2+} та Mg^{2+} , тобто має місце комплексоутворення [19]. Здатність до комплексоутворення виявляє також динамієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (трилон Б). Трилон Б як хелатуюча речовина зв'язує двовалентні метали (Ca^{2+} , Mg^{2+}), що призводить до руйнування ліпополісахаридного комплексу мембрани бактеріальної клітини. У результаті цього збільшується проникність клітинної стінки для різних речовин, у тому числі й антимікробного спрямування [1, 10, 13].

Метою роботи було вивчити чутливість бактерій роду *Pseudomonas* до похідного адамантану – 4(адамантил-1)-1-(1-амінобутил) бензолу (шифр АМ-166) під впливом трилону Б. Сполуку синтезовано на Борщагівському хіміко-фармацевтичному заводі.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Антибактеріальні властивості досліджували методом дифузії в агарі (метод лунок) [14]. Концентрація сполуки АМ-166 становила 1 мг/ 0,1 мл на лунку, трилону Б – 1 мг/0,1 мл (1 % розчин).

Антибактеріальну активність речовин вивчали відносно *P. aeruginosa* ATCC 27853; *Xantomonas maltophilia* 160 III б; *P. putida* 4126; *P. fluorescens* 4125.

Густота інокуляту становила 5×10^6 КУО на 1 мл середовища. Чашки Петрі інкубували протягом 24-48 год у термостаті при 35-37 °С. Кожний експеримент проводили в 3 повторях.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Отримані дані наведено в таблиці 1.

Результати проведених експериментів свідчать про те, що сполука АМ-166 в концентрації, яка значно перевищує МПК, проявляє інгібуючу дію на тест-мікроорганізми, зони затримки росту становлять 15-25 мм (МПК відносно *P. putida*, *P. fluorescens* та *Xantomonas maltophilia* складає 5,0; 10,0; 20,0 мкг/мл відповідно). До адамантанвмісної речовини не чутлива синьоїгнійна паличка, (МПК > 1000,0 мкг/мл). При сумісному застосуванні трилону Б та сполуки АМ-166 реєструється підвищення активності останньої відносно *P. aeruginosa*, *P. putida* та *P. fluorescens*. Натрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти як хелатуюча речовина, зв'язуючи іони Ca^{2+} , Mg^{2+} , змінює проникність клітинної мембрани бактерій, забезпечуючи надходження речовини АМ-166 в мікробну клітину. Трилон Б не сприяє збільшенню чутливості до похідного адамантану *Xantomonas maltophilia*.

ВИСНОВОК. Отримані результати свідчать про перспективність використання сполуки АМ-166 разом із трилоном Б з метою розробки препарату для місцевого використання при захворюваннях, зумовлених представниками роду *Pseudomonas*.

Таблиця 1 – Вплив трилону Б на чутливість бактерій родини *Pseudomonaceae* до АМ-166 (діаметри зон затримки росту мікроорганізмів, мм)

Мікроорганізми	АМ- 166	1 % трилон Б	АМ-166+1 % трилон Б
<i>Xantomonas maltophilia</i>	26,3±1,0	35,0±0,67	35,3±0,33
<i>P. aeruginosa</i>	10,0±0,67	14,7±1,0	21,3±0,67
<i>P. putida</i>	19,6±1,0	23,0±0,67	28,0±0,67
<i>P. fluorescens</i>	15,3±1,0	11,3±0,33	19,3±1,0

ЛІТЕРАТУРА

1. Беляков В.Д., Ряпис Л.Я., Ілюхин В.И. Псевдомонади і псевдомонази. – М.: Медицина, 1990. – 221 с.
2. Бобильова О.О., Бережнов С.П., Мухарська Л.М. та ін. Проблема інфекційної захворюваності

залишається актуальною проблемою охорони здоров'я та держави // Сучасні інфекції. – 2001. – № 1. – С. 4-10.

3. Брискин Б.С., Хачатрян Н.Н., Іонов С.А., Хме-

левский С.В. Антибиотикопрофилактика в абдоминальной хирургии // http://www.consillium.com/media/consillium/03_04c/9.shtml.

4. Гавриш Р.В. Застосування цефтазидиму – КМП при запально-інфекційних захворюваннях за різних форм нейрохірургічної патології // Клін. антибіотикотерапія. – 2000. – № 6. – С. 30-32.

5. Габрилянц Э.Я., Оргусян Д.Р. Резистентность микроорганизмов к антимикробным лекарствам на примере многопрофильной больницы // Тез. докл. 2-го съезда Российского научного общества фармакологов "Фундаментальные проблемы фармакологии". – М., 2003. – С. 113.

6. Даценко Б.М., Белов С.Г., Тамм Т.И. Гнойная рана. – К.: Здоров'я, 1985. – 129 с.

7. Демин А. Пневмония: антибактериальная химиотерапия // Инф. контроль. – 2001. – № 1. – С. 23-25.

8. Костев Ф.И., Швеи В.Д., Рачок И.В., Дехтярь Ю.Н. Инфекции почек и мочевых путей и рациональная антибиотикотерапия // Инф. контроль. – 1999. – № 1. – С. 11-14.

9. Ляпунов Н.А., Минухин В.В., Безуглая Е.П. и др. Экспериментальное исследование антибактериальных и фунгицидных препаратов: мази и аэрозоля мирамистина. – Х.: ХМИ, 1993. – 90 с.

10. Мороз А.Ф. Синегнойная инфекция. – М.: Медицина, 1988. – 255 с.

11. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – М., 2002. – 381 с.

12. Сидоренко С.В., Резван С.П., Стерхова Г.А.,

Грудинина С.А. Госпитальные инфекции, вызванные *Ps. aeruginosa*. Распространение и клиническое значение антибиотикорезистентности // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – № 3. – С. 25-34.

13. Смирнов В.В., Киприянова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. – К.: Наукова думка, 1990. – 359 с.

14. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. – М.: Медицина, 1982. – С. 125-126.

15. Учайкин В.Ф., Савенкова М.С., Афанасьева А.А. Применение цефадроксила при респираторных заболеваниях у детей // <http://hptt.rmj.ru/kah/t1/n 2/4.htm>.

16. Чуев П.Н., Каташинский О.Ю., Коломийченко В.А., Носова О.В. Особенности нозокомиальных инфекций в отделениях интенсивной терапии // Инф. контроль. – 1999. – № 1. – С. 6-9.

17. Шалимов А.А., Грубник В.В., Ткаченко А.И., Осипенко О.В. Инфекционный контроль в хирургии. – Одесса: Маяк, 1998. – 140 с.

18. Яковлев В.П., Яковлев С.В. Антибактериальные препараты: современное состояние и перспективы // Антибиотики и химиотерапия. – 2001. – 46, № 11. – С. 19-21.

19. Krogfelt K., Utlev M., Krivan H., Laux D. Specific phospholipids enhance the activity of β -lactam antibiotics against *Ps.aeruginosa* // Journal of antimicrobial Chemotherapy. – 2000. – 46, № 3. – P. 377-384.

20. Horii T., Muramatsu H., Iinuma Mechanism of resistance to fluoroquinolones and carbapenems in *Pseudomonas putida* // J. Antimicrobial Chemotherapy. – 2005. – 56, № 4. – P. 643-647.

ВЛИЯНИЕ ХЕЛАТИРУЮЩЕГО АГЕНТА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS* К НОВОМУ ПРОИЗВОДНОМУ АДАМАНТАНА

Н.А. Врынчану

ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ И ТОКСИКОЛОГИИ АМН УКРАИНЫ, КИЕВ

Резюме

В условиях *in vitro* проведено исследование антибактериальной активности производного адамантана 4-(1-адамантил)-1-(1-аминобутил) бензола и трилона Б по отношению к бактериям рода *Pseudomonas*. Установлено, что при совместном применении соединения АМ-166 и трилона Б (1 %) повышается чувствительность бактерий к адамантансодержащему веществу.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: антибактериальное действие, производное адамантана.

INFLUENCE OF CHELATIRING AGENT ON SENSITIVITY OF *PSEUDOMONAS* GENUS BACTERIA TO ADAMANTINE DERIVATIVE

N.O. Vrynchanu

INSTITUTE OF PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF AMS OF UKRAINE, KYIV

Summary

Antibacterial activity *in vitro* of adamantane derivative 4-(1-adamantyl)-1-(1-aminobutyl) benzol and Trilon B on bacteria *Pseudomonas* genus has been studied. At combined introduction of substance AM-166 and Trilon B (1 %) the increased sensitivity of bacteria to new adamantane-containing derivative has been established.

KEY WORDS: antibacterial activity, adamantane derivative.

Отримано 13.11.2006 р.

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

ХІМІЧНІ ТА ТЕХНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ПИРІЮ ПОВЗУЧОГО

С.М. Марчишин, О.Б. Калушка

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

Вивчено якісний і кількісний склад основних груп біологічно активних речовин кореневищ і коренів, а також молодій зеленій траві пирію повзучого, вибрано оптимальні технологічні умови одержання суми біологічно активних речовин підземної і надземної частин досліджуваної рослини. Визначено суму фенольних сполук: флавоноїдів, гідроксикоричних кислот і дубильних речовин; амінокислот, полісахаридів, вільних органічних кислот та вільних цукрів у траві, кореневищах і коренях пирію повзучого.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: пирій повзучий, флавоноїди, гідроксикоричні кислоти, дубильні речовини, органічні кислоти, полісахариди, фенольні сполуки, екстракція.

ВСТУП. Пирій повзучий використовується у народній медицині протягом багатьох віків, проте хімічний склад як кореневищ та коренів, так і надземної його частини практично не вивчено [4, 6, 12].

Метою наших досліджень було вивчення якісного і кількісного складу основних груп біологічно активних речовин кореневищ і коренів та молодій зеленій траві пирію повзучого, а також вибір оптимальних технологічних умов одержання суми біологічно активних речовин підземної і надземної частин досліджуваної рослини. Вивчався процес екстрагування суми фенолів, а саме: флавоноїдів, гідроксикоричних кислот і дубильних речовин; амінокислот і полісахаридів, вільних органічних кислот та вільних цукрів. Як екстрагент використовували спирт 70 % і гарячу дистильовану воду. Ефект екстрагування оцінювали при роздільній і ступеневій екстракції (спочатку екстрагування проводили спиртом 70 %, а потім гарячою водою).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Біологічно активні речовини визначали сучасними достовірними методами хроматографії і спектрофотометрії. Суму фенольних сполук визначали спектрофотометричним методом, враховуючи відповідне поглинання цих речовин у ділянці УФ-спектра [8]. Для визначення амінокислот і полісахаридів використовували спектрофотометричні методи, що базуються на кольорових реакціях з хромогенними реактивами [1, 2, 5, 9, 10, 11]; суми вільних органічних кислот, дубильних речовин – титрування кількісно одержаного водного екстракту [3]; вмісту вільних цукрів – о-толуїдиновий метод.

© С.М. Марчишин, О.Б. Калушка, 2007.

У підземних органах пирію повзучого, беручи до уваги характер УФ-спектра і положення максимумів поглинання світла, сума фенольних сполук представлена гідроксикоричними кислотами, тому спектрофотометричне вимірювання проводили при довжині хвилі 272 нм. Вміст суми гідроксикоричних кислот визначали, вимірюючи поглинання екстрактів при $\lambda=324$ нм. Перерахунок вели на хлорогенову кислоту, яка має питомий показник поглинання $E_{1\text{ см}}^{1\%}=520$ [8]. Суму флавоноїдів визначали методом диференціальної спектрофотометрії після взаємодії з хлоридом алюмінію при довжині хвилі 400 нм. Перерахунок вели на рутин ($E_{1\text{ см}}^{1\%}=250$). Суму амінокислот в екстрактах визначали спектрофотометричним методом після того як екстракт обробили нінгідрином у середовищі н-пропанолу [5] в перерахунку на γ -аміномасляну кислоту. Полісахариди (відновлені цукри) визначали спектрофотометричним методом після кислотного гідролізу за реакцією взаємодії з пікриновою кислотою. Перерахунок вели на глюкозу [2, 9, 10, 11]. Суму вільних органічних кислот визначали кількісним екстрагуванням та титруванням розчином натрію гідроксиду (0,1 моль/л). Визначення суми вільних цукрів проводили фотометричним методом після реакції з о-толуїдиновим реактивом (червоний світлофільтр).

У надземній частині пирію повзучого визначали ті ж групи біологічно активних речовин аналогічними методами. Відмінність була лише у тому, що фенольні сполуки, згідно з попередніми дослідженнями [7], у траві пирію представлені, в основному, флавоноїдами і гідроксикоричними кислотами, тому суму фенольних сполук в екстракті надземної частини

визначали, вимірюючи оптичну активність при довжині хвилі 324 нм, у перерахунку на хлорогенову кислоту; потім визначали суму флавоноїдів методом диференціальної спектрофотометрії після взаємодії з хлоридом алюмінію при довжині хвилі 400 нм у перерахунку на рутин.

У зв'язку з тим, що вміст полісахаридної фракції у надземній частині незначний, цю групу сполук визначали гравіметричним методом [1, 10, 11].

З метою вибору екстрагенту для одержання лікарського препарату з рослинної сировини – висушених кореневищ і коренів та трави пирію повзучого – було проаналізовано екстракти, виготовлені двома способами.

Перший спосіб полягав у тому, що як підземну, так і надземну частини пирію екстрагували окремо спиртом 70 % шляхом настоювання протягом 24 год. Кожний спиртовий екстракт зливали, шрот віджимали, заливали кип'яченою дистильованою водою, і двічі проводили екстрагування шротів водою. Спиртоводний і водний екстракти кожного зі зразків об'єднували й упарювали під вакуумом до розчину з вмістом сухих речовин 5-10 %.

Другий спосіб одержання екстрактів для аналізу полягав у тому, що рослинну сировину обох зразків екстрагували тричі кип'яченою водою без попередньої обробки її спиртом 70 %. Екстракти кожного зразка зливали, об'єднували й упарювали під вакуумом до розчину з вмістом сухих речовин приблизно 8-10 %.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати аналізу щодо вмісту біологічно активних речовин у досліджуваних екстрактах підземних і надземних органів пирію повзучого представлено у таблицях 1 і 2.

Аналіз даних, наведених у таблицях 1 і 2, показує, що вміст біологічно активних речовин у водному екстракті кореневищ і коренів пирію повзучого майже такий самий, як у спиртоводному, тому для його одержання достатньо використання як екстрагенту гарячої дистильованої води. Для дослідження біологічної активності надземної частини пирію потрібно використовувати об'єднаний екстракт, одержаний ступінчастим методом – спочатку спиртом 70 %, а потім гарячою дистильованою водою, оскільки даний спиртоводний екстракт містить значно більшу кількість фенольних сполук, особливо флавоноїдів – однієї з основних груп біологічно активних речовин (4,75 % проти 0,98 % у водному екстракті).

ВИСНОВКИ. 1. Проведено аналіз якісного і кількісного складу основних груп біологічно активних речовин надземної і підземної частин пирію повзучого.

2. У траві та кореневищах і коренях пирію повзучого виявлено суму фенольних сполук (гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, дубильних речовин), амінокислот, полісахаридів, органічних кислот, вільних та відновлених цукрів.

Таблиця 1 – Вихід екстрактивних речовин із сировини пирію повзучого

Сировина	Екстрагент	Вихід екстрактивних речовин, %	Фізичні властивості екстракту
Підземна частина	Спирт 70 %	6,10	Світло-сіро-жовтий, висихає, але гігроскопічний
Підземна частина	Гаряча вода	11,87	Сіро-жовтий, висихає, але гігроскопічний
Надземна частина	Спирт 70 %	4,20	Темно-бурий, висихає, але гігроскопічний
Надземна частина	Гаряча вода	18,30	Темно-бурий, не висихає
Шрот підземної частини сухий після обробки спиртом 70 %	Гаряча вода	9,78	Сірувато-жовтий, висихає, але гігроскопічний
Шрот надземної частини сухий після обробки спиртом 70 %	Гаряча вода	15,00	Світло-сіро-коричневий, не висихає

Таблиця 2 – Вміст основних груп біологічно активних речовин у досліджуваних екстрактах пирію повзучого

Біологічно активні речовини	Екстракт кореневищ і коренів, %		Екстракт трави, %	
	Спирт етиловий 70 %, вода	Вода	Спирт етиловий 70 %, вода	Вода
Сума фенольних сполук	3,14	2,65	5,32	2,83
Сума гідроксикоричних кислот	2,20	1,72	3,80	1,92
Сума флавоноїдів	0,40	0,37	4,75	0,98
Амінокислоти	3,23	3,24	5,96	6,34
Відновлені цукри	9,80	10,70	не визн.	не визн.
Полісахариди	10,30	11,20	3,98	4,98
Вільні цукри	30,30	32,0	не визн.	не визн.
Органічні кислоти	6,2	6,5	5,4	6,8
Дубильні речовини	не визн.	9,65	не визн.	10,2

3. Визначено оптимальні умови одержання густого екстракту з надземної і підземної час-

тин пирію, при яких екстрагується максимальна кількість біологічно активних речовин.

ЛІТЕРАТУРА

1. Аммосов А.С., Тимофеев В.В., Литвиненко В.И. Экстрактивные вещества подземных органов *Glycyrrhiza glabra* L. Сообщ. 1: Современное состояние оценки качества сырья, экстрактов и препаратов // Растит. ресурсы. – 1984. – 20, вып. 2. – С. 248-251.
2. Бряд Д., Эгдиктон Г. Применение спектроскопии в органической химии. – М.: Мир, 1967. – 270 с.
3. Государственная фармакопея СССР: Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1990. – 336 с.
4. Гринкевич М.А. Информационный поиск перспективных лекарственных растений. – Ленинград: Наука (Академия наук СССР), 1990. – С. 46.
5. Коренман И.М. Фотометрический анализ. – М.: Химия, 1975. – С. 167.
6. Лавренева Г.В., Лавренев В.К., Лавренев Ю.В. Лекарственные травы для вас. – Донецк: Донеччина, 1994. – С. 146-147.
7. Марчишин С.М., Дахим І.С. Дослідження хімічного складу надземної частини пирію повзучого

Agropyron repens L. // Мед. хімія. – 2004. – 6, № 4. – С. 50-54.

8. Растительные лекарственные средства / Под ред. Н.М. Максютинной. – К.: Здоров'я, 1985. – С. 35, 85, 103.

9. Черонис Н.Д., Ма Т.С. Микро- и полумикрометоды органического функционального анализа. – М.: Химия, 1973. – 576 с.

10. Эльшами И.Э.М. Получение и исследование полисахаридов бессмертника песчаного: Автореф. дис. ... канд. фармац. наук. – Харьков, 1979. – 22 с.

11. Яковлев А.И. Получение и химическое исследование полисахаридов соцветий ромашки лекарственной: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 1977. – 22 с.

12. Ярні Е.І. О мерах по удовлетворению потребностей органов здравоохранения и медицинской промышленности в сырье лекарственных растений и по обеспечению рационального использования их природных ресурсов // Сб. научн. трудов ВИЛР: Ресурси дикорастущих лекарственных растений СССР. – 1984. – С. 156-164.

ХИМИЧЕСКИЕ И ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЫРЕЯ ПОЛЗУЧЕГО

С.М. Марчишин, Е.Б. Калушка

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

Изучен качественный и количественный состав основных групп биологически активных веществ корневищ и корней, а также молодой зеленой травы пырея ползучего, выбраны оптимальные технологические условия получения суммы биологически активных веществ подземной и надземной частей исследуемого растения. Определена сумма фенольных соединений: флавоноидов, гидроксикоричных кислот и дубильных веществ; аминокислот, полисахаридов, свободных органических кислот и свободных сахаров в траве, корневищах и корнях пырея ползучего.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пырей ползучий, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, дубильные вещества, органические кислоты, полисахариды, фенольные соединения, экстракция.

CHEMICAL AND TECHNOLOGICAL ASPECTS OF THE COUCH-GRASS RESEARCH

S.M. Marchyshyn, O.B. Kalushka

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

A qualitative and quantitative composition of basic groups of biologically active substances of rhizomes and roots, young green grass of the couch-grass has been researched and the optimum technological conditions for reception of biologically active substances sum from underground and above-ground parts of the plant have been chosen. The sum of phenolic compounds has been defined: flavonoids, hydroxycinnamic acids and tannic substances; aminoacids, polysaccharides, free organic acids and free sugars in grass, rhizomes and roots of couch-grass.

KEY WORDS: couch-grass, flavonoids, hydroxycinnamic acids, tannic substances, organic acids, polysaccharides, phenolic substances, extraction.

Отримано 13.11.2006 р.

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

ВИВЧЕННЯ ЗМІН ЖИРНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ ЛІПІДІВ КРОВІ У ХВОРИХ ІЗ ХРОНІЧНОЮ НИРКОВОЮ НЕДОСТАТНІСТЮ

Е.К. Красюк¹, Н.Г. Алексеева¹, Т.С. Брюзгіна

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ
КИЇВСЬКИЙ МІСЬКИЙ НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ ЦЕНТР НЕФРОЛОГІЇ І ГЕМОДІАЛІЗУ¹

Наведено результати газохроматографічного аналізу жирнокислотного складу ліпідів сироватки та плазми крові хворих із хронічною нирковою недостатністю. Отримані дані можуть бути використані в клініці для розробки терапевтичних підходів з метою підвищення ефективності лікування.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ліпіди, сироватка, плазма, жирні кислоти, хронічна ниркова недостатність.

ВСТУП. Хронічна ниркова недостатність (ХНН) є однією з найважливіших проблем сучасної нефрології. Актуальність вивчення даної патології визначається її тяжкістю, негативним впливом на гомеостаз організму людини, функціонування всіх органів і систем, що, у свою чергу, призводить до прогресування, розвитку ускладнень і зумовлює необхідність проведення замісної терапії [3].

Останнім часом велику увагу приділяють вивченню неімуних патогенетичних механізмів формування та прогресування ХНН, серед яких найважливішими є гомодинамічні та метаболічні порушення [6].

Активізація процесів ПОЛ у структурах нирок викликає запалення та деструкцію клітинних мембран, порушуючи збалансованість функціонування прооксидантної та антиоксидантної систем, що є однією з важливих причин прогресування ХНН [2].

Порушення ліпідного обміну розглядають як фактор ураження нефрону безпосередньо високими концентраціями ліпопротеїдів та посиленням перекисного окиснення ліпідів внаслідок підвищення концентрації субстрату окиснення. Активізація процесів перекисного окиснення ліпідів порушує рівновагу між прооксидантною та антиоксидантною системами, що призводить до прогресування хронічної ниркової недостатності [5].

Таким чином, виникає необхідність пошуку нових способів підвищення ефективності терапії хворих із ХНН і розробки методології лікування на різних етапах її прогресування.

© Е.К. Красюк, Н.Г. Алексеева, Т.С. Брюзгіна, 2007.

Метою наших досліджень було вивчення змін жирнокислотного складу ліпідів крові хворих із ХНН методом газорідної хроматографії.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Обстежено 45 хворих віком від 25 до 50 років із ХНН. Контрольну групу склали 20 практично здорових людей того ж віку. Діагноз встановлювали на основі анамнестичних даних біохімічного, клінічного та інструментального обстежень. Об'єктами наших досліджень були сироватка та плазма крові з метою встановлення найбільш інформативного біологічного тесту.

Підготовку біологічного матеріалу, газохроматографічний аналіз жирнокислотного спектра ліпідів сироватки та плазми крові проводили за методиками [4,7].

У спектрі жирних кислот (ЖК) ліпідів крові хворих із ХНН було ідентифіковано 8 найбільш інформативних ЖК: $C_{14:0}$ міристинову, $C_{16:0}$ пальмітинову, $C_{16:1}$ пальмітоолеїнову, $C_{18:0}$ стеаринову, $C_{18:1}$ олеїнову, $C_{18:2}$ лінолеву, $C_{18:3}$ ліноленову, $C_{20:4}$ арахідонову.

Піки ЖК ідентифікували шляхом порівнявання з часом утримання піків стандартних ЖК. Кількісну оцінку ЖК ліпідів крові проводили методом нормування площин піків метилових похідних ЖК та визначали їх вміст у відсотках. Результати обробляли методом варіаційної статистики з використанням t-критерію Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Результати газохроматографічного аналізу наведено у

таблиці 1. Вони свідчать про те, що у сироватці крові хворих із ХНН, незалежно від ступеня тяжкості патологічного процесу, жирнокислотний склад ліпідів достовірно відрізнявся від контролю за ступенем ненасиченості за рахунок вірогідного збільшення суми ПНЖК.

Незалежно від ступеня тяжкості патологічного процесу ліпідний комплекс у сироватці крові характеризувався достовірною зміною вмісту пальмітинової, стеаринової, олеїнової, лінолевої та арахідонової ЖК. Причому різке збільшення рівня арахідонової ЖК (у 3 рази) на фоні підвищеного вмісту лінолевої ЖК (у 1,5 раза) свідчило про порушення метаболізму есенціальних ЖК на етапі утворення ейкоза-

ноїдів, що добре узгоджується з літературними даними [1].

Достовірно зменшений вміст пальмітинової ЖК у ліпідах сироватки крові може бути результатом порушень ліпідного обміну в печінці. Зниження вмісту стеаринової та олеїнової ЖК може зумовлювати зміни ліпідного метаболізму сироватки крові в результаті активації процесу ліпідної пероксидації при ХНН.

Таким чином, отримані дані про сироватку крові хворих із ХНН характеризують патологічний процес як порушення метаболізму есенціальних ЖК (надлишок ПНЖК може слугувати фактором ризику і зумовлювати ступінь тяжкості патологічного процесу).

Таблиця 1 – Жирнокислотний спектр ліпідів сироватки та плазми крові хворих із ХНН (у %)

Назва ЖК	СИРОВАТКА		ПЛАЗМА		
	контроль	ХНН	контроль	ХНН – 1	ХНН – 2
C _{14:0}	–	8,4±1,4	8,7±1,1	8,2±0,8	7,8±1,0
C _{16:0}	41,9 ± 0,9	32,6±1,8*	33,6±1,0	30,6±1,5	26,7±1,7
C _{16:1}	–	2,4±0,3	–	1,8±0,3	2,2±0,2
C _{18:0}	15,1±1,1	7,4±1,0*	9,7±0,3	6,4±0,8	5,9±0,6
C _{18:1}	24,2±0,6	11,1±1,5*	15,5±1,3	11,4±0,7*	8,4±1,2*
C _{18:2}	16,0±1,4	24,1±2,1*	25,7±1,8	22,2±1,5*	19,9±1,9*
C _{18:3}	0,3±0,05	2,5±0,3	0,4±0,08	9,8±1,0*	22,2±1,6*
C _{20:3}	–	–	0,5±0,08	–	–
C _{20:4}	2,5±0,3	11,5±1,1*	5,8±0,6	9,6±1,0*	7,0±0,9*
Сума нас. ЖК	57,0±1,3	48,4±2,5*	52,0±2,0	45,2±1,8*	40,4±1,4*
Сума ненас. ЖК	43,0±1,3	51,6±2,5*	48,0±2,0	54,8±1,8*	59,6±1,4*
Сума ПНЖК	18,8±1,4	38,1±2,3*	32,5±1,7	41,6±1,6*	49,0±1,2*

Примітка. * – p<0,05 порівняно з контролем.

Як видно з таблиці 1, отримані дані щодо плазми крові поділено на 2 групи (за ступенем тяжкості патологічного процесу). Порівнюючи результати газохроматографічного аналізу у хворих із ХНН з показниками контролю, було виявлено вірогідні відмінності відносно ненасиченості ліпідного комплексу плазми крові. Мала місце тенденція до зменшення вмісту пальмітинової і стеаринової ЖК. Достовірно знижувались рівні олеїнової і лінолевої ЖК на фоні підвищеного вмісту арахідонової ЖК, що зумовлювало вірогідне збільшення суми ПНЖК.

Особливістю жирнокислотного спектра ліпідів плазми крові хворих із ХНН є наявність

великої кількості лінолевої ЖК, причому її вміст відрізняється між групами пацієнтів (1 і 2) майже у 2 рази, а відносно контролю – у 10 та 20 разів відповідно. Така зміна есенціальних ЖК може слугувати критерієм при оцінці ступеня тяжкості патологічного процесу у хворих із ХНН. Накопичення есенціальних ЖК у плазмі крові пацієнтів із ХНН є результатом активації процесу ліпідної пероксидації, що призводить до порушень їх метаболізму.

ВИСНОВОК. Оцінка порушень ліпідного метаболізму плазми крові у хворих із ХНН може бути інформативним тестом при виборі обґрунтованого терапевтичного впливу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Афонина Г.Б., Куюн Л.А. Липиды, свободные радикалы и иммунный ответ. – К.: НМУ, 2000. – 285 с.

2. Нікула Г.Г., Баран Є.Я., Король Л.В. Стан процесів ліпопероксидації та ферментів антиоксидантного захисту у хворих на ХНН // Матеріали XIII Все-

укр. конф. нефрологів "ХНН". – Х., 1999. – С. 18-20.
 3. Никула Т.Д. Хронічна ниркова недостатність. – К.: За друга, 2001. – С. 26-42.
 4. Сазоненко Л.В., Вітовський Я.М., Брюзгіна Т.С., Вретік Г.М. Дослідження змін жирнокислотного спектру ліпідів сироватки крові у вагітних з прееклампсією // Мед. хімія. – 2003. – № 3. – С. 113-115.
 5. Степанова Н.М. Стан прооксидантної і антиоксидантної систем у хворих з хронічною нирковою

недостатністю та шляхи його корекції // Ліки України. – 2003. – № 3 (68). – С. 10-12.
 6. Тареева И.В., Кутыркина И.М., Николаев А.Ю. и др. Пути торможения и развития ХПН // Терапевт. арх. – 2000. – № 6. – С. 9-14.
 7. Яременко О.Б., Брюзгіна Т.С., Камиш О.Ю., Вретік Г.М. Оцінка жирнокислотного складу ліпідів крові у хворих на ревматоїдний артрит // Мед. хімія. – 2005. – № 2. – С. 86-88.

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА ЛИПИДОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ ПОЧЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Э.К. Красюк¹, Н.Г. Алексеева¹, Т.С. Брюзгина
 НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. А.А. БОГОМОЛЬЦА
 КИЕВСКИЙ ГОРОДСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧНЫЙ ЦЕНТР НЕФРОЛОГИИ И ГЕМОДИАЛИЗА¹

Резюме

Приведены результаты газохроматографического анализа жирнокислотного состава липидов сыворотки и плазмы крови больных с хронической почечной недостаточностью. Полученные данные могут быть использованы в клинике для разработки терапевтических подходов с целью повышения эффективности лечения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **липиды, сыворотка, плазма, жирные кислоты, хроническая почечная недостаточность.**

INVESTIGATION OF CHANGES OF FATTY-ACID STRUCTURE OF BLOOD LIPIDS AT PATIENTS WITH CHRONIC RENAL INSUFFICIENCY

E.K. Krasnyuk¹, N.H. Alekseyeva¹, T.S. Bryuzgina
 NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY O.O. BOHOMOLET
 KYIV CITY SCIENTIFIC-PRACTICAL CENTRE OF NEPHROLOGY AND HEMODIALYSIS¹

Summary

The results of gas-chromatographic analysis of fatty-acid structure of blood plasma lipids and blood serum of the patients with chronic renal insufficiency are adduced. The received results can be used in clinics for elaboration of therapeutic approaches in order to make the treatment more effective.

KEY WORDS: **lipids, blood serum, plasma, fatty acids, chronic renal insufficiency.**

Отримано 29.01.2007 р.

Адреса для листування: Т.С. Брюзгіна, Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, вул. Пушкінська, 22, Київ, 01000, Україна.

МАРКЕРИ КІСТКОВОГО МЕТАБОЛІЗМУ ТА ДЕСТРУКЦІЇ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ У ХВОРИХ НА ХРОНІЧНІ ЗАПАЛЬНІ ЗАХВОРЮВАННЯ ГАСТРОДУОДЕНОПАНКРЕАТИЧНОЇ ЗОНИ І ПЕЧІНКИ

С.М. Андрейчин, Т.В. Лихацька

ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

У роботі наведено дані про зв'язок між маркерами кісткового метаболізму та деструкції сполучної тканини, кальцієво-фосфорним обміном, мінеральною щільністю кісткової тканини у хворих на хронічні запальні захворювання гастроудоденопанкреатичної зони та печінки.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: хронічні запальні захворювання гастроудоденопанкреатичної зони, печінка, мінеральна щільність кісткової тканини, кальцій, фосфор, лужна фосфатаза.

ВСТУП. Кісткова тканина (КТ) складається з органічного та неорганічного компонентів. Мінеральний компонент забезпечує цілісність кісткової тканини при механічному навантаженні та залишається метаболічно стійким за нормальних умов. Кістка, як і кожний орган, перебуває в безпосередньому процесі творення (кісткоутворення і кісткоруйнування) [6, 7], що лежить в основі кісткового ремоделювання [3, 4].

У здорових молодих людей швидкість обміну (ремоделювання) КТ залишається постійною: кількість КТ, яка резорбується остеокластами, майже відповідає кількості КТ, утвореної остеобластами [1, 2, 7]. У цьому метаболізмі важливу роль відіграють кальцій і фосфор [8].

Розрізняють маркери формування КТ, до яких належать лужна фосфатаза (ЛФ), остеокальцик, пропептиди проколагену. Найдоступнішим методом, що характеризує активність остеобластів, є визначення загальної лужної фосфатази [5, 6].

До маркерів резорбції КТ відносять фермент кислу фосфатазу та продукти деградації цієї тканини, які включають кальцій і продукти руйнування кісткового матриксу (гідроксипролін, піридинові поперечні зв'язки та телопептиди). Оксипролін входить до складу колагену та еластину. Концентрація оксипроліну – показник вмісту колагену і загальної кількості сполучнотканинних білків [5, 7, 9].

Загальна кількість колагену (оксипроліну) відображає розвиток у печінці сполучнотка-

нинних прошарків і корелює з гістологічною інтенсивністю фіброзу [7].

Існують колагеночутливі В-клітини, про що свідчить здатність лімфоїдних клітин продукувати антитіла до сполучнотканинних структур і колагену II типу. Розроблено спосіб виявлення антигенезалежної активації, що базується на визначенні Ig-синтезувальної функції лімфоцитів за присутності стандартизованого препарату екстракту хряща – румалону (Рм), що містить глюкозамінглікан-протеїновий комплекс.

Метою нашого дослідження було вивчити маркери кісткового метаболізму, деструкції сполучної тканини, кальцієво-фосфорного обміну та особливості змін мінеральної щільності кісткової тканини (МЩКТ) у хворих на хронічний гастроудоденіт (ХГД), хронічний панкреатит (ХП) і хронічний гепатит (ХГ).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Обстежено 30 хворих на ХГД, 44 – на ХГД і ХП та 62 – на ХГД, ХП на тлі ХГ, в яких не було іншої тяжкої супровідної патології, що могла б спричинити зміни в КТ. Контрольну групу склали 20 здорових осіб. Діагноз верифікували на основі загальноприйнятих клініко-лабораторних та інструментальних обстежень.

В усіх хворих досліджували структурно-функціональний стан КТ поперекового відділу хребта та проксимального відділу правої стегнової кістки за допомогою двофотонного рентгенівського денситометра ("Lunar Corp", США). Концентрацію кальцію, фосфору й активність загальної ЛФ в сироватці крові визна-

чали за допомогою наборів фірми "LACHEMA" (Чехія). Метаболізм сполучної тканини – за активністю оксипроліну (за В.В. Меншиковим, 1987) та румалоночутливих антитіл (за Е.В. Бененсон і співавт., 1992).

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Усіх хворих, згідно з отриманими даними денситометрії, було поділено на 3 групи: 1-ша – хворі з нормальною МЩКТ; 2-га – хворі з остеопенією; 3-тя – хворі з остеопорозом. Вміст маркерів метаболізму КТ, деструкції сполучної тканини, кальцію і фосфору наведено в таблиці 1.

У пацієнтів відмічено остеодефіцит різного ступеня: остеопенію – у 60,0 % хворих на ХГД; остеопенію – у 20,5 %, остеопороз – у 52,5 % хворих на ХГД у поєднанні з ХП; остеопенію – у 56,5 %, остеопороз – у 32,3 % хворих на ХГД і ХП на тлі ХГ.

Аналіз показав нормальну концентрацію кальцію у крові хворих як з незміненою МЩКТ, так і з остеопатіями ($p > 0,05$). Концентрація фосфору в сироватці крові була в межах норми і при остеопатіях, і при нормальній МЩКТ. Активність ЛФ була дещо підвищена у хворих на ХГД і ХП на тлі ХГ, проте найвищу активність цього ферменту виявлено при остеопорозі.

У всіх пацієнтів, незалежно від хвороби, при поглибленні остеодефіциту збільшились рівні оксипроліну і РмАт ($p < 0,05$), що вказує на тісний зв'язок колагеноутворювальної функції

сполучної тканини та МЩКТ і на резорбцію кісткової тканини. Румалоночутливий клон В-клітин при ХГД і ХП на тлі ХГ можна вважати фактором розвитку деструкції сполучної тканини (хряща).

Можна припустити, що при досліджених хворобах підтримка рівня кальцію і фосфору в крові здійснюється за рахунок руйнування КТ і навіть розвитку остеопорозу. Проте не було виявлено прямого зв'язку між ступенями остеодефіциту та вмістом цих елементів у сироватці крові.

ВИСНОВКИ. 1. У хворих на хронічний гастродуоденіт, панкреатит і хронічний гепатит у поєднанні частота виникнення остеодефіциту становила 88,8 % (із них остеопенія – 56,5 %, остеопороз – 32,3 %), на хронічний гастродуоденіт з панкреатитом – 73,3 % (остеопенія – 20,5 %, остеопороз – 52,7 %), на хронічний гастродуоденіт – 60,0 % (остеопенія).

2. Відмічено підвищення активності лужної фосфатази і вмісту оксипроліну та румалоночутливих антитіл у крові хворих з остеопорозом, що свідчить про порушення кісткового метаболізму та деструкцію сполучної тканини.

3. Визначення вмісту кальцію і фосфору в сироватці крові не є інформативними у хворих з остеодефіцитом для вивчення метаболізму на тлі ХГД, ХП і ХГ.

Таблиця 1 – Маркери метаболізму КТ та деструкції сполучної тканини, кальцієво-фосфорного обміну у хворих на хронічні запальні захворювання гастродуоденопанкреатичної зони та печінки ($M \pm m$)

Параметр		Контрольна група	Норма	Остеопенія	Остеопороз
ХГД, n=30	Кальцій, ммоль/л	2,42±0,03	2,58±0,02	2,48±0,22	–
	Фосфор, ммоль/л	1,09±0,06	1,16±0,18	1,20±0,19	–
	Лужна фосфатаза, ммоль/л	1,50±0,06	1,36±0,04	1,42±0,04	–
	Оксипролін, мкмоль/л	29,50±1,50	48,73±1,41*	58,11±1,45*,**	–
	РмАт, од. оптичн. щільн.	16,53±2,22	35,28±1,10*	42,11±1,38*,**	–
	Кількість хворих	20	12	18	–
ХГД з ХП, n=44	Кальцій, ммоль/л	2,42±0,03	2,49±0,04	2,45±0,09	2,40±0,08
	Фосфор, ммоль/л	1,09±0,06	1,27±0,02	1,21±0,04	1,19±0,07
	Лужна фосфатаза, ммоль/л	1,50±0,06	1,35±0,04	1,41±0,09	1,44±0,11
	Оксипролін, мкмоль/л	29,50±1,50	53,09±1,13*	61,63±1,20*,**	65,74±1,20*,**,*
	РмАт, од. оптичн. щільн.	16,53±2,22	41,40±0,93*	45,45±0,73*,**	51,47±0,75*,**,*
	Кількість хворих	20	12	23	9
ХГД і ХП на тлі ХГ, n=62	Кальцій, ммоль/л	2,42±0,03	2,50±0,06	2,45±0,09	2,44±0,07
	Фосфор, ммоль/л	1,09±0,06	1,27±0,03	1,18±0,04	1,15±0,07
	Лужна фосфатаза, ммоль/л	1,50±0,06	1,41±0,10	1,59±0,07	1,89±0,09*
	Оксипролін, мкмоль/л	29,50±1,50	58,67±1,54*	67,42±0,94*,**	73,73±1,04*,**,*
	РмАт, од. оптичн. щільн.	16,53±2,22	46,32±1,19*	50,48±0,86*,**	57,53±1,00*,**,*
	Кількість хворих	20	7	35	20

Примітка. * – достовірність різниці показників у хворих на хронічні запальні захворювання гастродуоденопанкреатичної зони і печінки та контрольної групи; ** – достовірність різниці показників у хворих з нормальною МЩКТ та остеопенією; *** – достовірність різниці показників у хворих з остеопенією та остеопорозом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бабінець Л.С. Денситометричний аналіз стану кісткової тканини у хворих на хронічний панкреатит // Архів клінічної медицини. – 2004. – № 2. – С. 33-35.
2. Бойко Т.Й., Сорочан О.В., Єгоров А.Ф. Стан мінеральної щільності кісткової тканини при хронічних неспецифічних запальних захворюваннях кишок // Сучасна гастроентерологія. – 2005. – № 5. – С. 48-52.
3. Клубова А.Ф., Гавриленко Т.И., Дейкун А.И. и др. Апоптоз и остеопороз // Укр. ревматол. журн. – 2000. – № 1. – С. 19-22.
4. Митник З.М. Порівняльна характеристика мінеральної щільності кісткової тканини поперекового відділу хребта і стегнової кістки у хворих на хронічні гепатити // Галицький лікарський вісник. – 2003. – № 3. – С. 58-60.
5. Насонов Е.Л. Проблемы остеопороза: изучение биохимических маркеров костного метаболизма // Клини. медицина. – 1998. – № 5. – С. 20-23.
6. Остеопороз: эпидемиология, клиника, диагностика, профилактика и лечение / Под ред. Н.А. Корж, В.В. Поворознюк, Н.В. Дедух, И.А. Зупонец. – Харьков: Золотые страницы, 2002. – 646 с.
7. Поворознюк В.В. Міжнародна декада захворювань кісток та суглобів: участь Української асоціації остеопорозу // Журнал практичного лікаря. – 2003. – № 3. – С. 2-9.
8. Симоненко В.Б., Волков Б.Е., Берестовая Н.А. Остеопороз: современные подходы и новые возможности в профилактике и лечении // Клини. медицина. – 2006. – № 9. – С. 4-7.
9. Kanis A.G. Postmenopausal osteoporosis: Who to treat // Medicographia. – 2004. – 26 (3). – P. 232-237.

МАРКЕРЫ КОСТНОГО МЕТАБОЛИЗМА И ДЕСТРУКЦИИ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ГАСТРОДУОДЕНОПАНКРЕАТИЧЕСКОЙ ОБЛАСТИ И ПЕЧЕНИ

С.М. Андрейчин, Т.В. Лихацкая

ТЕРНОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.Я. ГОРБАЧЕВСКОГО

Резюме

В работе приведены данные о связи между маркерами костного метаболизма и деструкции соединительной ткани, кальций-фосфорным обменом, минеральной плотностью костной ткани у больных хроническими воспалительными заболеваниями гастродуоденопанкреатической области и печени.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: хронические воспалительные заболевания гастродуоденопанкреатической области, печень, минеральная плотность костной ткани, кальций, фосфор, щелочная фосфатаза.

MARKERS OF BONE METABOLISM AND DESTRUCTION OF CONNECTIVE TISSUE IN PATIENTS WITH CHRONIC INFLAMMATORY DISEASE OF GASTRODUODENOPANCREATIC AREA AND LIVER

S.M. Andreychyn, T.V. Lykhatska

TERNOPIL STATE MEDICAL UNIVERSITY BY I.YA. HORBACHEVSKY

Summary

The data on connection between the markers of bone metabolism and destruction of connective tissue, calcium-phosphoric metabolism, mineral density of the bone tissue in patients with chronic inflammatory diseases of gastroduodenopancreatic area and liver are adduced in the article.

KEY WORDS: chronic inflammatory diseases of gastroduodenopancreatic area, liver, mineral density of the bone tissue, calcium, phosphorus, alkaline phosphatase.

Отримано 26.12.2006 р.

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

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АМІЗОНУ В ПЛАЗМІ КРОВІ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

О.В. Ільченко, О.О. Пентюк, Н.В. Заїчко, О.С. Азаров

ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА

Розроблено унікальний метод кількісного визначення амізону в плазмі крові. До 0,5 мл плазми крові додавали 1,5 мл ацетонітрилу. Суміш центрифугували, надосадову рідину зливали і додавали до неї 3,5 мл хлороформу. Суміш рідин струшували протягом 30 с, потім центрифугували. Верхній рідкий шар після фільтрування хроматографували на колонці Zorbax Eclipse XDB-C8 (150x2,1 мм, 5 мкм). Застосовано ізократичне елюювання. Склад мобільної фази (за об'ємом): 40 % метанол на 0,04 М фосфатному буфері (рН=3,0) з додаванням гептансульфонату натрію (0,1 мг/мл). Детектування проводили при довжині хвилі 268 нм. У діапазоні концентрацій амізону від 0,1 до 50 мкг/мл зберігається пропорційна залежність між площею хроматографічного піку та кількістю препарату в пробі. Виявлено, що через 1-6 год після прийняття 500 мг препарату його концентрація в крові є незвичайно малою та не перевищує 50-80 нг/мл.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **амізон, вискоєфективна рідинна хроматографія.**

ВСТУП. Амізон – ненаркотичний анальгетик, розроблений та синтезований в Україні. Він являє собою сполуку з ряду похідних ізонікотинової кислоти, а саме: N-метил-4-бензилкарбамідопіридинію йодид. Має виражену протизапальну, жарознижувальну, інтерферогенну й імунomodulatory дію [1, 6, 9].

Розробка нових лікарських форм цього препарату, численні дослідження використання амізону в інших галузях медицини (наприклад як противірусний засіб) потребують визначення концентрації амізону з метою вивчення його розподілу по органах та дослідження параметрів його фармакокінетики, що, у свою чергу, є необхідним для відпрацювання частоти призначення препарату і величини його дози.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. До 0,5 мл плазми крові додавали 1,5 мл ацетонітрилу. Пробу енергійно струшували протягом 1 хв, після чого центрифугували 10 хв при 1000 об./хв. Надосадову рідину відокремлювали, додавали до неї 3,5-4,0 мл хлороформу. Суміш рідин енергійно струшували протягом 30 с, після чого рідини розділяли шляхом центрифугування впродовж 10-20 хв при 3000 об./хв. При цьому рідина розшаровувалась: верхній шар – водний розчин, нижній – хлороформ-ацетонітрильна суміш.

Верхній рідкий шар відбирали та пропускали крізь мембранний фторопластовий фільтр

© О.В. Ільченко, О.О. Пентюк, Н.В. Заїчко, О.С. Азаров, 2007.

МФФКГ-3 (НПФ "Біохром") з розміром пор 0,45 мкм.

Кількісне визначення амізону проводили на вискоєфективному рідинному хроматографі HP-1100 "Leonardo" з колонкою розміром 150x2,1 мм, заповненою твердою фазою Zorbax Eclipse XDB-C8 з розміром гранул 5 мкм. У колонку вводили 20 мкл відфільтрованої рідини. Застосовували ізократичне елюювання зі складом мобільної фази (за об'ємом):

А (60 %) – 0,04 М фосфатний буфер (рН=3,0), який містив гептансульфонат натрію (1-heptanesulfonic acid sodium salt, SIGMA) у кількості 0,1 мг/мл;

В (40 %) – метанол (HPLC grade, ALDRICH).

Швидкість елюювання – 100 мкл/хв, температура колонки – 20 °С. Детектування амізону проводили при довжині хвилі 268 нм. За цих умов час виходу амізону з колонки складав приблизно 14 хв.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. На момент виконання роботи методів визначення концентрації амізону в біологічних рідинах, у тому числі й методом вискоєфективної рідинної хроматографії, не існувало.

Амізон за хімічною структурою є четвертинною амонієвою сполукою. Цілком природно, що найпростіший метод кількісного визначення препарату – метод вискоєфективної рідинної хроматографії – повинен передбачати застосування іонообмінної колонки. Але через високу вартість, порівняно з традиційними зворотно-

фазними C8-C18, використання іонообмінних колонок не було досліджено. З тієї ж причини не досліджували спеціально дезактивовані фази C8-C18.

Метод значно спрощується завдяки заміні міжфазної екстракції з плазми крові (рідина-рідина або у твердофазному патроні) на однофазну екстракцію в ацетонітрил, що є набагато дешевшою процедурою порівняно з екстракцією у твердофазних патронах.

Концентрацію препарату визначали методом зовнішнього стандарту. Як стандарт використовували зразки плазми крові, до яких додавали певну кількість розчину субстанції амізону фармакопейної якості (БАТ "Фармак", Україна).

Стандартні зразки піддавали такій самій обробці, як і зразки, що підлягали визначенню вмісту амізону.

При визначенні величини втрат амізону в процесі пробопідготовки однакову кількість розчину препарату додавали до певних об'ємів плазми та води. Концентрація амізону в розчинах складала 1, 3, 10 мкг/мл. Розчини препарату в плазмі та частину водних розчинів піддавали повному циклу пробопідготовки, інша частина водних розчинів являла собою контроль, її вводили в колонку безпосередньо після фільтрування. Встановлено, що відносні втрати амізону в процесі пробопідготовки не залежать від концентрації та складають 3-5 %.

У діапазоні концентрацій амізону від 0,1 до 50 мкг/мл зберігалася пропорційна залежність між площею хроматографічного піку та кількістю препарату в пробі.

При визначенні препарату, доданого до плазми у концентраціях від 0,50 до 4,00 мкг/мл (серіями по 5 паралельних проб), величина відносної похибки середнього результату не перевищувала 4,5 % для довірчого інтервалу $P=0,95$. Нижня межа визначення амізону складала 100 нг/мл (відношення "сигнал/шум" > 10).

Описаним методом проведено визначення концентрації амізону в плазмі крові людей при прийманні його у вигляді таблеток. Концентрацію визначали у трьох здорових добровольців – чоловіків віком від 35 до 45 років, середня

маса тіла – $(75 \pm 3,3)$ кг. Вони натще приймали амізону (500 мг), запиваючи його 100 мл води. Кров для аналізу брали з ліктьової вени до приймання препарату і через 1, 2, 4, 6 год після його прийняття. Кров відбирали в пробірки, які містили ЕДТА у кількості, еквівалентній 1 мг/мл крові. З одержаної крові виділяли плазму, яку піддавали подальшій обробці.

Встановлено, що концентрація амізону в плазмі крові після його прийняття у дозі 500 мг є неочікувано малою, перебуває фактично на межі визначення методу і складає від 80 (на 1 годину після прийняття) до 50 нг/мл (на 6 годину після прийняття).

Було висунуто припущення, що амізону розкладається в крові або плазмі. З метою перевірки цього припущення у добровольця Ю. було взято 10 мл крові до пробірки, що містила 10 мг ЕДТА та 0,1 мл розчину амізону з концентрацією 100 мкг/мл. Після ретельного перемішування з ЕДТА кров залишалася протягом 2 год при кімнатній температурі. Потім відокремлювали плазму і заморожували її при -12°C на 12 год. Після розморожування в плазмі визначали кількість препарату. При цьому будь-якого розкладення амізону в крові або плазмі за описаних умов пробопідготовки не спостерігалось.

ВИСНОВКИ. 1. Розроблено методику кількісного визначення амізону в плазмі крові на вискоєфективному рідинному хроматографі НР-1100.

2. Встановлено, що концентрація амізону в сироватці людини після перорального приймання препарату в терапевтичних дозах є надзвичайно низькою порівняно з концентрацією інших лікарських препаратів, які приймають у такій же кількості [2-5, 7, 8]. Причиною цього може бути або погане всмоктування амізону з ШКТ, або велика швидкість метаболізму амізону. В будь-якому випадку є сенс дослідити можливість створення нової лікарської форми амізону, застосування якої дозволило б при зменшенні дози препарату збільшити його концентрацію в крові.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бухтиарова Т.А. Амизон – новый неопиоидный анальгетик с противовоспалительным, жаропонижающим и интерферогенными свойствами // Ліки. – 1997. – № 3. – С. 69-70.
2. Волощук Н.І., Пентюк О.О., Гулько І.П., Ільченко О.В. Вплив статевого диморфізму на фарма-

кокінетику та анальгезуючий ефект німесулід // Ліки. – 2003. – № 1-2. – С. 51-59.

3. Ильченко А.В., Азаров А.С. Флуорометрическое определение концентрации берберина в крови // Клини. лаб. диагностика. – 1994. – № 4. – С. 49-50.

4. Ильченко О.В., Луцюк М.Б. Флуорометричне визначення концентрації фенікаберану в крові // Фармац. журн. – 1993. – № 4. – С. 18.

5. Ильченко О.В., Станіславчук М.А., Пентюк О.О. Флуориметричний спосіб визначення ацетилсаліцилової та саліцилової кислот в біологічному матеріалі за умов їх одночасної присутності // Фармац. журн. – 1995. – № 6. – С. 56-58.

6. Карпова О.И. Амизон – новый отечественный ненаркотический анальгетик // Проблемы медицины. – 1998. – № 3. – С. 38-39.

7. Косован А.І., Яковлева О.О., Ильченко О.В. та ін. Кількісне визначення теофіліну в сироватці крові

методом високоефективної рідинної хроматографії // Мед. хімія. – 2001. – 3, № 2. – С. 81-84.

8. Пентюк А.А., Ильченко А.В., Серкова В.К. и др. Сравнительная фармакокинетика хинидина сульфата и лечебные формы хинидина, полученные в результате конъюгации на поверхности высокодисперсных кремнеземов // Українська наукова конференція за участю країн СНД "Актуальні проблеми клінічної фармакології": Тези доповідей. – Вінниця, 1993. – С. 209.

9. Фролов А.Ф., Фролов В.М., Лоскутова И.В. Опыт клинического применения нового украинского препарата АМИЗОНА // Еженедельник Аптека. – 2000. – № 4 (225). – С. 32-33.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИЗОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.В. Ильченко, А.А. Пентюк, Н.В. Заичко, А.С. Азаров
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЦИНСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. Н.І. ПІРОГОВА

Резюме

Разработан уникальный метод количественного определения амизона в плазме крови. К 0,5 мл плазмы крови добавляли 1,5 мл ацетонитрила. Смесь центрифугировали, надосадочную жидкость сливали и добавляли к ней 3,5 мл хлороформа. Смесь жидкостей встряхивали в течение 30 с, затем центрифугировали. Верхний редкий слой после фильтрования хроматографировали на колонке Zorbax Eclipse XDB-C8 (150x2,1 мм, 5 мкм). Применено изократическое элюирование. Состав мобильной фазы (по объему): 40 % метанол на 0,04 М фосфатном буфере (pH=3,0) с добавкой гептансульфоната натрия (0,1 мг/мл). Детектирование проводили при длине волны 268 нм. В диапазоне концентраций амизона от 0,1 до 50 мкг/мл сохраняется пропорциональная зависимость между площадью хроматографического пика и количеством препарата в пробе. Оказалось, что через 1-6 часов после приема 500 мг препарата его концентрация в крови необычайно низка и не превышает 50-80 нг/мл.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амизон, высокоэффективная жидкостная хроматография.

QUANTITATIVE DETERMINATION OF AMIZONE IN BLOOD PLASMA BY HIGHLY-EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY METHOD

O.V. Ilchenko, O.O. Pentyuk, N.V. Zaichko, O.S. Azarov
VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY M.I. PYROHOV

Summary

A unique highly-effective liquid chromatographic procedure was developed for amizone quantification in blood plasma. The method involves precipitation of proteins with acetonitrile (1,5 ml AcN to 0,5 ml of plasma) followed by treatment of supernatant by 3,5 ml of Chloroformium. The mixture of fluids was shaken up within 30 seconds, then it was centrifuged. The separation of amizone was achieved on a column Zorbax Eclipse XDB-C8 (150x2,1 mm, 5 microns). The mobile phase consisted of 40 % (vol/vol) methanol in 0,04 M phosphate buffer (pH 3,0) containing 1-heptanesulfonic acid sodium salt (0,1 mg/ml) as an ion pairing agent. Quantitation of indomethacin was performed by UV detection at 268 nm. The linearity between chromatographic peak area and concentration was obtained in the concentration range 0,1-50 micrograms/ml. It was revealed, that therapeutic concentration of amizon is unusually low and does not exceed 50-80 ng/ml.

KEY WORDS: amizone, highly-effective liquid chromatography.

Отримано 17.04.2006 р.

Адреса для листування: О.В. Ильченко, а/с 3032, Вінниця, 21027, Україна.